

(19)



REPUBLIKA SLOVENIJA
Urad RS za intelektualno lastnino

(10) **SI 20643 A**

(12)

PATENT

(21) Številka prijave: **9920034**

(22) Datum prijave: **13.05.1999**

(51) MPK: **C12N 15/26**, C07K 14/55,
A61K 38/20, G01N 33/50,
A61P 37/04

(45) Datum objave: **28.02.2002**

(30) Prednostna pravica:
15.05.1998 US 80080

(86) Mednarodna patentna prijava:
13.05.1999 WO PCT/US99/10643

(87) Objava mednarodne patentne prijave:
WO 99/60128, 25.11.1999

(72) Izumitelji: **SHANAFELT Armen B., Moraga, CA 94556, US;**
GREVE Jeffrey M., Berkeley, CA 94708, US;
JESMOK Gary, Richmond, CA 94805, US;
LEMBACH Kenneth J., Danville, CA 94526, US;
WETZEL Gayle D., Martinez, CA 94553, US

(73) Imetnik: **BAYER CORPORATION, 100 Bayer Road, Pittsburgh, PA 15205-9741, US**

(74) Zastopnik: **Patentna pisarna d.o.o., Čopova 14 p.p. 1725, 1001 Ljubljana, SI**

(54) **IL-2-SELEKTIVNI AGONISTI IN ANTAGONISTI**

(57) Predloženi izum se nanaša na polipeptid, ki obsega humani IL-2-mutein, oštevilčen v skladu z IL-2 divjega tipa, pri čemer je humani IL-2 substituiran vsaj na enem od mest 20, 88 ali 126, pri čemer mutein prednostno aktivira celice T pred celicami NK. D20H in I, N88G, I in R imajo zlasti relativno T-celično diferencialno aktivnost mnogo večjo kot naravni IL-2 s

predvideno združeno zmanjšano toksičnostjo in vivo. Predloženi izum vključuje tudi polinukleotide, ki kodirajo muteine v smislu izuma, vektorje, ki vsebujejo polinukleotide, transformirane gostiteljske celice, farmacevtske sestavke, ki obsegajo muteine in terapevtske postopke zdravljenja.

SI 20643 A

BAYER CORPORATION**IL-2-selektivni agonisti in antagonisti**

Ta prijava je delno nadaljevanje US prijave ser. št. 09/080,080, vložene 15. maja 1998.

Področje izuma

Predloženi izum se na splošno nanaša na področji farmakologije in imunologije. Bolj podrobno se nanaša na nove sestavke iz snovi za selektivno aktiviranje celic T (PHA-blasti), ki pa imajo zmanjšano aktivacijo za naravne celice ubijalke ("celice NK"). Novi sestavki vključujejo variante citokinske družine, zlasti humani interlevkin-2 ("IL-2").

Stanje tehnike

Interlevkin 2 (IL-2) je močan imunski stimulator, ki aktivira različne celice imunskega sistema, vključno celice T, celice B in monocite. IL-2 je tudi močan in odločilen rastni faktor celic T. Zaradi teh aktivnosti so IL-2 preizkusili na njegovo sposobnost za zdravljenje raka. Humani IL-2 je zdravilo, ki ga je odobrila FDA, za zdravljenje metastatičnih renalnih karcinomov in metastatičnih melanomov. Uporaba IL-2 pri primernih pacientih je omejena zaradi hude toksičnosti, povezane z IL-2-terapijo; ocenjeno je, da v najboljšem primeru le 20 % primernih pacientov dejansko prejme terapijo. Toksičnosti, povezane z IL-2-terapijo, vključujejo hudo vročino, navzejo, povračanje, vaskularno prepustnost in hudo hipotenzijo. Kljub tem toksičnostim pa je IL-2 učinkovit za svoje odobrene indikacije (približno 17 % objektivna odzivna stopnja).

Čeprav je strukturna/funkcijska analiza mišjega IL-2 obsežna (Zurawski S.M. in Zurawski G. (1989) *Embo J* 8: 2583-90; Zurawski S.M. et. al. (1990) *Embo J* 9: 3899-905; Zurawski G. (1991). *Trends Biotechnol* 9: 250-7; Zurawski S.M. in Zurawski G.

(1992) *Embo J* 11: 3905-10. Zurawski et.al., *EMBO J*, 12 5113-5119 (1993)), pa je za humani IL-2 le omejena analiza. Večina študijev s humanimi IL-2-muteini je izvedena na murinih celicah; le omejeni študiji pa so izvedeni z uporabo PHA-blastov, ki izražajo visokoafinitetni IL-2-receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$. Ti študiji z uporabo PHA-blastov potrjujejo pomembnost ostankov Asp-20 in D-heliksa humanega IL-2. Pokazalo se je, da sta mesti Asp-20 in Gln-126 humanega IL-2 primarna ostanka, ki sta odgovorna za interakcijo z IL-2-receptorskimi β - oz. γ -podenotami (prikazano v: Theze et.al., *Immunol. Today*, 17, 481-486 (1996)). Čeprav je za ostanke v C-heliksu mišjega IL-2 prikazano, da so vključeni pri interakciji z mišjimi IL-2R β (Zurawski et.al., *EMBO J*, 12 5113-5119 (1993)), pa za ekvivalentne ostanke pri humanem IL-2 ni prikazano, da imajo enake lastnosti (ti ostanki pri humanem IL-2 bi bili Asp-84 in Asn-88). Ker je prikazana znatna specifičnost vrst med humanim in mišjim IL-2 (humani IL-2 kaže približno stokrat zmanjšano aktivnost v murinih sistemih), je težko napovedati, ali pride do istega tipa interakcij znotraj mej vrste. Ni znanih študijev, pri katerih bi uporabili celice, ki izražajo le humani intermediatnoafinitetni receptor IL-2R $\beta\gamma$.

Pri nekaterih humanih IL-2-muteinih so raziskane njihove aktivnosti na humanih PHA-blastih (Xu et. al., *Eur. Cytokine Netw*, 6, 237-244 (1995)). Za muteine, ki vsebujejo substitucije Asp-20 z levcinom (D20L) kot tudi argininom, asparaginom in lizinom, je prikazano, da imajo resne pomanjkljivosti v svoji sposobnosti za induciranje proliferacije PHA-blastov. Tako to stanje tehnike uči, da povzroči substitucija Asp-20 v muteinih kompromitirano aktivnost. Poleg tega Xu et.al. navajajo, da do datuma (1995) ni bilo identificiranih koristnih IL-2-muteinov bodisi za klinične ali raziskovalne aplikacije.

Humani IL-2 Q126D-mutein, ki so ga proizvedli Buchli in Ciardelli, *Arch. Biochem. Biophys*, 307(2): 411-415, (1993), kaže znatno kompromitirano aktivnost tako glede zmogljivosti kot tudi agonizma; pri humanih T-celičnih preizkusih kaže približno 1000-krat manjšo aktivnost od IL-2 in deluje kot delni agonist. Pri murinih T-celičnih preizkusih je mutein skoraj inaktiven. Obe preizkušeni celični liniji izražata močno afinitetno obliko IL-2-receptorja. Pri obeh celičnih tipih Q126D izkazuje sposobnost,

da antagonizira aktivnost, posredovano z IL-2, čeprav le delno pri humanem T-celičnem preizkusu.

Zhi-yong W. et.al., *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **25**(5): 558-560 (sept. 1993) so izvedli substitucijske eksperimente pri IL-2 na mestih 62, 69, 99 in 126, in prikazujejo 20-kratno in 30-kratno zmanjšanje aktivnosti v primerjavi z wt IL-2 s 62-Leu-IL-2 oz. 126-Asp-IL-2 pri mišjem T-celičnem preizkusu (CTLL-2). Vendar pa ni nobenega nauka ali napotkov, da substitucije na mestu 126 lahko podelijo T-celično selektivno aktivnost pred celicami NK, ali navedeno, da bi te spremembe imele podoben učinek pri humanih celicah T.

Collins L. et. al., PNAS USA 85: 7709-7713 (1988) navajajo, da ima substitucija Asp na namestu 20 bodisi z Asn (D20N) ali Lys (D20K) za posledico izgubo vezave za približno 100- do 1000-krat glede na humani IL-2 tako za visokoafinitetni receptor (IL-2R $\alpha\beta\gamma$, imenovan p55/p70 pri Collinsu et.al.) kot tudi za intermediatnoafinitetni receptor (IL-2R $\beta\gamma$, imenovan "p70" pri Collinsu, et.al.). Za oba mutantna proteina je videti, da ni bilo vpliva na vezavo na IL-2R α . To delo uči, da razdor vezave na intermediatnoafinitetni IL-2-receptor (IL-2R $\beta\gamma$) vodi tudi do razdora vezave na visokoafinitetni IL-2-receptor (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), kar navaja na to, da se diferencialne vezave ali aktivacije med IL-2R $\beta\gamma$ ali IL-2R $\alpha\beta\gamma$ ne da doseči s substitucijo Asp na mestu 20.

Berndt W.G. et.al., *Biochemistry* **33** (21): 6571-6577 (1994) so uporabili kombinatorno kasetno mutagenozo za simultano mutiranje mest 17-21 v naravnem IL-2, za katere domnevajo, da interagirajo z intermediatnoafinitetnim IL-2-receptorjem. Izmed 2610 selekcioniranih klonov je bilo le 42 aktivnih. Ugotovili so, da imata mesti 20 in 21 primarni pomen za biološko aktivnost. Ni pa napotkov ali naukov za individualne substitucije, razen za L21V.

US patent št. 5,229,109 (Grimm et.al.) baje opisuje nizkotoksične IL-2-analoge za uporabo v imunoterapiji in pri zdravljenju raka. Te lastnosti obeh IL-2-analogov s substitucijami na mestih Arg38 (za alanin) in Phe42 (za lizin) so analizirali in

primerjali s tistimi za naravni IL-2. Za analoge so ugotovili, da so zmožni, da vzdržujejo svojo sposobnost za vezavo na intermediatni IL-2-receptor, medtem ko je vezava na tako imenovani "visokoafinitetni" receptor le minimalna. V tem času so za intermediatnoafinitetni receptor mislili, da je sestavljen le iz p75 (IL-2R β), za visokoafinitetni receptor pa, da je sestavljen iz p55 + p75 receptorskega kompleksa (IL-2R $\alpha\beta$). Analogi prav tako vzdržujejo svojo sposobnost, da stimulirajo mononuklearne celice periferne krvi, da ustvarijo ubijanje, aktivirano z limfokini (LAK). Pomembno je, da se izločanje IL-1 β in TNF α znatno zmanjša pri odzivu na analoge v primerjavi z molekulo naravnega IL-2. Aminokislinski ostanki, opisani v tem patentu, so tisti, ki bi specifično interagirali z IL-2R α (p55); eliminacija interakcij z IL-2R α , pa bi imela za posledico zmanjšano aktivnost na celicah, ki nosijo visokoafinitetni IL-2-receptor, in ne bi vplivala na aktivnost celic, ki nosijo intermediatnoafinitetni IL-2-receptor. Tako naj bi bilo vzdrževano proizvodnjanje celic LAK (za katere je mišljeno, da so izvedene iz celic NK). Muteini, opisani tukaj, so usmerjeni na aminokislinske ostanke na mesta 20, 88 in 126; za ta mesta domnevajo, da interagirajo specifično z IL-2R β (p75; mesti 20 in 88) in IL-2R γ (ni znan v času vložitve patenta Grimma et. al.; mesta 126). Kot posledica so interakcije z IL-2R α ostale nespremenjene. Mehanistično bodo imeli muteini, ki jih opisujejo Grimm et.al., zmanjšane interakcije z IL-2 visokoafinitetnim receptorjem, vendar naj ne bi imeli učinka na IL-2 intermediatnoafinitetni receptor; muteini, opisani tukaj, imajo nasprotno lastnost, imajo izrazito pomanjkljivost v svoji sposobnosti, da interagirajo z IL-2 intermediatnoafinitetnim receptorjem IL-2R $\beta\gamma$ in kažejo zelo malo pomanjkljivosti ali pa nobene pri funkcionalnih interakcijah z IL-2 visokoafinitetnim receptorjem, IL-2R $\alpha\beta\gamma$.

US patent št. 5,206,344 (Goodson et.al.) opisuje muteine IL-2, pri katerih je ena od aminokislin zrele naravne sekvence IL-2 nadomeščena s cisteinskim ostankom, ki so nato pripravljene in konjugirane z nadomeščenim cisteinskim ostankom na polimeru, izbranim izmed polietilenglikol homopolimerov ali polioksietiliranih poliolov, kjer so homopolimeri nesubstituirani ali substituirani na enem koncu z alkilno skupino. Ti muteini so narejeni z gostiteljsko ekspresijo mutantnih genov, ki kodirajo muteine, ki

so bili spremenjeni iz genov za starševske proteine z usmerjeno mutagenezo. Poleg tega je lahko konjugirana druga vrsta IL-2 s cisteinskim ostankom na mestu 125 zrelega IL-2 proteina, kar ni potrebno za biološko aktivnost IL-2. Niso pa opisane mutacije, ki dajo zmanjšano toksičnost.

US patent št. 4,959,314 (Lin et.al.) opisuje muteine biološko aktivnih proteinov, npr. IFN- β in IL-2, v katerih so cisteinski ostanki, ki niso bistveni za biološko aktivnost, izpuščeni ali nadomeščeni z drugimi aminokislinami, da eliminirajo mesta za intermolekularno premreženje ali nepravilno intramolekularno formacijo disulfidnih mostov. Ti muteini so narejeni z bakterijsko ekspresijo mutantnih genov, ki kodirajo muteine, sintetizirane iz genov za starševske proteine z oligonukleotidno usmerjeno mutagenezo. Ne opisujejo pa mutacij, ki dajo zmanjšano toksičnost.

US patent št. 5,116,943 (Halenbeck et.al.) opisuje, da je biološko aktivni referenčni terapevtski protein zaščiten pred oksidacijo s postopkom, pri katerem se substituirata s konzervativno aminokislino vsak metionilni ostanek, občutljiv za kloramin T ali peroksidno oksidacijo, pri čemer dodatni neobčutljivi metionilni ostanki niso tako substituirani. Tako proizvedeni mutein, odporen proti oksidaciji, je prednostno humani mutein interleukina-2 ali interferona- β , konzervativna aminokislina pa je prednostno alanin. Niso pa opisane mutacije, ki dajo zmanjšano toksičnost.

US patent št. 4,853,332 (Mark et.al.) je usmerjen na IFN- γ in IL-2-muteine, v katerih so cisteinski ostanki, ki niso bistveni za biološko aktivnost, izpuščeni ali nadomeščeni z drugimi amino kislinami, da eliminirajo mesta za intermolekularno premreženje ali nepravilno intramolekularno tvorbo disulfidnih mostov. Patent opisuje, da ima substitucija v IL-2 cisteina 125 s serinom za posledico mutein z aktivnostjo, primerljivo s tisto od naravnega IL-2.

US patent št. 5,696,234 (Zurawski et.al.) je usmerjen na muteine sesalskih citokinov in na postopke za selekcioniranje za agoniste in antagoniste sesalskih citokinov. Posebno je za humani IL-2 dvojni mutein P82A/Q126D prikazano, kot da ima antagonski učinek

aktivnost na murinih celicah Baf3, sotransfektiranih s humanimi α in β IL-2R-podenotami. Prikazana je majhna agonistična aktivnost. Tudi za murine IL-2-muteine je prikazano, da imajo delno agonistično in antagonistično aktivnost na celicah HT2, zlasti Q141D, Q141K, Q141V in Q141L. Ni pa opisanih nobenih muteinskih aktivnosti, ki bi kazale ali navajale na selektivni agonistični učinek za mutacije na mestih 20, 88 in 126.

Zurawski et.al., opisujejo murine IL-2-muteine, ki imajo lastnosti, da so aktivni na celicah, ki izražajo IL-2R $\alpha\beta\gamma$, vendar pa so inaktivni na celicah, ki izražajo IL-2R $\beta\gamma$ (Zurawski G., *Trends Biotechnol.* 9: 250-257 (1991); Zurawski S.M. in Zurawski G. *Embo. J.* 11: 3905-3910 (1992)). Murini IL-2-muteini, ki kažejo te lastnosti, imajo substitucije: Asp-34 za Ser ali Thr in Gln-141 za Lys. Asp-34 in Gln-141 mišjega IL-2 sta očitno ekvivalenta Asp-20 oz. Gln-141 humanega IL-2. Čeprav te reference navajajo "selektivni agonistični" IL-2-muteini, pa ne opisujejo njihovih zmogljivosti, da so manj toksični, temveč da so močni antagonisti endogenega IL-2.

EP 0267 795 A2 (Zurawski et.al.) opisuje vrsto mišjih IL-2-muteinov na osnovi sekvence, vključno nekatere, ki vsebujejo delecije in/ali substitucije v prvih 30 N-terminalnih aminokislinskih ostankih, ki so biološko kompetentni, ne vključuje, razpravlja ali navaja pa aminokislinskih substitucij, opisanih tukaj, pri ekvivalentnih mišjih IL-2-ostankih. Obstaja potreba po izboljšani IL-2-molekuli, ki ima zmanjšano toksičnost in je tudi bolj splošno tolerantna.

Taniguchi et.al., US 4,738,927 je usmerjen na rekombinantno DNA, ki obsega rekombinantno DNA, ki kodira polipeptid, ki ima biološko aktivnost IL-2, pri čemer je ta aktivnost promocija rasti citotoksične T-limfocitne celične linije, in vektorsko DNA, sposobno propagacije v prokariotski ali evkariotski celici, kodirno sekvenco navedenega gena, locirano na mestu, ki je navzdol od promotorske sekvence, pri čemer ima polipeptid 132 do 134 aminokislin v celoti v aminokislinski sekvenci polipeptida. Opisuje tudi gen, rekombinatne DNA vektorje, gostiteljske celice in postopke rekombinantnega proizvodnje naravnega IL-2. Taniguchi et.al. ne opisujejo

kakršnihkoli variant ali muteinov in ne navajajo, katera mesta v proteinu so odgovorna za signaliziranje ali vezavno aktivnost.

Jasno je, da je za IL-2-muteine, ki ne kažejo z dozo omejene toksičnosti rekombinantnih IL-2-muteinov iz stanja tehnike, potrebno, da prizamejo terapevtsko ugodnost zmogljivosti tega citokina.

Glavna vsebina izuma

Predloženi izum je usmerjen na polipeptid, ki obsega humani IL-2-mutein, oštevilčen v skladu z divjim tipom IL-2, pri čemer je humani IL-2 substituiran vsaj na enem od mest 20, 88 ali 126 in pri čemer mutein prednostno aktivira celice T pred celicami NK. Ta izum prikazuje manj toksičen IL-2-mutein, ki dopušča večjo terapevtsko uporabo tega interleukina.

Nadalje je izum usmerjen na IL-2-muteine, ki imajo posamezne mutacije na mestih asparatat 20, asparagin 88 in glutamin 126. Specifični muteini so predstavljeni z označevalci D20X, N88X in Q126X, kjer je "X" specifična amino kislina, katera, kadar je substituirana v humanem IL-2, podeli selektivno aktivnost za celice, ki izražajo IL-2R $\alpha\beta\gamma$ receptor (npr. celice T), prednostno pred celicami, ki izražajo IL-2R $\beta\gamma$ receptor (npr. celice NK). Muteini, ki kažejo več kot 1000-kratno selektivnost, vključujejo: D20H, D20I, N88G, N88I, N88R in Q126L. Zlasti ti muteini kažejo tudi v bistvu aktivnost divjega tipa IL-2 na celicah T. Identificirane so tudi druge mutacije, ki zagotavljajo selektivnost, manjšo od 1000-kratne, vendar pa večjo od 10-kratne. Predloženi izum vključuje tudi polinukleotide, ki kodirajo muteine v smislu izuma, vektorje, ki vsebujejo polinukleotide, transformirane gostiteljske celice, farmacevtske sestavke, ki obsegajo muteine in terapevtske postopke za zdravljenje z uporabo muteinov.

Predloženi izum je usmerjen tudi na postopek za selekcioniranje IL-2-muteinov z ocenjevanjem pri preizkusih z uporabo IL-2R $\alpha\beta\gamma$ v primerjavi z IL-2R $\beta\gamma$, kjer je

aktivnost IL-2-muteina povečana glede na wt IL-2 v enem preizkusu prednostno pred drugim. IL-2R $\alpha\beta\gamma$ in IL-2R $\beta\gamma$ sta ektodomeni podenot individualnega receptorja v ustrezni kombinaciji in sta uporabljena, da direktno merita vezavo IL-2-muteinov na vsak receptorski kompleks. Preizkus IL-2 $\alpha\beta\gamma$ uporablja odziv tipa celic, ki nosijo IL-2 $\alpha\beta\gamma$, preizkus IL-2 $\beta\gamma$ pa uporablja odziv tipa celic, ki nosijo IL-2 $\beta\gamma$. Celica, ki nosi IL-2 $\alpha\beta\gamma$ je PHA-blast, celica, ki nosi IL-2 $\beta\gamma$, pa je NK. Ta preizkus je proliferacija tako za tip celic, ki nosijo IL-2 $\alpha\beta\gamma$ in tip celic, ki nosijo IL-2 $\beta\gamma$.

Predloženi izum je prav tako usmerjen na vektor, ki obsega polinukleotid, ki kodira mutein v smislu izuma, vektor, ki usmerja ekspresijo humanega IL-2-muteina, ki ima aktivnost za aktiviranje celic PHA-blastov, vendar pa ima zmanjšano aktivnost za aktiviranje celic NK, pri čemer je vektor sposoben, da zagotavlja transfekcijo ciljnega organizma in pozneje ekspresijo *in vivo* humanega IL-2-muteina, ki je kodiran z navedenim polinukleotidom.

Predloženi izum je prav tako usmerjen na postopek za zdravljenje pacienta, ki je prizadet s stanjem, ki ga je možno zdraviti z IL-2 z dajanjem terapevtsko učinkovite količine humanega IL-2-muteina, oštevilčenega v skladu z IL-2 divjega tipa, ki ima PHA-blastno aktivacijsko aktivnost, in ima zmanjšano NK-celično aktivacijsko aktivnost. Ta postopek je uporaben tam, kjer je stanje, ki ga je možno zdraviti z IL-2, HIV, rak, avtoimunska bolezen, infekcijska bolezen, vakcinski adjuvans pri rakavi vakcini in pri konvencionalni vakcinski terapiji, za imunsko stimulacijo pri starejših ali sicer imunokompromitiranih, kot tudi pri humanih SCID (huda kombinirana imunska pomanjkljivost)-pacientih ali za druge terapevtske aplikacije, ki zahtevajo stimulacijo imunskega sistema.

Kratek opis slik

Fig. 1 do 7 prikazuje krivulje odziva na dozo za wt humani IL-2 (IL-2) in D20H (Fig. 1), IL-2 in D20I (Fig. 2), IL-2 in N88G (Fig. 3), IL-2 in N88I (Fig. 4), IL-2 in N88R (Fig. 5), IL-2 in Q126E, (Fig. 6) in IL-2 in Q126L (Fig. 7). A: individualni odziv na dozo za IL-2 (polni krogi) in mutein (prazni krogi) pri preizkusu primarne humane T-celične proliferacije (PHA-blasti). B: individualni odziv na dozo za IL-2 (polni trikotniki) in mutein (prazni trikotniki) pri preizkusu primarne humane NK-celične proliferacije.

Fig. 8A-8D. Toksičnost PROLEVKINATM pri šimpanzih, ocenjena pri dveh živalih (X-159, trikotniki in X-124, kvadratki), v primerjavi s kontrolnim nosilcem (X-126, rombi). Toksičnost ocenimo z renalnimi parametri (sečninski dušik v krvi (BUN), A; kreatinin, B) in hepatično funkcijo (celotni bilirubin, C; ALT, D).

Fig. 9. Diagram za spremembo telesne mase v odstotkih v 30 dneh. Telesno maso za živali, obdelane z IL-2/N88R (trikotniki), PROLEVKINOM (kvadratki) ali nosilcem (rombi), izmerimo na označene dni.

Fig. 10A-10D. Limfocite (A), celotne bele krvne celice (B), nevtrofilce (C) in trombocite (D) za živali, obdelane z IL-2/N88R (trikotniki), PROLEVKINOM (kvadratki) ali nosilcem (rombi), ocenimo na označene dni.

Fig. 11A-11D. Sečninski dušik v krvi (A, BUN), kreatinin (B), fosfor (C) in anionsko praznino (D) za živali, obdelane z IL-2/N88R (trikotniki), PROLEVKINOM (kvadratki) ali nosilcem (rombi), ocenimo na označene dni.

Fig. 12A-12D. Celotni bilirubin (A), ALT (B), fibrinogen (C) in aktivirani protrombinski čas (D) za živali, obdelane z IL-2/N88R (trikotniki), PROLEVKINOM (kvadratki) ali nosilcem (rombi), ocenimo na označene dni.

Fig. 13A-13D. Nivoje za natrij (A), kloridni ion (B), kalcij (C) in kalij (D) v krvi za živali, obdelane z IL-2/N88R (trikotniki), PROLEVKINOM (kvadratki) ali nosilcem (rombi), ocenimo na označene dni.

Fig. 14A-14C. Albuminski nivoji v krvi (A), hematokrit (B) in hemoglobin (C) za živali, obdelane z IL-2/N88R (trikotniki), PROLEVKINOM (kvadratki) ali nosilcem (rombi), ocenimo na označene dni.

Fig. 15A-15C. Učinki za IL-2/N88R (kvadratki), PROLEVKIN (rombi) in nosilec (trikotniki) so označeni za celotno T-celično populacijo (A, celice CD3+), CD4+ T-celično populacijo (B) in CD8+ T-celično populacijo (C).

Fig. 16A-16C. Učinki za IL-2/N88R (kvadratki), PROLEVKIN (rombi) in nosilec (trikotniki) so označeni za celotno T-celično populacijo (A, celice CD3+), CD4+ T-celično populacijo (B) in CD8+ T-celično populacijo (C).

Fig. 17. Učinka za IL-2/N88R in PROLEVKIN na T-celično aktivacijo glede na povprečje fluorescence CD25 pozitivnih celic. Učinki za IL-2/N88R (kvadratki), PROLEVKIN (rombi) in nosilec (trikotniki) so označeni za CD3+CD4+ T-celično populacijo. Nezadostno število celic CD3+/CD8+ smo dobili za oceno povprečja fluorescence pri tej populaciji.

Fig. 18A-18D. Učinki za IL-2/N88R (kvadratki), PROLEVKIN (rombi) in nosilec (trikotniki) so označeni za CD4+ T-celično populacijo (A, celice CD3+/CD4+), CD8+ T-celično populacijo (B, celice CD3+/CD8+), celotno T-celično populacijo (C, celice CD3+) in NK-celično populacijo (D, celice CD3-/CD16+).

Fig. 19. Diagram za pljučne metastaze vs. dozi pri miših, obdelanih s PROLEVKINOM (prazni krogi) ali IL-2/N88R (polni krogi). Pljučne metastaze preštujemo na koncu študija.

Fig. 20. Plazmidna mapa za IL2N88R vektor pBC1IL2SA.

Opis prednostnih izvedb

A. Ozadje

Delovanje IL-2 na celicah T posreduje vezava na IL-2-receptorske proteine. Različni celični površinski proteini na celicah T vežejo IL-2. Najprej je treba identificirati posamezni polipeptid, imenovan IL-2R α , ki je polipeptid (p55) 55 kD, ki se pojavi po T-celični aktivaciji in je bil originalno imenovan antigen Tac (za T-aktivacijo). IL-2R α veže IL-2 s K_d približno 10^{-8} M in je tudi znan kot "nizkoafinitetni" IL-2-receptor. Vezava IL-2 na celice, ki izražajo le IL-2R α , ne vodi do kakršnegakoli zaznavnega biološkega odziva.

Drugi IL-2-receptor je vezavni kompleks, sestavljen iz IL-2R β in IL-2R γ ; IL-2R γ , 64 kD polipeptid, tudi znan kot navadna γ (γ_c) veriga, ker je porazdeljena med številnimi citokinskimi receptorji. IL-2R β ima približno 70 do 75 kD (imenovan različno p70 ali p75) in je član citokinske receptorske družine tip I, označen z obema cistein/WSXWS motivoma. IL-2R β je izražen koordinatno z γ_c . Afiniteta vezave IL-2 na IL-2R $\beta\gamma_c$ je večja kot tista za IL-2R α s K_d približno 10^{-9} M; znan je tudi kot "intermediatno afinitetni" IL-2-receptor. IL-2 povzroča rast celic, ki izražajo IL-2R $\beta\gamma_c$, s polovično maksimalno rastno stimulacijo, do katere pride pri enaki koncentraciji IL-2, ki proizvede polovično maksimalno vezavo (tj. 1×10^{-9} M). IL-2R $\beta\gamma_c$ je isti signalizirni receptorski kompleks, ki se lahko veže na IL-15.

Tretji znani IL-2-receptorski kompleks je IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ kompleks. Celice, ki izražajo oba IL-2R α in IL-2R $\beta\gamma_c$, lahko vežejo IL-2 mnogo bolj tesno s K_d približno 10^{-11} M in tako je le-ta znan tudi kot "visokoafinitetni" kompleks. Do stimulacije rasti pri takih celicah pride pri podobno nizki koncentraciji IL-2. Tako vezavo IL-2 kot tudi stimulacijo rasti lahko blokiramo s protitelesi za IL-2R α , IL-2R β ali γ_c , najbolj

učinkovito s kombinacijo protiteles za multiple receptorske podenote. Ta opazovanja navajajo k temu, da IL-2R α tvori kompleks z IL-2R $\beta\gamma_c$, ki poveča afiniteto signalizirnega receptorja za IL-2 in s tem dopušča, da se rastni signal dovede pri znatno nižjih koncentracijah IL-2. Verjetno se IL-2 najprej hitro veže na IL-2R α in tu olajša povezavo z IL-2R $\beta\gamma_c$. Mirujoče celice T izrazijo IL-2R $\beta\gamma_c$, vendar pa le majhne količine IL-2R α ; povečanje površinsko izraženega IL-2R α lahko stimulira IL-2. Po T-celični aktivaciji, posredovani z antigenskim receptorjem, se IL-2R α hitro izrazi in s tem zniža koncentracijo IL-2, potrebno za stimulacijo rasti. Vezava IL-2 na IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ kompleks ima za posledico signalno transdukcijo preko Jak/STAT signalizirne poti.

Odkrili smo muteine humanega IL-2, ki prednostno aktivirajo celice T (PHA-blasti; celice, ki izrazijo visokoafinitetni IL-2-receptor, IL2R $\alpha\beta\gamma$) glede na naravne celice ubijalke (celice NK) (celice, ki izrazijo intermediatnoafinitetni IL-2-receptor IL-2R $\beta\gamma$). Muteini, ki substituirajo Asp-20 s histidinom (D20H) ali izolevcinom (D20I), Asn-88 z argininom (N88R), glicinom (N88G) ali izolevcinom (N88I), ali Gln-126 z levcinom (Q126L) ali glutamatom (Q126E), kažejo nepričakovano popolno aktivnost IL-2 na PHA-blastih in majhno (če sploh kakršnokoli) na celicah NK. Prejšnji študiji humanih IL-2-muteinov so se opirali na murine celične sisteme za analizo, kadar pa so bile uporabljene humane celice, so bile uporabljene tiste, ki izražajo le IL-2R $\beta\gamma$ (kot npr. celice NK). Poleg tega so vsi ti študiji, kjer so uporabili humane PHA-blaste, pokazali, da ima substitucija Asp-20 (z Leu, Arg, Asp ali Lys; Xu et.al., *Eur. Cytokine Netw*, 6, 237-244 (1995)) ali Gln-126 (z Asp; Buchli in Ciardelli, *Arch. Biochem. Biophys*, 307 (2): 411-415, (1993)) za posledico humane IL-2-muteine, ki imajo hudo kompromitirano aktivnost. V prejšnjih študijih so uporabili mišje IL-2-muteine, identificirane z murinim IL-2, z različnimi aktivnostmi (Zurawski et.al., *EMBO J*, 12 5113-5119 (1993)), vendar pa nobena od mutacij, ki je dala te rezultate, ni bila sugestivna za tiste, identificirane pri delu, opisanem tukaj. Humani IL-2-muteini, ki vsebujejo identične mutacije na sinonimnih mestih z murinimi IL-2-muteini, ne kažejo podobnih aktivnosti in tako navajajo k temu, da murini primeri niso napovedovalni za humano funkcionalnost. Nam, izumiteljem, niso znani nobeni študiji humanih IL-2-

muteinov, ki bi primerjali relativne aktivnosti na humanih celicah, ki izražajo IL-2-receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (npr. PHA-blasti) glede na izražanje IL-2-receptorja IL-2R $\beta\gamma$ (npr. celice NK). Pričakovati je, da bo analiza *in vivo* potrdila, da bodo opisani muteini imeli izboljšani terapevtski indeks v primerjavi z humanim IL-2 divjega tipa, in sicer z znižanjem toksičnosti, in tako zagotovili terapevtsko koristne spojine za zdravljenje motenj, ki potrebujejo stimulacijo imunskega sistema.

Interlevkin 2 (IL-2) je sedaj v uporabi na klinikah za zdravljenje metastatičnega renalnega raka. Vendar pa je njegova huda toksičnost omejila njegovo uporabo le na podskupino najbolj zdravih pacientov, in toksičnost, ki omejuje dozo, razumljivo kompromitira njegovo splošno učinkovitost. Za akutno toksičnost IL-2 predvidevajo, da jo posreduje aktivacija celic NK, medtem ko učinkovitost posreduje direktna aktivacija celic T (Jacobson et.al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (ZDA 17. sep. 1996, 93(19) str. 10405-10; Smith KA, *Blood* 1993, 81(6) str. 1414-23; Kaplan et.al., *Biotechnology*, 10(2) str. 157-62). Celice T izražajo drugačen receptor za IL-2 kot celice NK (celice T: IL-2R $\alpha\beta\gamma$, visokoafinitetni IL-2-receptor; celice NK: IL-2R $\beta\gamma$, intermediatnoafinitetni IL-2-receptor). Humani IL-2-muteini, opisani tukaj, selektivno aktivirajo T-celični IL-2-receptor ne pa NK-celični IL-2-receptor.

Z nekaj uspeha je bila uporabljena terapija z nizko dozo IL-2 za preprečitev direktnega aktiviranja celic NK (Jacobson et.al. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10405-10). Koncept te strategije je bil, da se pri nizkih dozah IL-2 aktivira le visokoafinitetni IL-2-receptor z izključitvijo intermediatnoafinitetnega IL-2-receptorja. Oblika intermediatnoafinitetnega IL-2-receptorja, IL-2R $\beta\gamma$, je izražena na celicah NK, medtem ko celice T izražajo visokoafinitetno obliko IL-2R $\alpha\beta\gamma$.

Izumitelji pa smo se približali problemu toksičnosti z druge strani. Domnevali smo, da razdor interakcij IL-2 z IL-2R β in/ali IL-2R γ z ustrezno modifikacijo specifičnih vezavnih ostankov na vezavni površini IL-2 prepreči učinkovito vezavo (in tako aktivacijo) na celice, ki izražajo le IL-2R $\beta\gamma$. Vendar pa na celicah, ki izražajo IL-2R $\alpha\beta\gamma$ še vedno pride do začetne vezave na IL-2R α in tako vezave na celico, tako da

terapija z nizko dozo, ki jo navajajo Jacobs et.al., še vedno lahko povzroči toksične stranske učinke. Z vezavo na IL-2R α lahko pride do učinkovite okrepitve IL-2R β in IL-2R γ na celični površini, kljub oslavljenim interakcijam modificiranega IL-2 z IL-2R β in/ali IL-2R γ . Na ta način se lahko tvori signalizirno kompetenten IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ kompleks. Verjamemo, da ima lahko IL-2-varianta, ki je sposobna, da selektivno aktivira visokoafinitetne IL-2-receptorje na celicah T prednostno pred intermediatnoafinitetnimi IL-2-receptorji na celicah NK, povečan terapevtski indeks v primerjavi z divjim tipom IL-2 zaradi zmanjšane profila toksičnosti. IL-2-varianta s povečanim terapevtskim indeksom bi imela znatno razširjeno območje uporabe tako pri zdravljenju raka (kot direktna in/ali združena terapija) kot tudi imunodeficienci (npr. HIV in tuberkuloza). Druge potencialne uporabe IL-2 so izvedene iz imunostimulatorne aktivnosti in vključujejo poleg direktnega zdravljenja raka tudi imunodificienco, kot npr. HIV ali humane SCID-paciente; infekcijsko bolezen, kot npr. tuberkulozo; kot adjuvans pri strategiji "rakavih vakcin"; in za indikacije stimulacije imunskega sistema, kot npr. povečanje standardnih vakcinacijskih protokolov ali za zdravljenje starejših.

Ustrezna substitucija pri Asp-20, Asn-88 ali Gln-126 zniža vezavne interakcije bodisi za IL-2R β (Asp-20 in Asn-88) ali IL-2R γ (Gln-126). Čisti učinek takih substitucij ima za posledico IL-2-muteine, ki ohranijo aktivnost na humanih celicah T in imajo zmanjšano aktivnost na humanih celicah NK.

Ker ni bilo možno, da bi napovedali rezultat dane substitucije pred ocenjevanjem s preizkusi celic T in NK, smo naredili vse možne substitucije naravnih amino kislin (razen Cys) na mestih Asp-20, Asn-88 in Gln-126 in omejen, vendar raznolik niz mutacij na mestu Asp-84, za preizkus, ali te resnično interagirajo z IL-2R β . Dodatne mutacije bi preizkusili na mestu Asp-84, če bi opazili učinke pri navideznih IL-2R β -interakcijah. Podatki za 46 ločenih substitucij na teh mestih so navedeni v tabeli 1, spodaj.

Mutacije smo uvedli z usmerjeno mutagenezo na cDNA humanega IL-2 divjega tipa. Pravilne klone smo subklonirali na ekspresijski vektor, prikladen za ekspresijo v heterolognem sistemu (npr. *E.coli*, bakulovirus, kvasne ali sesalske celice, kot npr. ovarijske celice kitajskega hrčka (celice CHO)). Očiščene proteine smo preizkusili s preizkusi za T-celično (PHA-blast) proliferacijo in NK-proliferacijo. Različni odzivi, proizvedeni z individualnimi muteini pri teh preizkusih, tj. EC_{50} , označujejo mutacije, ki povzročijo te aktivnosti. Podrobno, muteini, ki stimulirajo relativno močan odziv v PHA-blastnem (celice T) preizkusu (vs. IL-2 divjega tipa) v primerjavi z odzivom v NK-celičnem preizkusu (vs. IL-2 divjega tipa), navajajo k substitucijam, ki zagotavljajo celično specifičnost na osnovi sposobnosti specifičnih muteinov, da se vežejo na IL-2 $\alpha\beta\gamma$ in inaktivirajo IL-2 $\alpha\beta\gamma$, izražen na teh celicah, vendar niso sposobni da se vežejo in tako ne aktivirajo celic, ki izražajo le IL-2 $\beta\gamma$. IL-2-muteini, ki kažejo to lastnost, imajo na ta način *in vivo* imunostimulatorne lastnosti IL-2 z znižanimi toksičnostmi, povezanimi z IL-2 terapijo, za vaskularno prepustnost in hipotenzijo.

B. Definicije

CHO-celično linijo, uporabljeno za proizvodnjo rekombinantnega proteina, opisanega tukaj, smo deponirali pri ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, ZDA, 5. maja 1999, depozit št. PTA-8. Ker sev, na katerega se sklicujemo, vzdržujejo v skladu z budimpeštansko pogodbo, bo le-ta dosegljiv za patentne urade, podpisnike budimpeštanske pogodbe.

Kot uporabljamo tukaj izraz "IL-2 divjega tipa" pomeni IL-2 bodisi naraven ali rekombinanten, ki ima sekvenco 133 amino kislin, ki se normalno nahajajo v naravnem humanem IL-2 (manj signalni peptid, ki je sestavljen iz dodatnih 20 N-terminalnih amino kislin), katerega aminokislinsko sekvenco opisujejo: Fujita et.al. *PNAS USA* 80, 7437-7441 (1983), z dodatnim N-terminalnim metioninom ali brez njega, ki je nujno vključen, kadar je protein izražen kot intracelična frakcija v *E. coli*.

Kot uporabljamo tukaj izraz "IL-2-mutein" pomeni polipeptid, kjer so bile narejene specifične substitucije pri humanem zrelem interleukin-2-proteinu. Tabela 1 spodaj prikazuje 46 narejenih individualnih substitucij IL-2-muteinov in podatke za njihove ustrezne relativne aktivnosti. Prednostne izvedbe vključujejo tiste muteine, ki imajo vsaj 100-kratno relativno aktivnost. Posebno prednostne izvedbe vključujejo naslednje, ki imajo več kot 1000-kratno relativno aktivnost, kjer je: aspartat (Asp) ostanek (D) na mestu 20 ("D20"), kadar je oštevilčeno v skladu z IL-2 divjega tipa, substituiran z izolevcinom ("D20I") ali histidinom ("D20H"); asparaginski ostanek (Asn) na mestu 88 (N88) je substituiran z izolevcinom (N88I), glicinom (N88G) ali argininom (N88R); in glutaminski ostanek (Gln) na mestu 126 (Q126) je substituiran z levcinom (Q126L) ali glutamatom (Q126E) ali aspartatom (Q126D). Prednostni IL-2-muteini imajo aminokislinsko sekvenco, ki je identična IL-2 divjega tipa pri drugih nesubstituiranih ostankih. Vendar so lahko IL-2-muteini v smislu izuma označeni tudi z aminokislinskimi insercijami, delecijami, substitucijami in modifikacijami na enem ali več mestih ali pri drugih ostankih naravne IL-2-polipeptidne verige. V skladu s tem izumom je lahko rezultat katerekoli take insercije, delecije, substitucije in modifikacije IL-2-mutein, ki ohrani PHA-blastno selektivno aktivnost, medtem ko ima zmanjšano sposobnost, da aktivira celice NK, in spada v obseg tega patenta.

Kombiniranje prednostnih ali posebno prednostnih substitucij, opisanih zgoraj, v posamezni rekombinantni IL-2-molekuli, ima lahko za posledico kombinacijo mutant, ki imajo aktivnost, podobno tisti, prikazani tukaj za posamezne mutante. Pričakujemo lahko, npr., da je rezultat IL-2-molekule, ki ima kombinacijo dveh ali več mutacij, izbranih iz tabele 1, T-celični selektivni IL-2-agonist z relativno aktivnostjo, podobno relativni aktivnosti za posamezne substitucije, prikazane tukaj. Kombinacija mutantov spada k smislu in obsegu predloženega izuma.

Prednost dajemo konzervativnim modifikacijam in substitucijam na drugih mestih IL-2 (tj. tiste, ki imajo minimalni učinek na sekundarno ali terciarno strukturo muteina). Take konzervativne substitucije vključujejo tiste, ki jih opisuje: Dayhoff v The Atlas of Protein Sequence and Structure 5 (1978) in Argos v EMBO J., 8:779-785 (1989).

Amino kisline, ki spadajo npr. v eno od naslednjih skupin, pomenijo konzervativne spremembe:

- ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr
- cys, ser, tyr, thr
- val, ile, leu, met, ala, phe
- lys, arg, his
- phe, tyr, trp, his in
- asp, glu.

Prednost dajemo tudi modifikacijam ali substitucijam, ki ne uvedejo mesta za dodatno intermolekularno premreženje ali nepravilno tvorbo disulfidnih vezi. IL-2 je npr. znan, da ima tri cys ostanke pri divjem tipu na mestih 58, 105 in 125 zrele sekvence.

Z izrazom "oštevilčen v skladu z IL-2 divjega tipa" je mišljeno identificiranje izbrane amino kisline glede na mesto, na katerem se ta amino kislina normalno nahaja v zreli sekvenci IL-2 divjega tipa. Kjer so narejene insercije ali delecije za IL-2-mutein bodo strokovnjaki upoštevali, da je Asp, ki se normalno nahaja na mestu 20, lahko premaknjen na mesto v muteinu. Vendar pa lahko lokacijo premaknjenega Asp z lahkoto določimo z nadzorovanjem in korelacijo bočnih amino kislin s tistimi bočnimi Asp v IL-2 divjega tipa.

Izraz "celični tipi, ki imajo IL-2R $\alpha\beta\gamma$ -receptor", pomeni celice, za katere je znano, da imajo ta receptorski tip, tj. celice T, aktivirane celice T, celice B, aktivirane monocite in aktivirane celice NK. Izraz "celični tipi, ki imajo IL-2R $\beta\gamma$ -receptor", pomeni celice, za katere je znano, da imajo receptorski tip, tj. celice B, mirujoče monocite in mirujoče celice NK.

IL-2-muteine v smislu izuma lahko proizvedemo s katerimkoli prikladnim postopkom, znanim v tehniki. Taki postopki vključujejo konstruiranje sekvence DNA, ki kodira IL-2-muteine v smislu izuma, in izražanje teh sekvenc v prikladno transformiranem gostitelju. S tem postopkom proizvedemo rekombinantne muteine v smislu izuma.

Prav tako pa lahko muteine v smislu izuma proizvedemo, čeprav manj prednostno, s kemično sintezo ali kombinacijo kemičnih sintez in tehnologije rekombinantne DNA. Postopki za šaržno proizvodnjo ali perfuzijsko proizvodnjo so strokovnjakom na splošno znani. Npr. Freshey R.I. (izd.), "Animal Cell Culture: A Practical Approach", 2.izd., 1992, IRL Press, Oxford, England; Mather, J.P. "Laboratory Scaleup of Cell Cultures (0,5-50 l)", *Methods Cell Biology* **57**:219-527 (1998); Hu W.S. in Aunins J.G., "Large-scale Mammalian Cell Culture", *Curr Opin Biotechnol* **8**:148-153 (1997); Konstantinov K.B., Tsai Y., Moles D., Matanguihan R., "Control of long-term perfusion Chinese hamster ovary cell culture by glucose auxostat," *Biotechnol Prog* **12**:100-109 (1996).

V eni izvedbi rekombinantnega postopka za proizvodnjo muteina v smislu izuma konstruiramo sekvenco DNA z izoliranjem ali sintetiziranjem sekvence DNA, ki kodira IL-2 divjega tipa, in nato s spreminjanjem kodona za Asp20 za kodon za izolevcin (I) s specifično mutagenozo. Ta tehnika je dobro znana. Npr., Mark et al., "Site-specific Mutagenesis Of The Human Fibroblast Interferon Gene", Proc. Natl. Acad. Sci. ZDA **81**, str. 5662-66 (1984) in US patent št. 4,588,585, vključeno tukaj z referenco.

Drug postopek za konstruiranje sekvence DNA, ki kodira IL-2-muteine v smislu izuma, bi bila kemična sinteza. To npr. vključuje direktno sintezo peptida s kemijskim načinom za proteinsko sekvenco, ki kodira IL-2-mutein, ki kaže lastnosti, opisane v predloženem izumu. S tem postopkom je možno vgraditi tako naravne kot tudi nenaravne amino kisline na mestih, ki vplivajo na interakcije IL-2 z IL-2R β ali IL-2R γ . Alternativno lahko gen, ki kodira želeni IL-2-mutein, sintetiziramo na kemičen način z uporabo oligonukleotidnega sintetizatorja. Taki oligonukleotidi so oblikovani na osnovi aminokislinske sekvence želenega IL-2-muteina in prednostnim izbiranjem tistih kodonov, ki so favorizirani v gostiteljski celici, v kateri bo rekombinantni mutein proizveden. Glede na to je jasno, da je genetski kod degeneriran - da je amino kislina lahko kodirana z več kot enim kodonom. Npr. Phe (F) je kodiran z dvema kodonoma TTC ali TTT, Tyr (Y) je kodiran s TAC ali TAT in his (H) je kodiran s CAC ali CAT,

Trp (W) je kodiran z enim kodonom TGG. V skladu s tem je treba upoštevati, da je za dano sekvenco DNA, ki kodira posebni IL-2-mutein, mnogo degeneriranih sekvenc DNA, ki kodirajo ta IL-2-mutein. Upoštevati je npr. treba, da je poleg prednostne sekvence DNA za mutein D20I, prikazano s SEQ ID NO:1, mnogo degeneriranih sekvenc DNA, ki kodirajo prikazani IL-2-mutein. Te degenerirane sekvence DNA so tudi v obsegu predloženega izuma. Tako izraz "njene degenerirane variante" v skladu s predloženim izumom pomeni vse sekvence DNA, ki kodirajo posebni mutein in tako omogočajo njegovo ekspresijo.

Sekvenca DNA, ki kodira IL-2-mutein v smislu izuma, bodisi pripravljena z usmerjeno mutagenozo, kemično sintezo ali z drugimi postopki, lahko vključuje tudi sekvence DNA, ki kodirajo signalno sekvenco ali pa ne. Taka signalna sekvenca, če je prisotna, naj bi bila tista, ki jo prepozna celica, izbrana za ekspresijo IL-2-muteina. Lahko je prokariotska, evkariotska ali kombinacija obeh. Lahko je tudi signalna sekvenca naravnega IL-2. Vključitev signalne sekvence je odvisna od tega, ali želimo izločiti IL-2-mutein iz rekombinantnih celic, v katerih je narejen. Če so izbrane celice prokariotske, je na splošno prednostno, da sekvenca DNA ne kodira signalne sekvence. Če pa so izbrane celice evkariotske, je na splošno prednostno, da je signalna sekvenca kodirana, in je najbolj prednostno, da uporabimo signalno sekvenco IL-2 divjega tipa.

Za sintezo gena, ki kodira IL-2-mutein v smislu izuma, lahko uporabimo standardne postopke. Popolno aminokislinsko sekvenco lahko npr. uporabimo za konstruiranje nazaj prevedenega (back-translated) gena. DNA-oligomer, ki vsebuje nukleotidno sekvenco, ki kodira IL-2-mutein, lahko tudi sintetiziramo. Različne majhne oligonukleotide, ki kodirajo za dele želenega polipeptida, lahko npr. sintetiziramo in nato ligiramo. Individualni oligonukleotidi značilno vsebujejo 5' ali 3' štrleče konce za komplementarno združevanje.

Po združitvi (s sintezo, usmerjeno mutagenozo ali drugim postopkom) sekvence DNA, ki kodirajo IL-2-muteine v smislu izuma, vključimo v ekspresijski vektor in

operativno vežemo na ekspresijsko kontrolno sekvenco, ustrezno z ekspresijo IL-2-muteina v želenem transformiranem gostitelju. Pravilno združitev lahko potrdimo z nukleotidnim sekvenciranjem, restrikcijskim mapiranjem in ekspresijo biološko aktivnega polipeptida v prikladnem gostitelju. Kot je dobro znano v tehniki, moramo zato, da dobimo visoke ekspresijske nivoje transfektiranega gena v gostitelju, gen operativno vezati na transkripcijske in translacijske ekspresijske kontrolne sekvence, ki so funkcionalne v izbranem ekspresijskem gostitelju.

Izbira ekspresijske kontrolne sekvence in ekspresijskega vektorja je odvisna od izbire gostitelja. Uporabimo lahko veliko variant kombinacij ekspresijskega gostitelja/vektorja. Uporabni ekspresijski vektorji za evkariotske gostitelje vključujejo npr. vektorje, ki obsegajo ekspresijske kontrolne sekvence iz SV40, govejega papiloma virusa, adenovirusa in citomegalovirusa. Uporabni ekspresijski vektorji za bakterijske gostitelje vključujejo znane bakterijske plazmide, kot npr. plazmide iz *E.coli*, vključno col E1, pCR1, pER32z, pMB9 in njihove derivate, plazmide razširjenega gostiteljskega območja, npr. RP4, DNA fagov, kot so npr. številni derivati faga lambda, npr. NM989 in druge fagne DNA, kot npr. M13 in filamentne enoverižne DNA fagov. Uporabni ekspresijski vektorji za kvasne celice vključujejo 2 µm plazmid in njegove derivate. Uporabni vektorji za insektne celice vključujejo pVL 941. Prednost dajemo pFastBacTM 1 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD). Cate et al., "Isolation Of The Bovine And Human Genes For Mullerian Inhibiting Substance And Expression Of The Human Gene In Animal Cells", Cell, 45, str. 685-98 (1986).

Poleg tega lahko uporabimo v teh vektorjih katerokoli iz široke izbire ekspresijskih kontrolnih sekvenc. Take uporabne ekspresijske kontrolne sekvence vključujejo ekspresijske kontrolne sekvence, povezane s strukturnimi geni predhodnih ekspresijskih vektorjev. Primeri za uporabne ekspresijske kontrolne sekvence vključujejo npr. zgodnje in pozne promotorje SV40 ali adenovirusa, sistem lac, sistem trp, sistem TAC ali TRC, glavne operatorske in promotorske regije faga lambda, npr. PL, kontrolne regije fd ovojnega proteina, promotor za 3-fosfoglicerat kinazo ali druge glikolitične encime, promotorje kislinske fosfataze, npr. PhoA, promotorje kvasnega

α -paritvenega sistema, polihedronski promotor Baculovirusa in druge sekvence, znane za kontrolo ekspresije genov prokariotskih ali evkariotskih celic ali njihovih virusov, in njihove različne kombinacije.

Kateregakoli prikladnega gostitelja lahko uporabimo, da proizvedemo IL-2-muteine v smislu izuma, vključno bakterije, glive (vključno kvasovke), rastlinske, insektne, sesalske ali druge ustrezne živalske celice ali celične linije kot tudi transgenske živali ali rastline. Bolj posebno lahko ti gostitelji vključujejo dobro znane evkariotske in prokariotske gostitelje, kot npr. seve *E.coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, glive, kvasovke, insektne celice, kot npr. *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*), živalske celice, kot npr. ovarijske celice kitajskega hrčka (celice CHO), in mišje celice, kot npr. NS/O, celice afriške zelene opice, kot npr. COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 in BNT 10, ter humane celice kot tudi rastlinske celice v tkivnih kulturah. Za ekspresijo živalskih celic dajemo prednost celicam CHO in COS 7 v kulturah in posebno CHO celični liniji CHO (DHFR-) ali HKB liniji.

Razumljivo je, da ne delujejo vsi vektorji in ekspresijske kontrolne sekvence enako dobro za eksprimiranje sekvenc DNA, opisanih tukaj. Niti ne delujejo vsi gostitelji enako dobro z enakim ekspresijskim sistemom. Vendar pa strokovnjaki lahko izberejo med temi vektorji, ekspresijskimi kontrolnimi sekvencami in gostitelji brez nepotrebnega eksperimentiranja. Pri izbiranju vektorja je treba npr. upoštevati gostitelja, ker se mora vektor replicirati v njem. Upoštevati je treba tudi vektorsko kopirno številko, sposobnost za kontroliranje te kopirne številke in ekspresijo katerihkoli drugih proteinov, ki jih kodira vektor, kot npr. antibiotične markerje. Prednostni vektorji za uporabo v predloženem izumu npr. vključujejo tiste, ki dopuščajo, da se DNA, ki kodira IL-2-muteine, pomnoži s kopirno številko. Taki vektorji, sposobni za pomnoževanje, so dobro znani v tehniki. Vključujejo npr. vektorje, ki so sposobni, da se pomnožijo z DHFR pomnoževanjem (npr. Kaufman, US patent 4,470,461, Kaufman and Sharp, "Construction Of A Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis Of Signals Utilized For Efficient Expression", Mol.

Cell. Biol., 2, str. 1304-19 (1982)), ali glutamin sintetaznim ("GS") pomnoževanjem (npr. US patent 5,122,464) in evropska objavljena prijava 338,841).

Pri izbiri ekspresijske kontrolne sekvence je prav tako treba upoštevati številne faktorje. Le-ti vključujejo npr. relativno jakost sekvence, njeno sposobnost, da jo je možno kontrolirati, in njeno kompatibilnost z dejansko sekvenco DNA, ki kodira IL-2-mutein v smislu izuma, posebno glede potencialnih sekundarnih struktur. Gostitelje naj bi izbrali tako, da bi upoštevali njihove kompatibilnosti z izbranim vektorjem, toksičnost produkta, kodiranega s sekvencami DNA v smislu izuma, in njihove lastnosti za izločanje, njihovo sposobnost, da pravilno zvijejo polipeptide, zahteve za njihovo fermentacijo ali kultiviranje in enostavnost čiščenja produktov, kodiranih z sekvencami DNA.

V okviru teh parametrov lahko strokovnjak izbere različne kombinacije vektorja/ekspresijske kontrolne sekvence/gostitelja, ki izražajo želene sekvence DNA na fermentacijskih kulturah ali živalskih kulturah v večjem obsegu, npr. z uporabo celic CHO ali celic COS 7.

IL-2-muteini, dobljeni v skladu s predloženim izumom, so lahko glikozilirani ali neglikozilirani, odvisno od gostiteljskega organizma, uporabljenega za proizvodnjo muteina. Če izberemo bakterije kot gostitelja, potem bo proizvedeni IL-2-mutein neglikoziliran. Eukariotske celice po drugi strani glikozilirajo IL-2-muteine, čeprav verjetno ne na enak način, kot je glikoliziran naravni IL-2. IL-2-mutein, proizveden s transformiranim gostiteljem, lahko očistimo s katerikoli prikladnim postopkom. Znani so različni postopki za čiščenje IL-2. Npr., *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, izd.: John E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploehg, David W. Speicher, Paul T. Wingfield, Unit 6.5 (Copyright 1997, John Wiley and Sons, Inc). Za nas je prednostno ponovno zvitje iz inkluzijskih telesc, proizvedenih v *E. coli*, ali iz kondicioniranega medija bodisi iz kultur sesalcev ali kvasovk, pri čemer proizvedemo dani mutein z uporabo kationske izmenjave, gelske filtracije in/ali tekočinske

kromatografije z reverzno fazo. Glej Primera 1 (*E. coli*) in 10 (CHO-celična perfuzija) spodaj.

Biološko aktivnost IL-2-muteinov v smislu izuma lahko preizkusimo s katerimkoli prikladnim postopkom, znanim v tehniki. Taki preizkusi vključujejo PHA-blastno proliferacijo in NK-celično proliferacijo. Muteine z ustrezno aktivnostjo tj. popolnoma aktivne na IL-2R $\alpha\beta\gamma$ in z zmanjšano aktivnostjo na celicah, ki nosijo IL-2R $\beta\gamma$, potrdimo z uporabo obeh preizkusov. "Relativno aktivnost" muteina izmerimo glede na IL-2 divjega tipa in kot je opisano nadalje v Primerih, in je razmerje aktivnosti PHA-blastne proliferacije proti NK-celični proliferaciji.

IL-2-mutein v smislu izuma damo v dozi, ki je približno enaka ali večja, kot tista, uporabljena pri terapiji z naravnim ali rekombinantnim IL-2 divjega tipa. Prednostno damo učinkovito količino IL-2-muteina. "Učinkovita količina" pomeni količino, ki je sposobna, da prepreči ali zmanjša resnost ali razširjanje stanja ali indikacije, ki jo zdravimo. Strokovnjakom je jasno, da je učinkovita količina IL-2-muteina med drugim odvisna tudi od bolezni, doze, urnika dajanja IL-2-muteina, ali dajemo IL-2-mutein sam ali skupaj z drugimi terapevtskimi sredstvi, serumske razpolovne dobe sestavka in splošnega zdravja pacienta.

IL-2-mutein prednostno damo v sestavku, ki vključuje farmacevtsko sprejemljiv nosilec. "Farmacevtsko sprejemljiv nosilec" pomeni nosilec, ki ne povzroča neugodnega učinka pri pacientih, katerim ga dajemo. Taki farmacevtsko sprejemljivi nosilci so dobro znani v tehniki. Za nas je prednosten 2 % HSA/PBS pri pH 7.0.

IL-2-muteine v smislu izuma lahko formuliramo v farmacevtske sestavke po dobro znanih postopkih. Prikladne formulacije opisuje npr. Remington's Pharmaceutical Science od E.W. Martina, vključeno tukaj z referenco. Farmacevtski sestavek IL-2-muteina lahko formuliramo v različnih oblikah, ki vključujejo tekočino, gel, liofilizirano ali katerikoli drugo prikladno obliko. Prednostna oblika je odvisna od posebnega stanja, ki ga je treba zdraviti in je strokovnjakom jasna.

IL-2-muteinski farmacevtski sestavek lahko damo oralno z aerosolom, intravenozno, intramuskularno, intraperitonealno, intradermalno ali subkutano, ali na kakršenkoli drug sprejemljiv način. Prednosten način dajanja je odvisen od posebnega stanja, ki ga je treba zdraviti in je strokovnjakom jasen. Farmacevtski sestavek IL-2-muteina lahko damo skupaj z drugimi terapevtskimi sredstvi. Ta sredstva so lahko vgrajena kot del istega farmacevtskega sestavka ali jih damo ločeno od IL-2-muteina, bodisi istočasno ali v skladu s katerimkoli drugim sprejemljivim urnikom za zdravljenje. Poleg tega lahko IL-2-muteinski farmacevtski sestavek uporabimo kot dodatek drugim terapijam.

Tako predloženi izum zagotavlja sestavke in postopke za zdravljenje HIV, raka, avtoimunske bolezni, infekcijske bolezni, vakcinskega adjuvansa pri rakavi vakcini in pri konvencionalni vakcinski terapiji za imunske stimulacije pri odraslih ali sicer imunokompromitiranih posameznikih kot tudi pri humanih SCID-pacientih ali drugih terapevtskih aplikacijah, ki zahtevajo splošno stimulacijo imunskega sistema pri kateremkoli prikladnem bitju, prednostno sesalcu, najbolj prednostno človeku. Kot je že bilo navedeno v stanju tehnike, ima IL-2 mnogo učinkov. Nekateri od njih so stimulacija PHA-blastov, mirujočih celic T, celic B, monocitov in celic NK itd.; muteini, opisani tukaj, bodo imeli aktivnosti na celičnih tipih, ki izražajo le visoko-afinitetni IL-2-receptor, kot so npr. mirujoče celice T, ne pa intermediatnoafinitetni IL-2-receptor, kot so npr. celice NK ali monociti.

Pregledana je bila tudi uporaba sekvenc DNA, ki kodirajo IL-2-muteine v smislu izuma, pri aplikacijah genske terapije. Pregledane aplikacije genske terapije vključujejo zdravljenje tistih boleznih, pri katerih se za IL-2 pričakuje, da bo zagotovil učinkovito terapijo zaradi svoje T-celične aktivnosti, npr. bolezni, kot so: HIV, rak, avtoimunska bolezen, infekcijska bolezen, vakcinski adjuvans pri rakavi vakcini in konvencionalna vakcinska terapija, za imunostimulacijo pri odraslih ali sicer imunokompromitiranih kot tudi pri humanih SCID-pacientih in bolezni, ki se sicer odzivajo na IL-2 ali infekcijska sredstva, občutljiva na imunske odzive, posredovane z IL-2.

Lokalno dajanje IL-2-muteinov z uporabo genske terapije lahko zagotovi terapevtsko sredstvo za ciljno področje. Obe metodologiji genske terapije tako *in vitro* kot tudi *in vivo* sta bili pregledani. Znani so različni postopki za prenašanje potencialnih terapevtskih genov na definirane celične populacije. Npr., *Mulligan*, "The Basic Science Of Gene Therapy", Science, 260: 926-31 (1993). Ti postopki vključujejo:

1) Direktni genski prenos. Npr., *Wolff et al.*, "Direct Gene transfer Into Mouse Muscle In Vivo", Science, 247: 1465-68 (1990);

2) Prenos DNA, posredovan z liposomi. Npr. *Caplen et al.*, "Liposome-mediated CFTR Gene Transfer To The Nasal Epithelium Of Patients With Cystic Fibrosis", Nature Med., 3: 39-46 (1995); *Crystal*, "The Gene As A Drug", Nature Med. 1:15-17 (1995); *Gao and Huang*, "A Novel Cationic Liposome Reagent For Efficient Transfection Of Mammalian Cells", Biochem. Biophys. Res. Comm., 179:280-85 (1991);

3) Prenos DNA, posredovan z retrovirusi. Npr., *Kay et al.*, "In Vivo Gene Therapy Of Hemophilia B: Sustained Partial Correction In Factor IX-Deficient Dogs", Science, 262: 117-19 (1993); *Anderson*, "Human Gene Therapy", Science, 256:808-13 (1992).

4) Prenos DNA, posredovan z virusom DNA. Taki virusi DNA vključujejo adenoviruse (prednostno vektorje na osnovi Ad-2 ali Ad-5), viruse herpes (prednostno vektorje na osnovi virusa herpes simpleks) in parvoviruse (prednostno vektorje na osnovi "defektivnega" ali neavtonomnega parvovirusa, bolj prednostno vektorje na osnovi virusa, povezanega z adeno, najbolj prednostno vektorje na osnovi AAV-2). Npr., *Ali et al.*, "The Use Of DNA Viruses As Vectors For Gene Therapy", Gene Therapy, 1:367-84 (1994); US patent 4,797,368, vključeno tukaj z referenco, in US patent št. 5,139,941, vključeno tukaj z referenco.

Izbira posebnega vektorskega sistema za prenos gena, ki nas zanima, je odvisna od različnih faktorjev. En pomemben faktor je narava ciljne celične populacije. Čeprav so obširno študirali retrovirusne vektorje in jih uporabljali pri številnih aplikacijah genske

terapije, pa so ti vektorji na splošno neprikladni za infektiranje nedeljivih celic. Poleg tega imajo retrovirusi potencial za onkogeniciteto.

Adenovirusi imajo prednost, da imajo široko gostiteljsko področje, lahko inficirajo mirne ali terminalno diferencirane celice, kot npr. nevrone ali hepatocyte, in se zdijo v bistvu neonkogeni. Npr., *Ali et al.*, zgoraj, str. 367. Adenovirusi se očitno ne integrirajo v gostiteljski genom. Ker obstajajo ekstrakromosomalno, je tveganje za insercijsko mutagenozo močno zmanjšano. *Ali et al.*, zgoraj, str. 373.

Adeno-asociirani virusi kažejo podobne prednosti kot vektorji, ki temeljijo na adenovirusu. Vendar pa AAV kažejo usmerjeno integracijo na humanem kromosomu 19. *Ali et al.*, zgoraj, str. 377.

V prednostni izvedbi uporabimo IL-2-mutein kodirajočo DNA v smislu izuma v genski terapiji za bolezni imunske pomanjkljivosti, kot je npr. HIV; pri infekcijskih boleznih, kot npr. pri tuberkulozi; in pri raku, kot npr. renalnem karcinomu.

V skladu s to izvedbo zagotovimo gensko terapijo z DNA, ki kodira IL-2-muteine v smislu izuma, za pacienta, ki to potrebuje, istočasno z diagnozo ali takoj po njej.

Ta način je ugoden zaradi selektivne aktivnosti IL-2-muteinov v smislu izuma, da preprečimo neželjeno toksičnost in stranske učinke. Strokovnjakom bo jasno, da lahko v skladu s to izvedbo uporabimo katerikoli prikladen vektor za gensko terapijo, ki vsebuje DNA IL-2-muteina. Tehnike za konstruiranje takega vektorja so znane. Npr., Anderson W.F., Human Gene Therapy, *Nature*, 392 25-30 (1998); Verma I.M. in Somia N., Gene Therapy - Promises, Problems, and Prospects, *Nature*, 389 239-242 (1998). Vektor, ki vsebuje DNA IL-2-muteina, lahko uvedemo na ciljno mesto z znanimi tehnikami.

Za boljše razumevanje predloženega izuma so navedeni spodnji Primeri. Le-ti so namenjeni le za ponazarjanje in na noben način niso oblikovani za omejevanje obsega izuma. Vse objave, omenjene tukaj, so vključene z referenco v njihovi celoti.

C. PRIMERI

Primer 1. Proizvajanje muteinov v *E. coli*

Muteine smo proizvedli z usmerjeno mutagenezo z uporabo primerjev, ki vsebujejo kodone, ki ustrezajo želeni mutaciji, v bistvu tako kot opisujejo: Kunkel TA, Roberts JD, in Zakour RA, "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" (1987), *Methods Enzymol* 154: 367-382. Na kratko, humano IL-2 cDNA, ki vsebuje restrikcijska encimska mesta *Bam* HI in *Xba* I smo subklonirali v M13 fagni vektor M13 mp19 (New England Biolabs, Beverly, MA) z uporabo enakih mest. cDNA IL-2 divjega tipa smo dobili z uporabo verižne reakcije s polimerazo ("PCR") iz cDNA poola, proizvedenega iz mRNA, izolirane iz limfocitov humane periferne krvi, induciranih 24 ur s forbol 12-miristat 13-acetatom (10 ng/ml). PCR-primer, uporabljen za 5' konec IL-2 odprtega bralnega okvirja, je bil:

5'-CCT CAA CTC CTG AAT TCA TGT ACA GGA TGC -3' (SEQ ID št.: 3);

in za 3' konec IL-2 odprtega bralnega okvirja:

5' -GGA AGC GGA TCC TTA TCA AGT CAG TGT TGA G -3' (SEQ ID št.: 4).

Restrikcijska encimska mesta *Eco* RI (5'-konec in *Bam* HI (3'-konec) smo vgradili v vsak oligonukleotid in označili s kurzivo. Pogoji, uporabljeni za PCR so bili: 1 minuta pri 94 °C, 1 minuta pri 58,7 °C in 1 minuta pri 72 °C za 25 ciklov. Tako dobljeno pravilno IL-2 cDNA sekvenco smo potrdili s sekvenciranjem z uporabo kompleta za sekvenciranje Sequenaze® (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL) po

predpisih izdelovalca. Enoverižno DNA, ki vsebujejo uracil (U-DNA), smo dobili s transformiranjem *E. coli* seva CJ236 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) z M13 mp19, vsebujočim IL-2 cDNA. Usmerjeno mutagenezo smo uporabili v splošnih primerjih, ki vsebujejo 15 nukleotidov homologno za šablonsko U-DNA 5' za kodon(e), ciljan(e) za mutagenezo, nukleotide, ki vgradijo želeno spremembo, in dodatnih 10 nukleotidov homologno za šablonsko U-DNA 3' za zadnji spremenjeni nukleotid. Na začetku smo uporabili usmerjeno mutagenezo za uvedbo *Nco* I restrikcijskega mesta na začetek zrele sekvence humanega IL-2. Uporaba tega restrikcijskega mesta vgradi N-terminalni metioninski ostanek, ki bo usmeril ekspresijo v citoplazemski prostor *E.coli* z uporabo npr. ekspresijskega vektorja pET3d. Za ta namen uporabljeni primer je bil:

5' -GCA CTT GTC ACA AAC ACC ATG GCA CCT ACT TCA AGT-3' (SEQ ID št.: 5)

Specifični primerji, uporabljeni za vgradnjo mutacij na mesta D20, N88 in Q126, so bili:

D20X: 5' -GGA GCA TTT ACT GCT GNN NTT ACA GAT G-3' (SEQ ID št. 6)

N88X: 5' -GGG ACT TAA TCA GCN NNA TCA ACG TAA TAG-3' (SEQ ID št.7)

Q126X: 5' -GGA TTA CCT TTT GTN NNA GCA TCA TCT C-3' (SEQ ID št.8),

kjer je bil NNN nadomeščen z ustreznim kodonom za histidin (CAC) ali izolevcin (ATC) (na mestu D20), arginin (CGT), glicin (GGT) ali izolevcin (ATC) (na mestu N88), ali levcin (CTG) (na mestu Q126). Pri drugih mutacijah je bila uporabljena podobna strategija in ustrezen kodon z dano mutacijo. Primerje smo fosforilirali z uporabo T4 polinukleotid kinaze (Biolabs New England, Beverly, MA) po predpisih proizvajalca. Po prileganju primerja na šablonsko U-DNA in ekstenziji s T7 DNA polimerazo (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) smo celice *E.coli* seva DH5 α TM (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) transformirali s 5 μ l reakcijske zmesi in zasadili v medij LB, ki vsebuje agar (0,7 %). Po inkubaciji pri 37 °C smo plake ekspandirali s

pobiranjem posameznega plaka in prenašanjem v 2 ml medija LB in jih pustili, da so rastle preko noči pri 37 °C. Enoverižno DNA smo izolirali z uporabo čistilnega kompleta M13 (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA) po navodilih proizvajalca, klone, ki so vsebovali želeno mutacijo pa smo identificirali s sekvenciranjem enoverižne DNA z uporabo sekvencirnega kompleta Sequenaze® (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL) po navodilih proizvajalca. cDNA IL-2-muteina iz replikativne oblike DNA, ki ustreza plakom, ki vsebujejo pravilno mutirano sekvenco, smo izolirali z uporabo *Nco* I in *Xba* I in subklonirali na plazmidni vektor pET3a (Stratagene, San Diego, CA) (Strat). *E. coli* sev BL21 smo transformirali z muteinom, ki vsebuje vektor pET3a in le-to pustili, da je zraslo do ABS₂₈₀ med 0,60 in 1,0, medtem časom pa smo dodali IPTG (0,4 mM) za induciranje produkcije IL-2-muteina.

Primer 2.

Ekstrakcija in čiščenje IL-2-muteinov iz *E. coli*

Tri ure po indukciji smo celice zbrali s centrifugiranjem pri 10000 g. Rekombinantne IL-2-muteine smo renaturirali in očistili najprej z dispergiranjem celic v 10 volumnih (vol./mokra masa): saharoze/Tris/EDTA pufra (0,375M saharoza, 10mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM EDTA). Dispergirane celice smo izpostavili sonikaciji 3-krat pri 300 W s 30 sekundnimi mirujočimi intervali v ledeni kopeli z uporabo sonikatorja Missonix, model XL2020, opremljenega s 2,54 cm standardno sondo. Material, obdelan s sonikacijo, smo centrifugirali pri 17000 g 20 minut pri 4 °C. Pelet, ki naj bi bil bele barve v tem času, smo izprali z resuspendiranjem in centrifugiranjem enkrat s saharozo/Tris/EDTA pufrom, dvakrat s Tris/EDTA pufrom (50mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM EDTA), končno pa smo ga resuspendirali v 10 vol. 0,1 M Tris/HCl pufra, pH 8,0 (vzorec smo vzeli v tej točki za gelno analizo) in centrifugirali 20 minut pri 17000 g.

Pelet smo raztopili z dodajanjem 3 volumnov 8 M gvanidinijevega klorida v 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0) in 2-merkaptetanolu (0,1 %, vol./vol.). Po inkubaciji 2 uri pri sobni temperaturi smo vzorce centrifugirali 20 minut pri 17000 g. Dobljeno raztopino

smo dializirali približno 20 ur proti 20 volumnom 10mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA pri 4 °C. Raztopino smo centrifugirali pri 17000 g 20 minut, naravnali na 0,1 % trifluoroocetno kislino in filtrali na 0,22 µm filtrski enoti. Raztopino smo takoj prenesli v silikonizirano steklenico in z njo napolnili kolono C8 (Vydac 208TP54). IL-2-muteine smo očistili z uporabo 20 minutnega linearnega gradienta z uporabo 45-85 % acetonitrila v 0,1 % TFA. Koncentracijo eluiranega proteina smo določili z A280 in aminokislinsko analizo. Protein smo nato v alikvotih (100 ml) odmerili v silikonizirane cevi in shranili pri -20 °C. Tako očiščen protein ima značilno enojno progo, kot smo opazili z SDS-PAGE (barvanje s srebrom), kvantitativno pa smo ga določili z aminokislinsko analizo (natančnost značilno >90 %).

Primer 3.

Preizkus T-celične proliferacije

Mononuklearne celice periferne krvi (PBMC) smo izolirali iz približno 100 ml normalne človeške krvi (Irwin Memorial Blood Bank, San Francisco, CA), razredčene 1:2 v hladni Dulbeccovi fiziološki raztopini soli s fosfatnim pufrom (brez Ca^{2+} in Mg^{2+} ; DPBS). Ficoll-Paque (Pharmacia) smo dali za osnovo in vzorec centrifugirali za izoliranje PBMC, nato pa smo ga intenzivno izprali v hladnem DPBS. PHA-blaste (aktivirane celice T) smo proizvedli z resuspendiranjem celic v RPMI 1640, ki vsebuje fetalni goveji serum (10 %) (Hyclone), kateremu smo dodali 1 % (mas./vol.) vsake od naslednjih sestavin: L-glutamin; neesencialne amino kisline; natrijev piruvat in antibiotik-antimikotik (RPMI-mediji) z gostoto 1×10^6 celic/ml. Dodali smo fitohemaglutinin (PHA-P; Sigma) v končni koncentraciji 10 µg/ml in celice inkubirali pri 37 °C, 5 % CO_2 3 dni. Celice smo zbrali in izprali 2-krat v DPBS, resuspendirali v RPMI medijih in zasadili na ploščice z ravnim dnom s 96 vdolbinami z gostoto 1×10^5 celic/vdolbino v 200 µl s spreminjajočimi koncentracijami IL-2 ali muteina v RPMI-medijih. Ploščice smo inkubirali 48 ur pri 37 °C, pulzirali z 1 µCi ^3H -timidina (DuPont NEN[®], Boston, MA)/vdolbino 6 ur, zbrali in izmerili radioaktivnost potem, ko smo zbrali celice na filterjih iz steklenih vlaken.

Primer 4.

Preizkus NK-celične proliferacije

Mononuklearne celice periferne krvi (PBMC) smo izolirali iz približno 100 ml normalne človeške krvi (Irwin Memorial Blood Bank, San Francisco, CA), razredčene 1:2 v hladni Dulbeccovi fiziološki raztopini soli s fosfatnim pufrom (brez Ca^{2+} in Mg^{2+} ; DPBS). Ficoll-Paque (Pharmacia) smo dali za osnovo in vzorec centrifugirali za izoliranje PBMC, nato pa smo ga intenzivno izprali v hladnem DPBS. Celice NK smo ločili od drugih celic. Miltenyi Biotec NK-celični izolacijski komplet (Bergisch Gladbach, Nemčija; kat.#465-01) je prednosten za te namene. Komplet je sestavljen iz dveh reagentov, ločenih kolon in zelo močne magnetne podpore za kolono. Prvi reagent je koktajl monoklonskih CD3, CD4, CD19, CD33 protiteles mišjega IgG1 izotipa, konjugiranih s haptenom. To je za to, da iz PMBC izčrpamo celice T, celice B in mieloidne celice. Ugotovili smo, da lahko uporabimo katerikoli prikladen niz protiteles, ki prepoznajo te celične tipe. Drugi reagent je sestavljen iz koloidnih superparamagnetnih MAC-mikrobiserov, konjugiranih na anti-haptensko protitelo. Celice smo resuspendirali v PBS z govejim serumskim albuminom (0,5 %) in 2mM EDTA (PBS/EDTA). Volumen suspenzije je odvisen od število uporabljenih celic in je zagotovljen po načrtu od Miltenyi Biotec. Značilno smo celice s številom od 2 do 5 x 10⁸ PBMC resuspendirali v 800 µl pufru, nato pa smo uporabili 200 µl vsakega od reagentov. Po inkubaciji z reagenti smo dali celice v kolono (resuspendirane v 2 ml pufru). Ne-NK-celice se adherirajo na magnet (izčrpano), NK-celice pa smo izolirali in zbrali pri pretoku skozi kolono. Celice smo izprali, resuspendirali v RPMI-medijih (vsebnosti: RPMI 1640, kateremu je dodan 1 % vsakega od naslednjih reagentov: L-glutamin; neesencialne aminokisline; natrijev piruvat; antibiotik/antimikotik (vse od Gibco/BRL, Gaithersburg, MD); fetalni goveji serum (10 %) (Hyclone) in zasadili na ploščice z ravnim dnom s 96 vdolbinami z gostoto 1x10⁵ celic/vdolbino v 200 µl. Celice smo zbrali in sprali 2-krat v DPBS, resuspendirali v RPMI-medijih in zasadili na ploščice z ravnim dnom s 96 vdolbinami z gostoto 1x10⁵ celic/vdolbino v 200 µl z različnim koncentracijami IL-2 ali muteina v RPMI-medijih. Ploščice smo inkubirali 48 ur pri 37 °C, pulzirali z 1 µCi ³H-timidina (DuPont NEN®, Boston, MA)/vdolbino

6 ur, zbrali in izmerili radioaktivnost potem, ko smo zbrali celice na filtrih iz steklenih vlaken.

Primer 5.

Muteini, ki selektivno aktivirajo celice T pred celicami NK

Muteine smo proizvedli z uporabo usmerjene mutageneze (Kunkel et al (1987), *Methods Enzymol* 154: 367-382) na mestih Asp-20, Asp-84, Asn-88 in Gln-126, ter eksprimirali v *E.coli* z uporabo pET-3a ekspresijskega sistema po opisu izdelovalca (Stratagene). Muteine smo očistili z rekuperiranjem inkluzijskih telesc v gvanidinu-HCl, ponovno zvili in kromatografirali z uporabo HPLC, kot je opisano pred tem. Dobljeni protein ima >95 % čistočo pri SDS-PAGE z barvanjem s srebrom in smo ga analizirali za koncentracijo in čistočo z aminokislinsko analizo (AAA natančnost značilno >90 %). Muteinom z ustrežno aktivnostjo smo potrdili sekvenco z masno spektrometrično analizo. Tako očiščene muteine smo preizkusili s T- in NK-celičnima preizkusoma, opisanima pred tem. Relativne aktivnosti za IL-2-muteine ter T- in NK- celične preizkuse so navedeni v tabeli 1.

Tabela 1 - Muteini, ocenjeni za T-celično selektivno aktivnost

	relativna aktivnost	relativna aktivnost	
Mutein	celica T vs. celica NK	celica T	celica NK
wt IL-2	1	1,00000	1,00000
D20 muteini			
D20A	5	0,00024	0,00005
D20H	3900	0,37081	0,00009
D20I	7600	4,59635	0,00061
D20K	330	0,06301	0,00019
D20L	100	0,00063	0,00001

D20M	490	0,05372	0,00011
D20N	160	0,03000	0,00019
D20Q	100	0,03180	0,00032
D20R	33	0,00018	0,00001
D20S	170	0,06640	0,00038
D20T	1	1,00000	1,00000
D20V	10	0,00093	0,00009
D20Y	1000	0,06587	0,00007
N88 muteini			
N88A	50	0,50000	0,01
N88E	10	0,01172	0,00115
N88F	22	0,02222	0,001
N88G	980	8,33333	0,00853
N88H	3	0,00100	0,001
N88I	9600	0,98074	0,00010
N88K	3	0,00010	0,00032
N88L	4	0,00400	0,001
N88M	250	0,25000	0,001
N88R	6200	0,89730	0,00015
N88S	80	0,00200	0,16000
N88T	395	0,50000	0,001266
N88V	67	0,06670	0,001
N88W	1	0,00100	0,001
N88Y	8	0,00800	0,001
Q126 muteini			
Q126A	0,30	0,01743	0,05809
Q126D	240	0,14630	0,00061
Q126E	400	10,0000	0,02500
Q126F	32	0,87358	0,02749
Q126G	100	0,55556	0,00556

Q126H	0,03	0,02216	0,73875
Q126I	33	0,00100	0,00003
Q126K	1,0	1,00000	1,00000
Q126L	680	3,06186	0,00447
Q126M	9,1	19,94092	2,19298
Q126N	10	6,57895	0,64993
Q126P	3,0	0,00032	0,00011
Q126R	11	4,02695	0,36392
Q126S	33	0,03417	0,00103
Q126T	3,3	0,00010	0,00003
Q126V	330	1,00556	0,00302
Q126W	1,0	0,20000	0,20000
Q126Y	10	0,88500	0,08850

Aktivnosti muteinov so opisane z relativno koncentracijo muteina, potrebno, da daje 50 % maksimalni odziv (EC_{50}) v primerjavi z EC_{50} za wt IL-2 v enakem preizkusu; v primeru več preizkusov na istem muteinu je navedeno geometrično povprečje vrednosti. Vrednosti EC_{50} za wt IL-2 so v območju med ~10 pM in 150 pM pri T-celičnem preizkusu in ~50 pM in ~200 pM pri NK-celičnem preizkusu. Razmerje T-celične aktivnosti vs. NK-celični aktivnosti muteinov je izraženo kot relativna aktivnost muteina na celicah T, deljena z relativno aktivnostjo muteina na celicah NK. To razmerje je določeno za vsak mutein z uporabo le tiste aktivnosti, ki je bila določena pri danih T- in NK-celičnih preizkusih z uporabo celic od posameznega donorja.

Muteinske aktivnosti lahko razvrstimo v šest širokih kategorij: 1) 1000-kratna T-celična selektivnost; 2) 100- vendar <1000-kratna T-celična selektivnost; 3) 10- vendar <100-kratna T-celična selektivnost; 4) izboljšana aktivnost glede na IL-2 na celicah T; 5) NK-celična selektivnost; 6) 10-kratna selektivnost bodisi za celice T ali NK.

Razred 1: D20H, I in Y; N88G, I in R.

Razred 2: D20K, L, M, N, Q in S; N88M in T; Q126D, E, G, L in V.

Razred 3: D20R; N88A, E, F, S in V; Q126F, I, N, R in S.

Razred 4: D20I; N88G; Q126E, L, M, N in R.

Razred 5: Q126A, H.

Razred 6: D20A, T in V; N88H, K, L, W in Y; Q126K, P, T, W in Y.

V razredih 1-3 so prednostni muteini tisti, ki imajo aktivnost na celicah T, ki je blizu tisti za wt IL-2 ali boljša. V razredu 1 bi to vključevalo: D20H in I; N88G, I in R; v razredu 2 to vključuje: N88M in T, Q126D, E, G, L in V; v razredu 3 to vključuje: N88A, Q126F in G. Za muteine v razredu 4 predvidevamo, da imajo večjo zmogljivost kot wt IL-2 *in vivo*.

Iz tabele 1 je razvidno, da nobena posamezna mutacija ni povzročila inaktivnega IL-2-muteina pri obeh preizkusih. Vendar pa lahko sklepamo, da bi kombinacija mutacije, katere rezultat je hudo kompromitirana aktivnost z dveh različnih položajev, potencialno imela za rezultat antagonistično IL-2-aktivnost na celicah T ali drugih tipih celic, ki nosijo visokoafinitetni IL-2-receptor. Takega antagonista napovedujejo ti podatki, ker so bile mutacije oblikovane le za spremembo interakcij z IL-2R β in IL-2R γ . Tak primer bi bil dvojni mutein D20R/Q126T. Za kombinacijo šibko aktivnih mutacij v eni molekuli predvidevamo, da je kombinatorna po naravi, to je D20R ima 0,00018 aktivnosti na celicah T, Q126T 0,0001 aktivnosti na celicah T, za dvojni mutein D20R/Q126T bi pričakovali, da ima 0,000000018 aktivnosti wt IL-2 na celicah T. Iz zagotovljenih podatkov lahko izvedemo tudi druge kombinacije.

Primer 6.

Biološka aktivnost wt IL-2 in IL-2-muteinov

Fig. 1 do 7 prikazujejo krivulje za odziv na dozo za wt humani IL-2 (IL-2) in D20H (Fig. 1), IL-2 in D20I (Fig. 2), IL-2 in N88G (Fig. 3), IL-2 in N88I (Fig. 4), IL-2 in N88R (Fig. 5), IL-2 in Q126E (Fig. 6) ter IL-2 in Q126L (Fig. 7). A: individualni

odziv na dozo za IL-2 (polni krogci) in mutein (prazni krogci) pri primarnem humanem T-celičnem proliferacijskem preizkusu (PHA-blasti). B: individualni odziv na dozo za IL-2 (polni trikotniki) in mutein (prazni trikotniki) pri primarnem humanem NK-celičnem proliferacijskem preizkusu.

Podrobno v zvezi s Fig. 1 pa je za prikazani eksperiment doza wt IL-2, ki daje 50 % maksimalno proliferacijo (EC_{50}), $\sim 1,5 \cdot 10^{-10}$ M za T-celični (A) in $\sim 1 \cdot 10^{-10}$ M za NK-celični (B) preizkus. EC_{50} za D20H je $\sim 2 \cdot 10^{-10}$ M pri tem T-celičnem preizkusu, vendar pa je ocenjeno, da naj bi bil $> 1 \cdot 10^{-5}$ M pri tem NK-celičnem preizkusu. Čista izboljšava T-celične aktivnosti D20H pred NK-celično aktivnostjo je tako > 50000 -kratna, kot je bilo določeno pri tem preizkusu. Podobne rezultate smo dobili s krvjo iz dodatnih donorjev (podatki niso prikazani).

Podrobno v zvezi s Fig. 2 pa je za prikazani eksperiment doza wt IL-2, ki daje 50 % maksimalno proliferacijo (EC_{50}), $\sim 1,5 \cdot 10^{-10}$ M za T-celični (A) in $\sim 3 \cdot 10^{-10}$ M za NK-celični (B) preizkus. EC_{50} za D20I je tudi $\sim 1,5 \cdot 10^{-10}$ M pri tem T-celičnem preizkusu, vendar je ocenjeno, da bi bila le $\sim 5 \cdot 10^{-6}$ M pri tem NK-celičnem preizkusu. Čista izboljšava T-celične aktivnosti D20I pred NK-celično aktivnostjo je tako ~ 16000 -kratna, kot je bilo določeno pri tem preizkusu. Podobne rezultate smo dobili s krvjo od dodatnih donorjev (podatki niso prikazani).

Podrobno v zvezi s Fig. 3 pa je za prikazani eksperiment doza wt IL-2, ki daje 50 % maksimalno proliferacijo (EC_{50}), $\sim 4 \cdot 10^{-11}$ M za T-celični (A) in $\sim 2 \cdot 10^{-10}$ M za NK-celični (B) preizkus. EC_{50} za N88G je $\sim 5 \cdot 10^{-12}$ M pri tem T-celičnem preiskusu, vendar pa je bilo ocenjeno, da bi bila le $\sim 3 \cdot 10^{-8}$ M pri tem NK-celičnem preiskusu. Čista izboljšava T-celične aktivnosti N88G pred NK-celično aktivnostjo je tako ~ 1200 -kratna, kot je bilo določeno pri tem preizkusu. Podobne rezultate smo dobili s krvjo od dodatnih donorjev (podatki niso prikazani).

Podrobno v zvezi s Fig. 4 pa je za prikazani eksperiment doza wt IL-2, ki daje 50 % maksimalno proliferacijo (EC_{50}), $\sim 1,5 \cdot 10^{-10}$ M za T-celični (A) in $\sim 1 \cdot 10^{-10}$ M za NK-

celični (B) preizkus. EC_{50} za N88I je $\sim 4 \cdot 10^{-10}$ M pri tem T-celičnem preizkusu, vendar pa je ocenjeno, da bi bila le $\sim 5 \cdot 10^{-6}$ M pri tem NK-celičnem preizkusu. Čista izboljšava T-celične aktivnosti na N88I pred NK-celično aktivnostjo je tako ~ 18000 -kratna, kot je bilo določeno pri tem preizkusu. Podobne rezultate smo dobili s krvjo dodatnih donorjev (podatki niso prikazani).

Podrobno v zvezi s Fig. 5 pa je za prikazani eksperiment doza wt IL-2, ki daje 50 % maksimalno proliferacijo (EC_{50}), $\sim 1,5 \cdot 10^{-10}$ M za T-celični (A) in $\sim 1 \cdot 10^{-10}$ M za NK-celični (B) preizkus. EC_{50} za N88R je $\sim 9 \cdot 10^{-11}$ M pri tem T-celičnem preizkusu, vendar pa je ocenjeno, da bi bila le $\sim 3 \cdot 10^{-7}$ M pri tem NK-celičnem preizkusu. Čista izboljšava T-celične aktivnosti N88I pred NK-celično aktivnostjo je tako ~ 5000 -kratna, kot je bilo določeno pri tem preizkusu. Podobne rezultate smo dobili s krvjo dodatnih donorjev (podatki niso prikazani).

Podrobno v zvezi s Fig. 6 pa je za prikazani eksperiment doza wt IL-2, ki daje 50 % maksimalno proliferacijo (EC_{50}), $\sim 8 \cdot 10^{-12}$ M za T-celični (A) in $\sim 5 \cdot 10^{-11}$ M za NK-celični (B) preizkus. EC_{50} za Q126E je $\sim 8 \cdot 10^{-13}$ M pri tem T-celičnem preizkusu, vendar pa je ocenjeno, da bi bila le $\sim 2 \cdot 10^{-9}$ M pri tem NK-celičnem preizkusu. Čista izboljšava T-celične aktivnosti Q126E pred NK-celično aktivnostjo je tako ~ 400 -kratna, kot je bilo določeno pri tem preizkusu. Podobne rezultate smo dobili s krvjo dodatnih donorjev (podatki niso prikazani).

Podrobno v zvezi s Fig. 7 pa je za prikazani eksperiment doza wt IL-2, ki daje 50 % maksimalno proliferacijo (EC_{50}), $\sim 5 \cdot 10^{-11}$ M za T-celični (A) in $\sim 8 \cdot 10^{-11}$ M za NK-celični (B) preizkus. EC_{50} za Q126L je $\sim 2 \cdot 10^{-11}$ M pri tem T-celičnem preizkusu, vendar pa je ocenjeno, da bi bila le $\sim 2 \cdot 10^{-8}$ M pri tem NK-celičnem preizkusu. Čista izboljšava T-celične aktivnosti Q126L pred NK-celično aktivnostjo je tako ~ 625 -kratna, kot je bilo določeno pri tem preizkusu. Podobne rezultate smo dobili s krvjo dodatnih donorjev (podatki niso prikazani).

Primer 7.

Študij toksičnosti pri šimpanzih

IL-2/N88R smo izbrali iz IL-2 mutantnih proteinov v tabeli 1 zaradi njegove prikazane T-celične selektivne agonistične aktivnosti v primarnih humanih T- in NK-celičnih preizkusih. Glede na IL-2 divjega tipa je le-ta ~6000-krat bolj aktiven na celicah T kot na celicah NK in kaže aktivnost, ki je v bistvu ekvivalentna tisti za wt IL-2 na celicah T. IL-2/N88R smo proizvedli v celicah CHO, očistili in ocenili v modelu šimpanza za IL-2 aktivnost in toksičnost. V tem modelu *in vivo* le-ta kaže T-celično aktivnost, ki je primerljiva s komercialno dosegljivo rekombinantno varianto IL-2 (PROLEVKINTM, Chiron Corporation, Emeryville, CA), čeprav so bili inducirani le blagi stranski učinki pri primerjavi (tako glede objektivnih kot tudi kliničnih parametrov).

A. Eksperimentalni model

1. Materiali in postopki

Del študija v živo je potekal v raziskovalnem centru v Novi Iberiji (New Iberia, LA, Sponsor Bayer Corporation, Berkeley, CA) in je vključeval dve fazi in 11 mladičev do odraslih samcev šimpanzov s telesnimi masami v območju od približno 45 do 70 kg.

Faza I pri študiju je bila določevanja doze in je vključevala dajanje subkutane doze nosilca ali subkutane doze PROLEVKINA pri 1,2 mg/m² dvakrat na dan (BID) 5 dni. Faza II študija je bila primerjava nosilca, PROLEVKINA in IL-2/N88R, ki smo jih dajali subkutano vsakih 12 ur (q12h) 5 dni. Doza IL-2/N88R je bila izbrana tako, da smo zagotovili primerljivo izpostavitvev PROLEVKINU, temelječ na farmokinetični analizi. Vzorce krvi smo vzeli za analiziranje kemijske sestave krvi, CBC, hematologije/koagulacije in FACS-analizo T- in NK-celičnih populacij, kot je podrobno navedeno v poglavjih 5 in 6.

Tabela 2A: Protokol za fazo I

Št. skupine	Število živali	Preizkusna snov	Doza	Frekvenca
1	1	nosilec	NA	BID za 5 dni
2	2	PROLEVKIN	1,2 mg/m ²	BID za 5 dni

Tabela 2B: Protokol za fazo II

Št. skupine	Število živali	Preizkusna snov	Doza	Frekvenca
1	2	nosilec	2,4 ml/m ²	q12 h za 5 dni
2	3	PROLEVKIN	1,2 mg/m ²	q12 h za 5 dni
3	3	IL-2/N88R	1,2 mg/m ²	q12 h za 5 dni

2. Postopek doziranja

Na študijske dneve, na katere je bilo treba dobiti kri, smo živali popolnoma anestezirali z IM-ketaminom z dozo približno 10 mg/kg pred dajanjem preizkusne snovi ali nosilca. Na študijske dneve, na katere zbiranje krvi ni bilo potrebno, smo živali fizično zaprli, pri čemer smo uporabili utesnjevalne kletke, pred dajanjem preiskusnega izdelka ali nosilca. Dozo smo dajali s subkutano injekcijo vsakih 12 ur 5 dni, na injicirnem mestu pa smo odstranili dlake na dan 1 študija. Za vsako doziranje smo zapisali čas in mesto.

3. Klinična opazovanja

(a) Dnevna opazovanja in poraba hrane

Vsako žival smo opazovali 2-krat na dan in sporočili kakršnokoli nenormalnost študijskemu usmerjevalcu. Na živali, ki so bile videti bolne, smo opozorili študijskega usmerjevalca, veterinarja pri projektu in zastopnika sponzorja. Porabo hrane smo potrdili in zapisali 2-krat na dan z vizualnim opazovanjem.

(b) Telesne mase

Telesne mase smo zapisali pred študijem, pred doziranjem na dan 1 in vsakokrat smo živali umirili za zbiranje krvi.

(c) Opazovanje injicirnih mest

Injicirna mesta smo opazovali vsak dan. Kakršenkoli nenormalen pojav, kot npr. rdečino ali oteklino, smo zapisali.

Tabela 3A: Urnik za zbiranje vzorcev v fazi II

Čas	CBC	CHEM	COAG	FACS	SPONZORSKI PREIZKUS
predštudij	X	X	X	X	X
dan 1, preddoza	X	X	X	X	X
dan 1, 15 min					X
dan 3, preddoza	X	X	X	X	X
dan 3, 15 min					X
dan 6	X	X	X	X	X
dan 8	X	X	X	X	X
dan 10	X	X	X	X	X
dan 12	X	X	X	X	X
dan 15	X	X	X	X	X

dan 30	X	X	X	X	X
--------	---	---	---	---	---

4. Ravnanje z vzorci

(a) Kemijske sestavine seruma

Približno 2 ml vzorce krvi smo zbrali pri vsaki živali v ceveh brez antikoagulantov v zgoraj navedenih časovnih točkah. Čase zbiranja krvi smo zapisali, kri pa smo pustili, da se je strdila pri sobni temperaturi. Vzorce smo centrifugirali, serum ločili in ga poslali v klinični patološki laboratorij NIRC. NIRC standardni seznam kemijskih sestavin seruma je v tabeli 4:

Tabela 4: Seznam kemijskih sestavin v krvi

natrij	fosfor
kalij	sečninski dušik
klorid	kreatinin
celotni bilirubin	celotni protein
alkalna fosfataza	albumin
laktat-dehidrogenaza (LDH)	razmerje albumin/globulin
aspartat-aminotransferaza (AST)	glukoza
alanin-aminotransferaza (ALT)	kalcij
ogljikov dioksid (CO ₂)	γ-glutamilttransferaza (GGT)

(b) Hematologija

Približno 2 ml vzorce krvi smo zbrali pri vsaki živali v ceveh z EDTA v zgoraj navedenih časovnih točkah in jih poslali v klinični patološki laboratorij NIRC. NIRC-

standardni hematološki seznam, ki vključuje celotno krvno sliko, diferencialno, in število trombocitov, so naredili pri vseh vzorcih.

(c) Sponzorski preizkusi

Približno 6 ml vzorce krvi smo zbrali v ceveh z EDTA kot antikoagulantom v časih, navedenih zgoraj. Zapisali smo čase zbiranja krvi. Vzorce smo centrifugirali, plazmo ločili in odmerili v alikvotih v tri ločene cevi. Plazmo smo shranili zmrznjeno (-60 °C ali nižje) in jo poslali v Bayer Corporation, Berkeley, CA, takoj ko je bil študij končan.

5. FACS

(a) Postopek

Približno 5 ml vzorce krvi smo zbrali v antikoagulantu natrijevem heparinu v časih, navedenih za FACS-analizo.

Vzorec popolne krvi smo dobili bodisi v EDTA, ACD ali heparinu. Število celic smo naravnali tako, da je bilo v območju od 2 do 20000 na mm³.

12x75 steklene cevi ali cevi iz umetne snovi smo ustrezno označili za seznam protiteles, ki je bil v izvajanju. Protitelo ali protitelesni koktajl smo dali v cevi v volumnih v skladu z navodili izdelovalca.

100 µl dobro zmešanega vzorca krvi smo dali v cev in zmes inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo.

Po inkubaciji smo dodali 2 ml raztopine za lizo (raztopina za lizo znamke Becton Dickinson FACS, BD#92-0002), zmes blago vrtinčasto mešali in pustili, da je stala 10 minut pri sobni temperaturi. Cevi smo nato centrifugirali pri sobni temperaturi 5 minut

pri 300 g. Supernatante smo dekantirali, prebitek tekočine popivnali in vsaki celični peleti dodali 1 ml PBS pufra (GIBCO 14190-144). Po blagem vrtnčastem mešanju smo cevi centrifugirali pri sobni temperaturi 5 minut pri 300 g. Supernatante smo dekantirali in prebitek tekočine popivnali pred dodatkom 1 ml raztopine za fiksiranje (0,5 % raztopina formaldehida, pripravljena z razredčenjem 10 % formaldehida (Polyscience, Inc. #0418) 1:20 s PBS pufrom) na celični pelet in blago vrtnčasto mešali za resuspendiranje. Vzorce smo nato analizirali na pretočnem citometru Coulter EPICS SL.

Protitelesa, uporabljena za študij: MlgG1/MlgG1 kontrolni izotip (Becton Dickinson, kat. # 349526), CD45-PerCP (Becton Dickinson, kat. # 347464), CD8-FITC (Becton Dickinson, kat. #347313), CD25-PE (Becton Dickinson, kat. #30795X), CD4-FITC (Becton Dickinson, kat. #340133), CD16-PE (Pharmingen, kat. #347617), CD3-PerCP (Becton Dickinson, kat. #347344).

6. Koagulacijski profil

Približno 2 ml vzorca popolne krvi smo zbrali v ceveh z natrijevim citratom, dodanim kot antikoagulantom, v zgoraj določenih časovnih točkah. Koagulacijski profil je sestavljen iz: protrombinskega časa (PT), aktiviranega delnega tromboplastinskega časa (APTT) in fibrinogena.

B. Rezultati in diskusija

1. Določitev doze PROLEVKINA

Primarni cilj te faze je bil, da bi identificirali optimalno dozo PROLEVKINA za primerjavo z IL-2/N88R. Ta optimalna doza PROLEVKINA je bila ciljana kot doza, ki jo je možno tolerirati (nižja kot maksimalna tolerirana doza), ki bi idealno povzročila klinično pomembno, vendar zmerno in reverzibilno toksičnost. Dozo PROLEVKINA 1,2 mg/M², BID, smo določili kot začetno dozo na osnovi

ekstrapolacije danih kliničnih dozirnih režimov za PROLEVKIN za različne vrste (cross-species), njihovih ustreznih toksičnosti in rezultatov odziva na dozo PROLEVKINA hišnih opic *cynomolgus*.

Dva šimpanza smo obdelali na ta način s PROLEVKINOM. Ti dve živali sta postali znatno manj aktivni, izčrpani in dehidrirani med potekom doziranja. Obe živali sta razvili hude gastrointestinalne simptome z začetkom na dan 3 ali 4, vključno znižani apetit, diarejo, povračanje. Doziranje smo pri eni živali (številka X-159) prekinili po 3 dnevni doziranja zaradi hude renalne (Fig. 8A&B) in zmerne hepatične (Fig. 8C&D) disfunkcije, ki se je kazala v kemijskih sestavinah krvi. Le-te vključujejo zvišanje sečninskega dušika v krvi (BUN), kreatinina in celotnega bilirubina, ALT (SGPT). Ringerjevo raztopino z laktatom smo dali i.v. obema živalima, tako tisti, ki smo jo obdelali s PROLEVKINOM na dan 3 in 4 (žival X-159) kot tudi tisti, ki smo jo obdelali le na dan 4 (žival X-124), kot ponovno ožitev ali za preprečitev nadaljnje dehidracije. Žival X-159 smo odstranili iz študija na dan 8 zaradi renalne disfunkcije in možnega trombusa na desni nogi, kot je bilo zaznано z zelo minimalnim pulzom (femoralni), celotna meča pa so bila hladna in povečana. Čeprav smo opazili precejšnjo toksičnost pri eni živali, je imela druga žival manj hude pojave, profil škodljivih pojavov pri obeh živalih pa je bil reverzibilen. Na osnovi tega smo dozo 1,2 mg/M² PROLEVKINA in ekvivalentno dozo (na osnovi izpostavitve) IL-2/N88R, q12h, določili, kot ustrezen dozirni režim za primerjavo teh dveh spojin.

2. Primerjava IL-2/N88R s PROLEVKINOM

Klinična opazovanja

V tabeli 5 so navedena klinična opazovanja, narejena med študijem. Vrednosti so navedene v ocenah od 0 do 5, kjer je 5 huda. Vse živali, obdelane s PROLEVKINOM, so bile hudo bolne; prišlo je do enega pogina, povezanega z obdelovanjem s PROLEVKINOM. Vrednosti, navedene po dnevu 6 za PROLEVKINSKO skupino, prikazujejo podatke od preostalih dveh živali. Najbolj očiten stranski učinek

obdelovanja z IL-2/N88R je bila blaga GI-motnja (emeza), čeprav obdelovanje ni induciralo nominalne toksičnosti glede parametrov, navedenih v tabeli 4. Telesna masa PROLEVKINSKE skupine je padla 6 % na dan 6, na dan 10 pa celo 10 %, potem pa se je počasi rekuperirala (glej Fig. 9). Nasprotno s tem pa sta imeli IL-2/N88R-skupina in skupina z nosilcem največ le 1-3 % izgubo mase.

Tabela 5. Klinična opazovanja *

Obdelava	splošno stanje	izguba apetita	letargija	GI	občutek slabosti
IL-2/N88R	dobro	1	1	2	1
PROLEVKIN	hudo bolna	5	4/5	5	4/4
nosilec	normalno	0	0	0	0

* Ocene od 0 do 5, kjer je 5 najbolj huda

(a) Hematologija. Opazili smo tudi celične učinke, inducirane z IL-2/N88R, konsistentne s PROLEVKINSKO aktivacijo, zlasti limfocitozo (Fig. 10A), povečanje belih krvnih celic (Fig. 10B) in nevtrofilcev (Fig. 10C). IL-2/N88R je inducirал le marginalno trombocitopenijo (nadir ~15 %) v primerjavi s PROLEVKINOM (nadir ~50 %) med obdelovalnim delom študija (Fig. 10D).

(b) Renalna funkcija. Nivoji BUN so bili opazno višji pri vseh živalih, obdelanih s PROLEVKINOM na dneva 6 in 8 (Fig. 11A). Nivoji BUN so bili nad 130 mg/dl pri dveh od teh živalih; prav tako so zelo narasli nivoji kreatinina pri dveh živalih na oba dneva 6 in 8 (Fig. 11B), kar kaže na popolno odpoved renalne funkcije. Poleg tega sta se povečala tudi serumski fosfor in anionska praznina v skupini, obdelani s PROLEVKINOM na dneva 6 in 8. V nasprotju s tem pa so pri vseh IL-2/N88R-živalih ti renalni parametri ostali v osnovi normalni vseskozi pri študiju (Fig. 11C&D).

(c) Hepatična funkcija. Celotni bilirubin se je več kot potrojil v PROLEVKINSKI skupini na dan 6 in je ostal visok ves dan 10 (Fig. 12A). V nasprotju s tem je imela le ena žival v IL-2/N88R-skupini prehodni manjši prirast na dneva 3 in 6. Nivoji serumskega SGPT so se zelo povečali in dosegli nad 100 E/l pri vseh PROLEVKINSKIH živalih na dan 6 (Fig. 12B). Pri živali št. A199 je dosegel nivo SGPT 651 E/l, SGOT pa 2789 E/l (lab. vpisna knjiga: NIRC#8754-9852-faza II, tabela 1, Povprečne vrednosti kemičnih sestavin pri posamezniku in skupini, str. 17 od 21. v tabeli), kar kaže na hudo napako jeter.

(d) Koagulacija. Nivo fibrinogena se je več kot podvojil tako v PROLEVKINSKI kot tudi v IL-2/N88R-skupini in je dosegel vrh na dan 6 (Fig. 12C). To povečanje se je očitno zgodilo prej v PROLEVKINSKI skupini kot pa pri IL-2/N88R-živalih. To pa se je pokazalo s porastom 51 % vs. 5 % na dan 3. Spremembe fibrinogena so bile lahko prej posledica akutnega proteinskega odziva kot pa koagulacijskih defektov, ker ni bilo pomembnih sprememb v APTT ali PT med enako časovno periodo (Fig. 12D). Vendar pa se je pri PROLEVKINSKIH živalih nivo APTT s pričetkom na dan 10 pokazal z očitno tendenco navzgor, čeprav je absolutna vrednost ostala v normalnem območju. Enako tendenco, čeprav v manjšem obsegu, smo opazili tudi v IL-2/N88R-skupini. Zanimivo pa je bila pri nivoju fibrinogena težnja zniževanja med isto časovno periodo skladno v obeh skupinah.

(e) Homeostaza. Nivoji natrija v serumu so padli pod 135 mekv/l pri dveh od treh PROLEVKINSKIH živalih na dan 8, vendar pa so ostali normalni pri drugih živalih (Fig. 13A). Kloridni nivoji v PROLEVKINSKI skupini so se tudi znižali pod 95 mekv./l z začetkom na dan 3 in so ostali nizki do dneva 15 (Fig. 13B). Nivo kalcija je bil nižji pri dveh od treh PROLEVKINSKIH živali na dneva 6 in 8 in je dosegel tako nizek nivo kot 4,9 in 3,1 mg/dl pri živali A199 (Fig. 13C). Nivo kalija je padel pod 3 mekv/l od 3. do 12. dneva pri vseh živalih, obdelanih s PROLEVKINOM, razen pri živali A199,0 pri kateri je nivo kalija dejansko narastel na toksični nivo 7,2 mekv./l, predno smo jo vzeli iz študija (Fig. 13D).

(f) Znaki vaskularnega leaka. Nivoji serumskega albumina so padli tako v PROLEVKINSKI (37 %) kot tudi v IL-2/N88R(19 %)-skupini (Fig. 14A). Porast hematokritnega nivoja smo opazili v PROLEVKINSKI skupini na dneva 3 in 6 (Fig. 14B). Nasprotno s tem pa so hematokritni nivoji padli tako v skupini s kontrolnim nosilcem kot tudi v IL-2/N88R-skupini v enaki časovni periodi in so ostali nizki, kar označuje blago anemijo, kot je bilo pričakovati zaradi številnih zbiranj vzorcev krvi (Fig. 14B&C). Kadar je zvišanje hematokrita v PROLEVKINSKI skupini združeno z znižanjem albumina, je le-to konsistentno z razvojem sindroma kapilarnega leaka.

3. Celična aktivacija

Učinkovitost PROLEVKINA in IL-2/N88R ugotavljamo s spremembo odstotka CD25 pozitivnih limfocitov (kroženje + proliferacija) in povprečjem fluorescence za CD25 ali številom CD25 antigenov, izraženih na površini dane celice T (CD25 = nizkoafinitetni IL-2R). Ekspresijo CD25 ugotavljamo na celotni T-celični populaciji (celice CD3+) kot tudi na populacijah CD3+CD4+ in CD3+CD8+.

IL-2 aktivnost na naravnih celicah ubijalkah (celice NK) ugotavljamo z analizo kroženja CD3-CD16+ in CD3-CD25+CD16+ NK celic. Absolutno število CD3+, CD4+, CD8+ NK-celic določimo z množenjem odstotka celic s številom limfocitov na mm³, podatki, dobljeni med hematološko analizo.

(a) CD25-regulacija ekspresije na T-celični površini. Odstotek aktiviranih celic T, kot je označeno s pozitivnimi celicami CD25, je reguliran navzgor na dan 6 študija, večinoma na CD3+CD4+ T-celični subpopulaciji. PROLEVKIN očitno inducira ekspresijo CD25 na višji odstotek celotnih CD3+, CD3+CD4+ in CD3+CD8+ subpopulacij celic T na dan 6. Vendar pa je bil na dan 8 odstotek celic, ki izražajo antigen CD25, identičen pri limfocitih šimpanzov, obdelanih s PROLEVKINOM in pri šimpanzih, obdelanih z IL-2/N88R (Fig. 15A, B in C). Nobenega barvanja za CD25 na površini populacije naravnih celic ubijalk (celice NK) nismo opazili pri šimpanzih, bodisi obdelanih z PROLEVKINOM ali IL-2/N88R. Pomanjkanje

ekspresije IL-2R α (antigen ciljan za celično površinsko barvanje s CD25) na površini izbrane NK-celične populacije (CD3-/CD16+) je verjetno odgovorno za te rezultate.

Absolutno število CD3+CD25+ T celic smo ugotavljali na podoben način kot odstotek CD3+CD25+ T celic s PROLEVKINOM, ki je očitno bolj aktiven kot IL-2/N88R (Fig. 16A). Za IL-2/N88R je razviden podoben T-celični aktivacijski potencial kot za PROLEVKIN na CD3+CD4+ T-celični populaciji, ker je regulacija navzgor absolutnega števila CD3+CD4+CD25+ limfocitov, inducirana z IL-2/N88R, identična regulaciji navzgor, razvidni za PROLEVKIN (Fig. 16B). PROLEVKIN očitno poveča število CD3+CD8+CD25+ T-celic do večjega obsega kot IL-2/N88R (Fig. 16C).

Število CD25 molekul (povprečje fluorescence), izraženo na CD3+CD4+ T-celični subpopulaciji, smo ugotavljali z identičnimi kinetikami z obdelavo bodisi s PROLEVKINOM ali z IL-2/N88R (Fig. 17).

(b) Limfocitno kroženje: učinek obdelave s PROLEVKINOM in z IL-2/N88R

Aktivnosti PROLEVKINA in IL-2/N88R na T- in NK-celičnih populacijah smo določali z analizo spremembe absolutnega števila krožečih limfocitov pred obdelavo, med njo in po njej (Fig. 18). IL-2/N88R je imel očitno večjo aktivnost kot PROLEVKIN pri povečanju absolutnega števila CD3+CD4+ krožečih limfocitov (Fig. 18A) in rahlo zmanjšano aktivnost v primerjavi s PROLEVKINOM pri povečanju absolutnega števila CD3+CD8+ krožečih limfocitov (Fig. 18B). Obe spojini sta imeli primerljiv, čeprav zmeren učinek na povečanje celotnega števila CD3+ limfocitov (Fig. 18C). Niti PROLEVKIN niti IL2/N88R nista vplivala na kroženje celic NK (Fig. 18D).

C. Sklep

IL-2/N88R smo proizvedli s selekcioniranjem mutantnih IL-2 proteinov pri preizkusih humanih primarnih celic T in NK. Kaže ~6000-kratno selektivnost *in vitro* za celice T pred celicami NK. Na osnovi tega celičnega profila smo ugotovili, da bi induciral le blage stranske učinke, kadar bi ga dali v dozi, ki bi izzvala znatno T-celično aktivacijo. Preizkusi pri šimpanzih, kjer smo primerjali PROLEVKIN in IL-2/N88R, so potrdili, da ima IL-2/N88R znatno boljši varnostni profil kot PROLEVKIN, medtem ko ohrani primerljivo sposobnost, da inducira T-celično aktivacijo.

Primer 8: Učinkovitost IL-2 selektivnega agonista N88R v modelu tumorskih murinih CT-26 pljučnih metastaz

Protokol: Mišim (Balb/c, samice, 6 do 8 tednov stare) smo injicirali intravenozno (IV) 1×10^5 celic CT-26 (karcinom murinega debelega črevesa) v 0,2 ml PBS v stransko repno veno na dan 0. Obdelovanje je bilo s PROLEVKINOM ali IL-2/N88R v različnih dozah (razredčilo: 5 % dekstroza v vodi (D5W)), ali D5W, z dajanjem IV enkrat dnevno 8 dni (QD x 8) s pričetkom na dan 1 po implantaciji. IL-2/N88R smo pripravili pri sobni temperaturi z razredčenjem v D5W z uporabo silikoniziranih fiol z uporabo tuberkulinske injekcije in ga dozirali živalim v 2 urah po pripravi. PROLEVKIN smo pripravili z dodajanjem 0,7 ml sterilne vode za injekcije (SWFI) v vsako fiolo (končna koncentracija 1,86 mg/ml). Razredčitve smo naredili, kot je opisano za IL-2/N88R v D5W (tabela 6). Živali smo usmrtili na dan 11. Pljuča smo odstranili in stekali, sprali v PBS in tkivo prenesli v Bouinovo raztopino. 24 ur kasneje smo tkivo prenesli v 10 % formalin. Število metastatičnih kolonij v pljučih smo prešteli pod disekcijskim mikroskopom.

Tabela 6. Doza in skupine pri študiju modela tumorja murinih CT-26

skupine	n	obdelava	doza mg/kg
1	14	D5W	NA
2	11	PROLEVKIN	3 mg/kg
3	11	PROLEVKIN	10 mg/kg

4	11	IL-2/N88R	1 mg/kg
5	12	IL-2/N88R	3 mg/kg
6	12	IL-2/N88R	10 mg/kg
7	12	IL-2/N88R	30 mg/kg
8	11	IL-2/N88R	60 mg/kg

Tabela 7 prikazuje število metastaz, prešteti v posamezni miši. Primerljivo učinkovitost smo opazili tako za IL-2/N88R kot tudi PROLEVKIN. Pri visoki dozi IL-2/N88R (skupina 8, 60 mg/kg) so imele vse razen ene miši 12 metastaz ali manj; 3 od miši niso imele metastaz. To je v nasprotju z najvišjo preizkušeno dozo PROLEVKINA, kjer so imele vse preživete miši 12 metastaz ali več.

Tabela 7. Navedeno je število in povprečje individualnih metastaz

sku- pina	pljučne metastaze (navedena so števila za individualne miši)	pov- prečje	SEM	P- vrednost (dvo- stranska)
1	0 129 183 179 155 165 200 152 148 158 200 194 165 125	154	13,42	
2	118 126 107 111 118 110 137 114 135 158 132	124	4,61	0,07278
3	12 38 18 19 30	23	4,66	0,00003
4	169 173 189 200 120 117 136 122 200 163 110	154	10,41	0,97029
5	171 176 186 159 192 139 117 200 195 116 192	168	9,31	0,43401
6	92 111 112 114 109 84 68 47 58 49	87	8,16	0,00060

	112												
7	15	13	59	62	23	55	46	16	9	4	26	6,57	0,00000
	8	2											
8	7	0	3	2	4	9	7	0	12	55	9	4,75	0,00000
	0												

Znatno ($P < 0,05$) zmanjšanje metastaz smo opazili pri miših, obdelanih z IL-2/N88R z dozami 10, 30 in 60 mg/kg (skupine 6, 7 oz. 8), in v skupini, obdelani z 10 mg/kg PROLEVKINA (skupina 3). Ti rezultati so grafično prikazani na Fig. 19. Podatki so narisani z uporabo log doze: za PROLEVKIN so bile doze 3 in 10 mg/kg ; za IL-2/N88R so bile doze 1, 3, 10, 30 in 60 mg/kg. Z aproksimacijo funkcije z uporabo nelinearne enačbe (aproksimacija 4 parametrov) smo dobili vrednosti IC_{50} 5,2 mg/kg za PROLEVKIN in 10,9 mg/kg za IL-2/N88R.

Iz podatkov pri tem eksperimentu smo izračunali, da je IC_{50} glede na zmanjšanje števila metastaz za IL-2/N88R 10,9 mg/kg (8,6-13,9 mg/kg pri 95 % konfidenci) in za PROLEVKIN 5,2 mg/kg (3,5-7,7 mg/kg pri 95 % konfidenci).

Preživetje za miši je prikazano v tabeli 8. Pri 10 mg/kg PROLEVKINSKI skupini je 1 miš poginila na dan 7, dodatnih 5 miši pa je poginilo na dan 8. Ena miš je poginila na dan 8 v vsaki od skupin, obdelanih s 3 ali 10 mg/kg IL-2/N88R, vendar pa nismo opazili pogina pri bodisi 1, 30 ali 60 mg/kg IL-2/N88R. Poleg tega pa je bila večina miši, obdelanih s 3 mg/kg PROLEVKINA, moribundna in so bile vse miši, obdelane z 10 mg/kg PROLEVKINA, moribundne; pri miših, obdelanih z IL-2/N88R, nismo opazili morbidnosti.

Tabela 8. Preživetje miši, obdelanih z IL-2/N88R ali PROLEVKINOM

skupina	dan			
	0	7 ⁴	8	11
D5W ¹	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
Pro: 3 mg/kg ²	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
Pro: 10 mg/kg ²	100,0 %	90,9 %	45,5 %	45,5 %
IL-2/N88R: 1 mg/kg ²	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
IL-2/N88R: 3 mg/kg ²	100,0 %	100,0 %	91,7 %	91,7 %
IL-2/N88R: 10 mg/kg ²	100,0 %	100,0 %	91,7 %	91,7 %
IL-2/N88R: 30 mg/kg ²	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
IL-2/N88R: 60 mg/kg ²	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %

¹ n = 14 miši/skupino

² n = 11 miši/skupino

³ n = 12 miši/skupino

⁴ Pred dnevom 7 nismo opazili nobenega pogina.

Živali, obdelane s PROLEVKINOM, so bile v obeh skupinah moribundne. Pri nobeni živali, obdelani z IL-2/N88R, nismo opazili morbidnosti.

Iz teh študijev je razvidno, da je IL-2/N88R tako učinkovit kot PROLEVKIN pri zmanjševanju tumorske obremenitve (kot smo izmerili s štejetjem pljučnih metastaz v modelu CT26). Poleg tega je bilo za IL-2/N88R prikazano, da je v bistvu manj toksičen kot PROLEVKIN.

Primer 9. Razvoj stabilnih visoko produkcijskih CHO-celičnih linij, ki izražajo IL-2/N88R

Stabilne produkcijske celične linije, ki izločajo visoke količine IL-2N88R-muteina smo razvili s transfektiranjem CHO(dhfr-) celic z ekspresijskim vektorjem, prikazanim na Fig. 20 (ATCC depozit št. PTA-8). Individualni elementi IL2N88R ekspresijskega vektorja so prikazani v plazmidni mapi (Fig. 20). Le-ta prikazuje CMVe/p = to je citomegalovirusni zgodnji promotor; PA = SV40 poliadenilacijska signalna sekvenca; in DHFR = dihidrofolat reduktazna ekspresijska kaseta.

Vektor smo konstruirali z uporabo tehnik standardne rekombinantne DNA. Npr., Sambrook et al., Molecular Cloning, 2. izd., 1989, Cold Spring Harbor Press; Short Protocols in Molecular Biology, 2. izd., 1992, John Wiley & Son; Methods in Enzymology vol. 185, izd. Goeddel et al., Academic Press, Inc., London, 1991. Ekspresijski vektor vsebuje diskretne ekspresijske kasete za IL-2NR88R-gen in gen DHFR (dihidrofolat reduktaza), ki je sposoben za pomnoževanje in selekcioniranje. Približno 1×10^6 celic CHO (ovarijske celice kitajskega hrčka) smo transfektirali z 10 μ g pBC1IL2SA z uporabo lipofektinskih reagentov (Life Technology Inc., Bethesda, Maryland) po navodilih izdelovalca. Celice smo nato izbrali v prisotnosti 50 nM metotreksata in jih pustili, da so rastle v DME/F12 medijih (Life Technologies, Inc.) z deficitom timidina in hipoksantina in z dializiranim fetalnim govejim serumom (5 %). Celične populacije smo selekcionirali za produkcijo IL-2N88R s komercialnim kompletom ELISA (R & D Systems). Visokoprodukcijske populacije smo nadalje izbrali v medijih, ki vsebujejo naraščajoče koncentracije metotreksata (100 do 400 nM metotreksat) in selekcionirali za produkcijo IL-2N88R. Omejujoče razredčilno kloniranje smo nato uporabili za izvedbo klonov z visoko in stabilno produktivnostjo. Kloniranje smo nato izvedli v odsotnosti metotreksata z uporabo standardnih tehnik za tkivne kulture.

Primer 10. Produkcija IL-2N88R brez seruma v perfuzijskem bioreaktorju

Kontinuirno produkcijo IL-2N88R smo naredili s kontinuirno perfuzijsko fermentacijo. 19 l Wheatonov fermentor smo inokulirali s stabilno CHO-celično linijo iz Primera 9 z 2×10^6 celic/ml in izvedli perfuzijo pri srednji izmenjevalni hitrosti 5 l/dan. Produkcijski medij je bil medij na osnovi DME/F12 (Life Technologies, Inc., Rockville, MD), dopolnjen z rekombinantnim humanim inzulinom (10 µg/ml) (HUMULINTM, Eli Lilly, Inc., Indianapolis, IN) in FeSO₄.EDTA (50 µM). Gostoto celic smo vzdrževali pri $4 \cdot 10^6$ celic/ml. Povprečni dnevni dobitek fermentorja je bil približno 200 mg/dan. Produkcijo IL-2N88R smo vzdrževali stabilno 30 dni.

Primer 11. Čiščenje IL-2/N88R, proizvedenih v celicah CHO

Naslednji postopek smo uporabili za perfuzijski eluat, opisan zgoraj. Perfuzijski medij smo zbrali in aplicirali na kolono S-sefaroze. Kolono smo uravnotežili s fosfatnim pufrom (20 mmol) z NaCl (5 mmol) pri pH 7,0. Polnitvi ("TCF") smo naravnali prevodnost na 4 mS z dodatkom vode in naravnali enak pH s fosforno kislino.

Ko smo kolono napolnili s TCF smo jo izprali z istim uravnoteževalnim pufrom. Elucijo smo izvedli s premikom pH. Muteine smo eluirali z etanolaminom (20 mM), pH 10,5, da smo sprali muteine iz kolone in proizvedli S-eluat.

Anionsko izmenjavo smo izvedli s prepuščanjem S-eluata skozi kolono QAE Fast FlowTM (Pharmacia), uravnoteženo z bikarbonatnim pufrom (10 mM) pri pH 10,5. Pretočno hitrost smo vzdrževali pri 250 cm/h. Po izpiranju do osnovne linije smo IL-2SA eluirali s fosfatom (20 mM), pH 4,0.

Hidroksiapatitno (HAP) kromatografijo smo izvedli s prepuščanjem razredčenega QAE eluata (1:1 z WFI) skozi kolono, polnjeno s keramičnim hidroksiapatitom (tip II, BioRad, Hercules, CA) uravnoteženo s fosfatom (0,10 mM) pri pH 7,0. Pretočno

hitrost smo vzdrževali pri 250 cm/h. Po izpiranju do osnovne linije smo IL-2SA eluirali s fosfatom (100 mM) pri pH 7,0.

Hidroksiapatitni eluat smo utrafiltrirali do 300 ml volumna z enoto Millipore Pelicon-2, opremljeno s tremi patronami PES 5K (Millipore Corporation, Bedford, MA).

Ultrafiltrirani HAP-eluat smo nadalje očistili s prepuščanjem skozi kolono za izključevanje velikosti S100HR (Pharmacia) s 35 cm/h. Kolono smo uravnotežili s fosfatom (10 mM) in NaCl (150mM), pH 7,0.

Gelni filtracijski pool smo razredčili z WFI, zaradi vzdrževanja spec. prevodnosti 4,0 mS/cm in ga ponovno aplicirali na S-sefarozo pri pogojih, opisanih pred tem. IL2SA smo eluirali s fosfatnim pufrom (10 mM) z 1 molarnim NaCl pri pH 7,0.

Končni kationski izmenjalni pool smo dializirali proti fiziološki raztopini soli s fosfatnim pufrom (PBS) preko noči in razredčili s sterilnim PBS do koncentracije 6 mg/ml. Končni razredčeni pool smo nato sterilno filtrirali, razdelili v alikvote in nato zmrznili pri -70 °C. Celotno rekuperiranje je bilo 65 %.

Druge izvedbe predloženega izuma bodo postale strokovnjakom jasne. Predloženi izum uči, kako dobiti muteine, ki niso specifično opisani tukaj, ki pa povzročijo T-celično aktivacijo, kot je razvidno s PHA-blastno proliferacijo in znižano NK-celično proliferacijo, in zato taki muteini pridejo v smisel in obseg predloženega izuma. Koncept in eksperimentalni način, opisan tukaj, naj bi bil uporaben tudi za druge citokine, ki uporabljajo heterologne multimerne receptorske sisteme, posebno sorodne citokine IL-7, IL-9 in IL-15, IL-10, interferon α in interferon γ .

SEKVENCE

V tej prijavi so vsebovane naslednje sekvence:

SEQ ID NO: 1: hIL-2 (amino kislina)

SEQ ID NO: 2: hIL-2 (cDNA)

SEQ ID NO: 3: 5' PCR primer, IL-2

SEQ ID NO: 4: 3' PCR primer, IL-2

SEQ ID NO: 5: mutagenezni primer za IL-2 ekspresijski vektor

SEQ ID NO: 6: mutagenezni primer za D20X mutacije

SEQ ID NO: 7: mutagenezni primer za N88X mutacije

SEQ ID NO: 8: mutagenezni primer za Q126X mutacije

Za

BAYER CORPORATION:

PATENTNA PISARNA, D.O.O.
LJUBLJANA, GOPOVA 14
14

SEKVENČNA LISTA

<110> Shanafelt, Armen B.
 Greve, Jeffrey M.
 Jesmok, Gary
 Lembach, Kenneth J.
 Wetzell, Gayle D.

<120> IL-2 selektivni agonisti in antagonisti

<130> IL-2 sekv. ID 1-8

<140>

<141>

<150> 09/080,080

<151> 1998-05-15

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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 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 Cys Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 2

<211> 465

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatc gcactaagtc ttgcacttgt cacaaacagt 60
 gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 120

ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 180
 acattttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 240
 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 300
 agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 360
 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 420
 tggattacct tttgtcaaag catcatctca acactgactt gataa 465

<210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 cctcaactcc tgaattcatg tacaggatgc 30

<210> 4
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 ggaagcggat ccttatcaag tcagtgttg g 31

<210> 5
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 gcacttgatc caaacacccat ggcacctact tcaagt 36

<210> 6
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 ggagcattta ctgctgnnnt tacagatg 28

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 gggacttaat cagcnnnntc aacgtaatag 30

<210> 8
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 ggattacctt ttgtnnnagc atcatctc 28

Za

BAYER CORPORATION:

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
 LJUBLJANA, ČOPOVA 14

PATENTNI ZAHTEVKI

1. Polipeptid, ki obsega humani interlevkin-2 mutein, oštevilčen v skladu z IL-2 divjega tipa, označen s tem, da je humani IL-2 substituiran vsaj na enem od mest 20, 88 ali 126, pri čemer navedeni mutein prednostno aktivira celice T pred naravnimi celicami ubijalkami.
2. Humani IL-2-mutein po zahtevku 1, označen s tem, da je mesto 20 substituirano glede na divji tip.
3. Humani IL-2-mutein po zahtevku 2, označen s tem, da je mesto 20 substituirano z izolevcinom.
4. Humani IL-2-mutein po zahtevku 2, označen s tem, da je mesto 20 substituirano s histidinom.
5. Humani IL-2-mutein po zahtevku 1, označen s tem, da je mesto 88 substituirano glede na divji tip.
6. Humani IL-2-mutein po zahtevku 6, označen s tem, da je mesto 88 substituirano z argininom.
7. Humani IL-2-mutein po zahtevku 5, označen s tem, da je mesto 88 substituirano z izolevcinom.
8. Humani IL-2-mutein po zahtevku 5, označen s tem, da je mesto 88 substituirano z glicinom.
9. Humani IL-2-mutein po zahtevku 1, označen s tem, da je mesto 126 substituirano glede na divji tip.

10. Humani IL-2-mutein po zahtevku 9, označen s tem, da je mesto 126 substituirano z aspartatom.

11. Humani IL-2-mutein po zahtevku 9, označen s tem, da je mesto 126 substituirano z glutamatom.

12. Humani IL-2-mutein po zahtevku 9, označen s tem, da je mesto 126 substituirano z levcinom.

13. Farmacevtski sestavek, označen s tem, da obsega polipeptid po zahtevku 1 v kombinaciji s farmacevtsko sprejemljivim nosilcem.

14. Polinukleotid, označen s tem, da obsega DNA sekvenco, ki kodira humani IL-2-mutein po zahtevku 1 in njegove degenerirane variante.

15. Prokariotska gostiteljska celica, transformirana s polinukleotidom po zahtevku 14.

16. Vektor, označen s tem, da obsega polinukleotid po zahtevku 14.

Za

BAYER CORPORATION:

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14



1/25

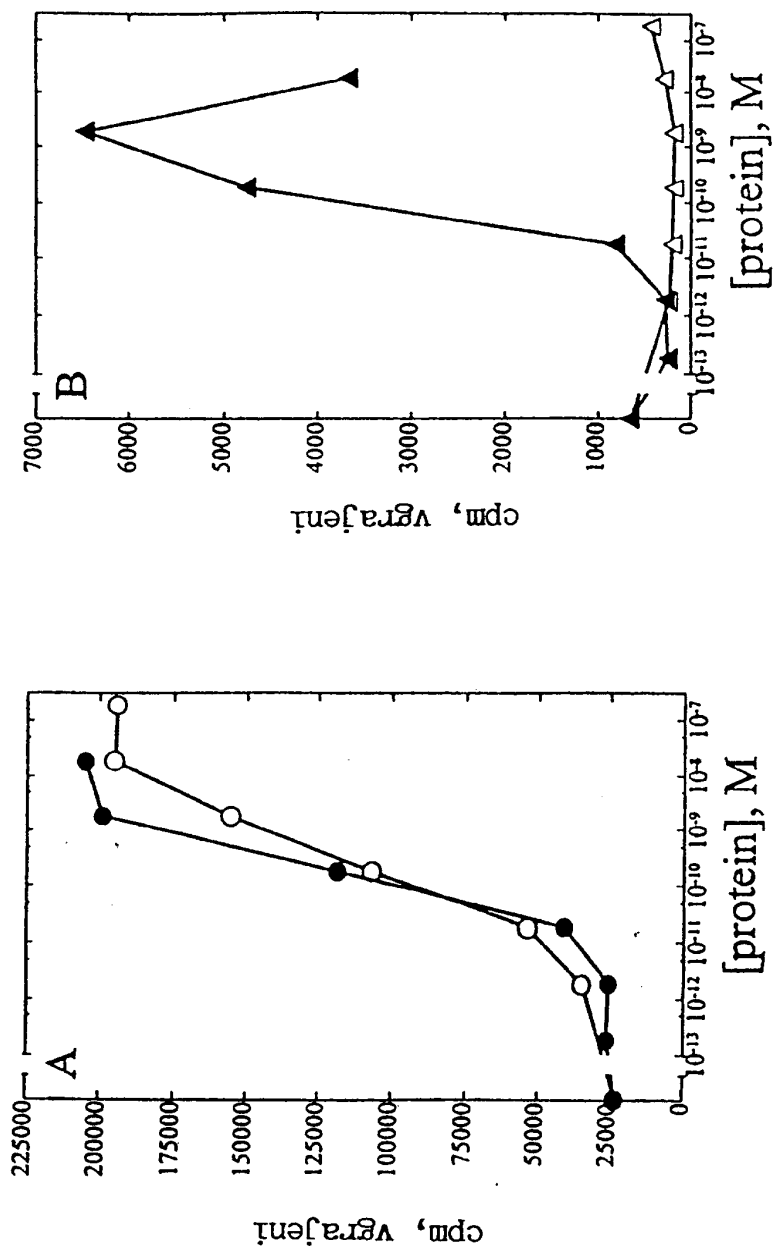


FIG. 1A - 1B

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, GOPOVA 14

2/25

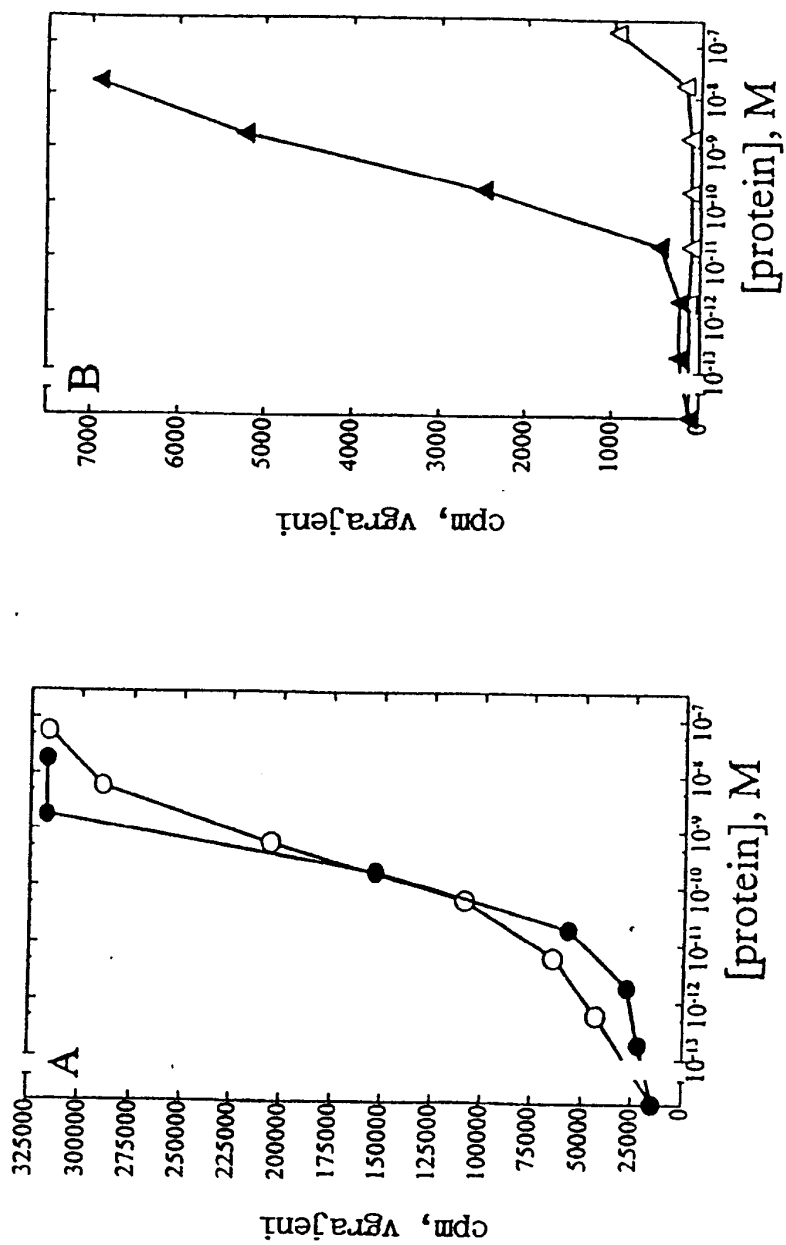


FIG. 2A - 2B

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14
fy

3/25

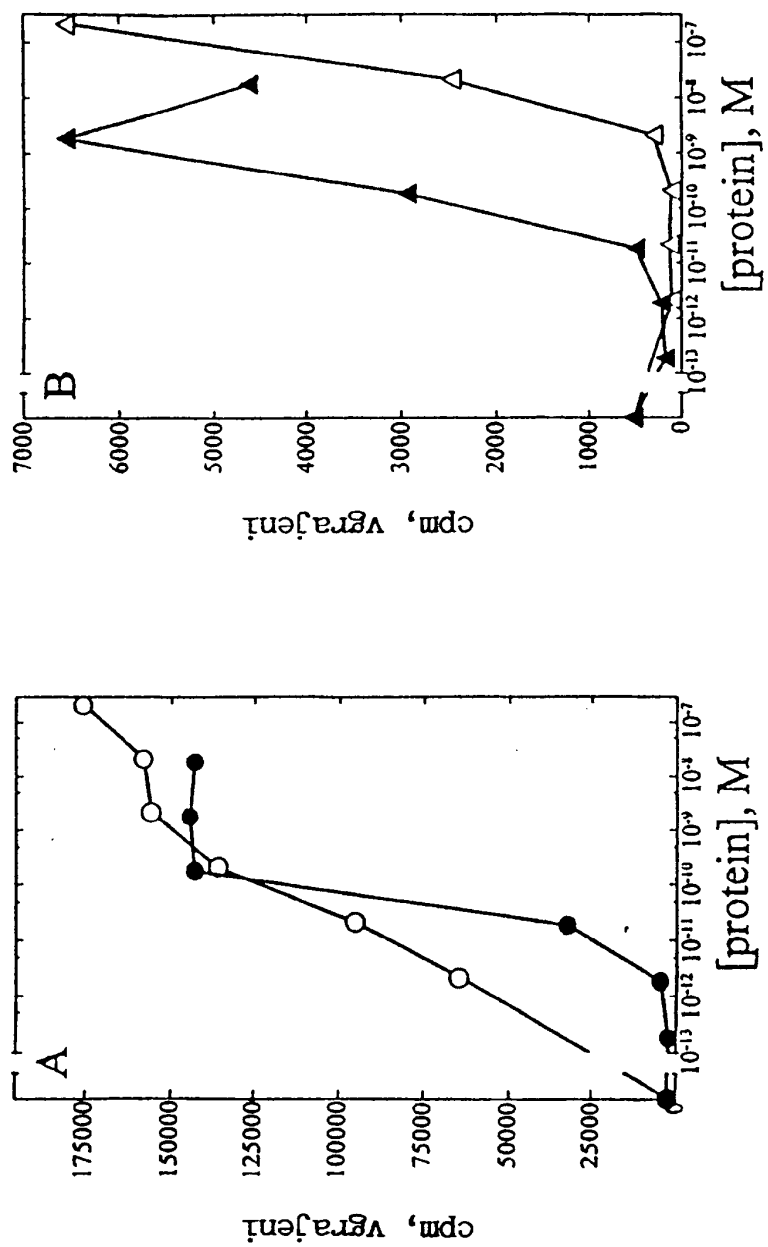


FIG. 3A - 3B

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
Ljubljana, Čopova 14

4/25

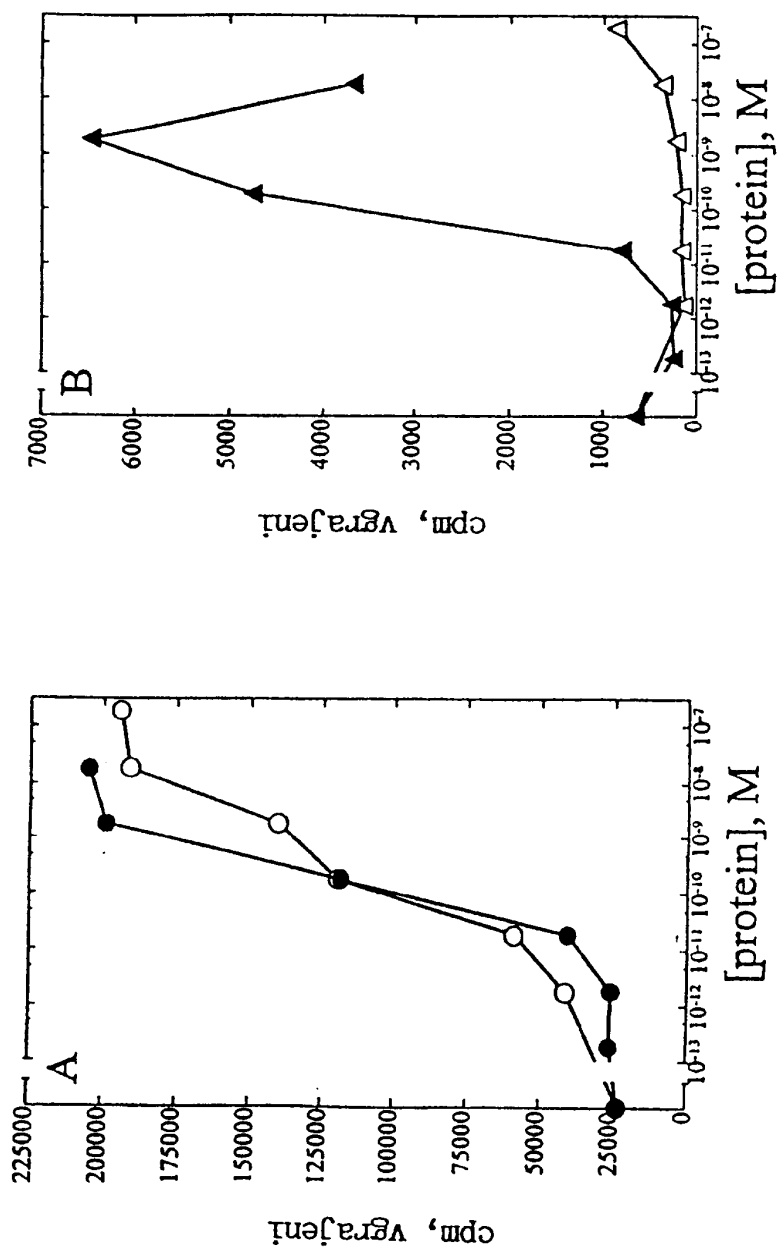


FIG. 4A - 4B

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, COPENHAGEN 14

5/25

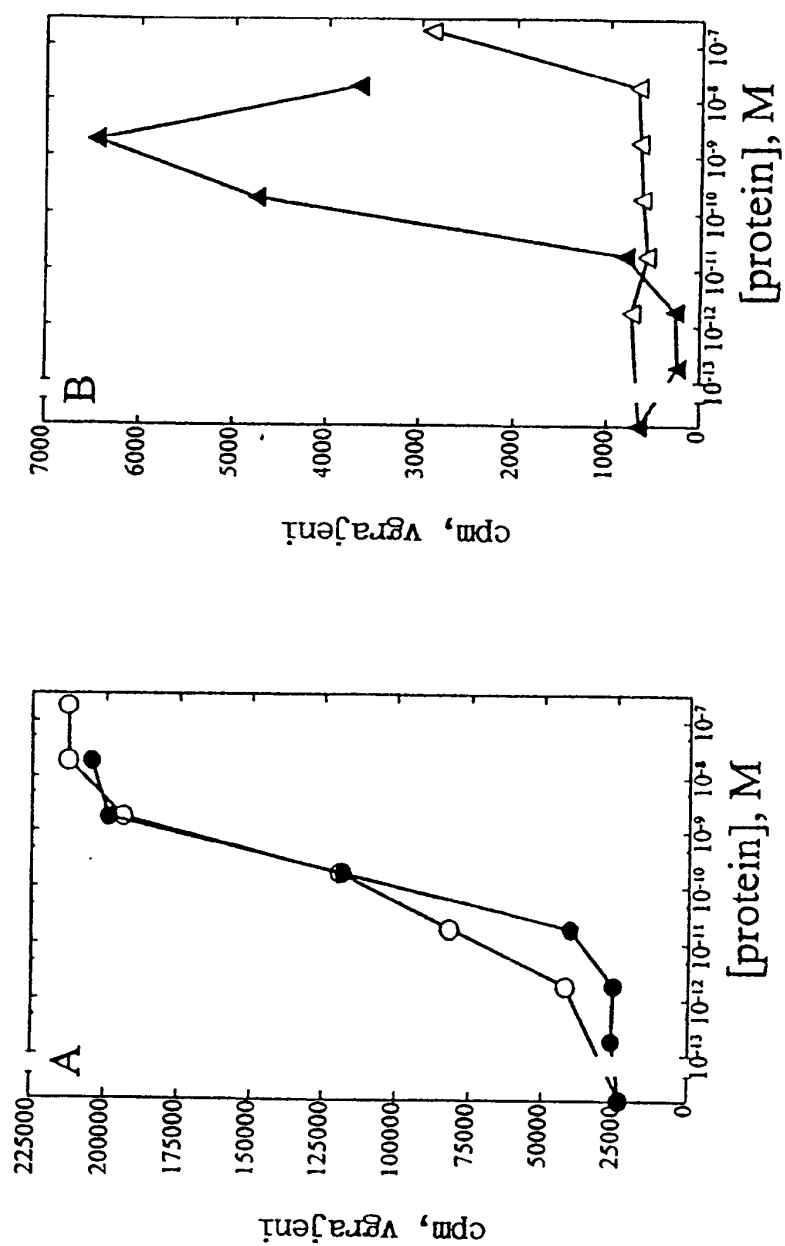


FIG. 5A - 5B

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
Ljubljana, Čopova 14

6/25

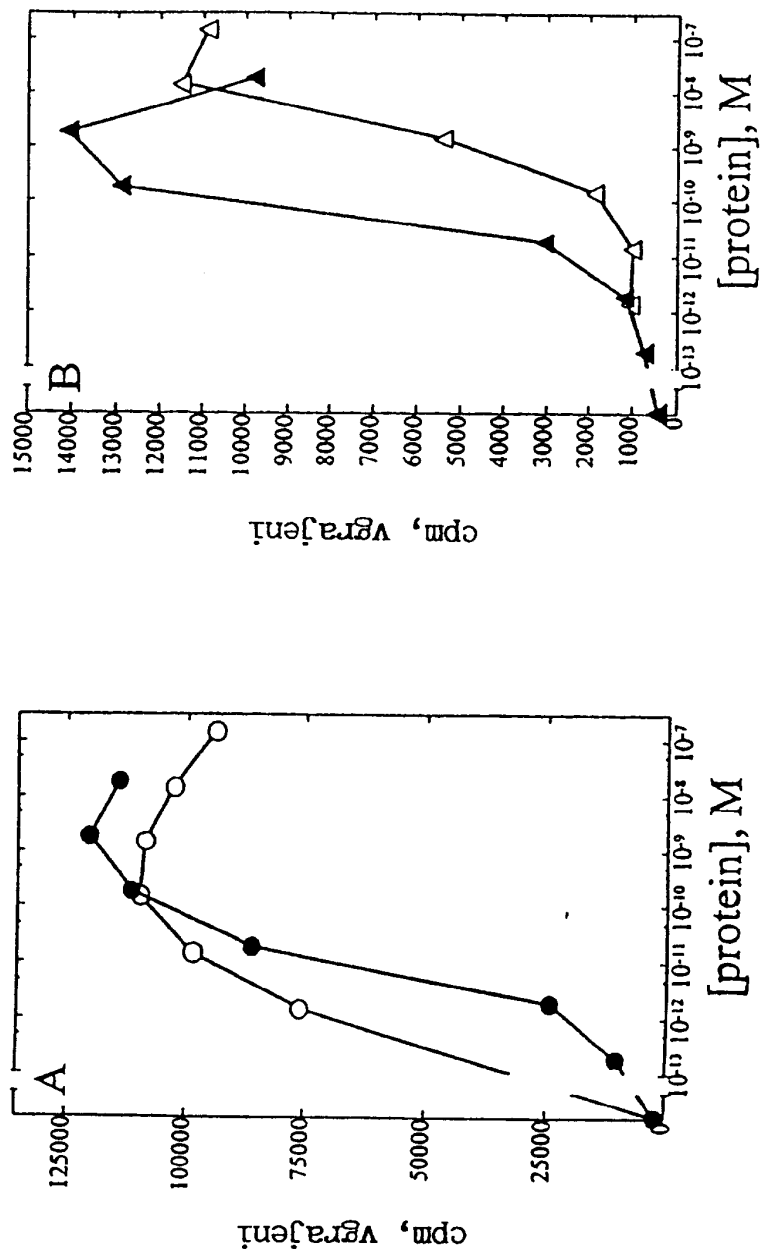


FIG. 6A - 6B

PATENTNA PISARNA, d.d.
LJUBLJANA, ČOPOVA 41

7/25

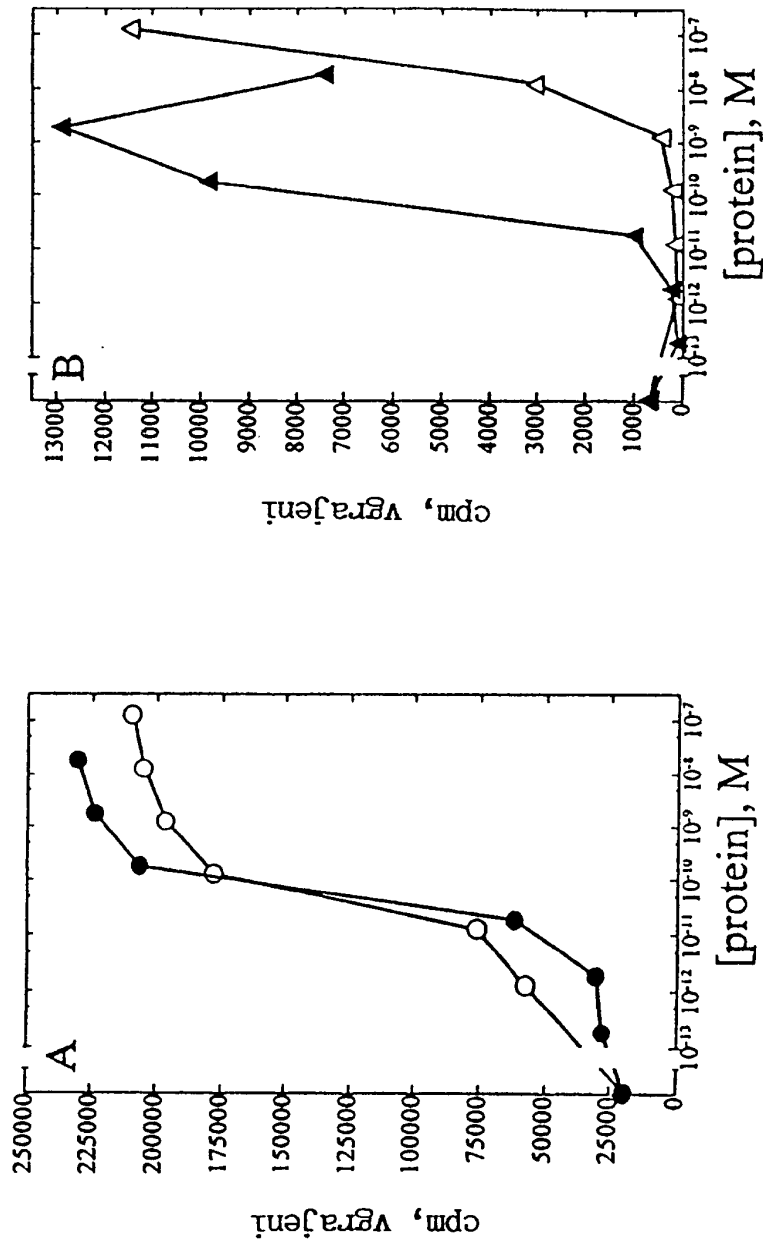


FIG. 7A - 7B

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
Ljubljana, Čopova 14

8/25

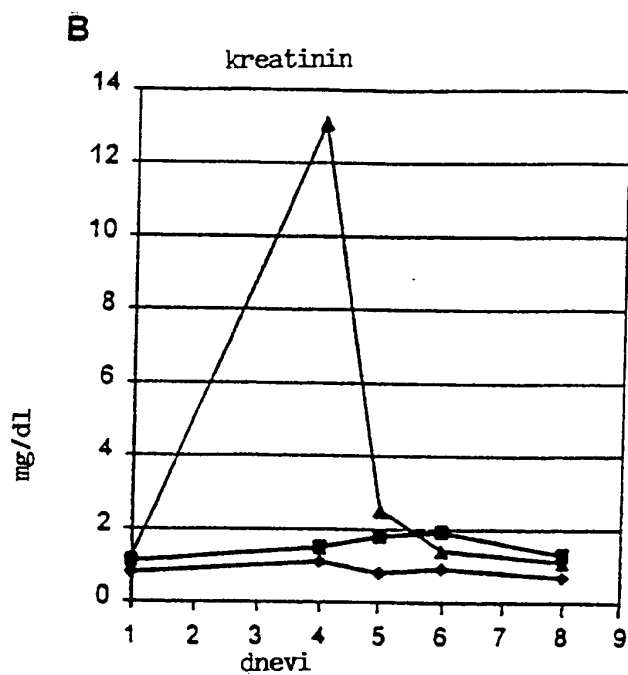
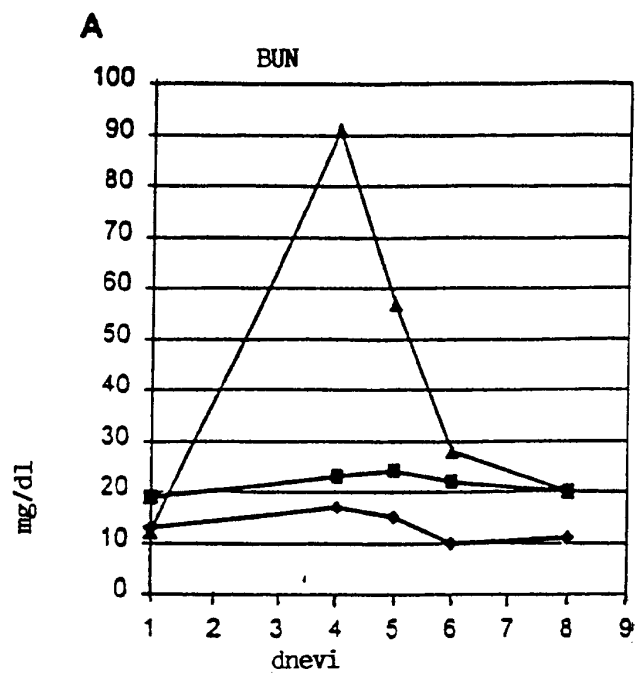


FIG. 8A - 8B

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
Ljubljana, Škofjeva 14

9/25

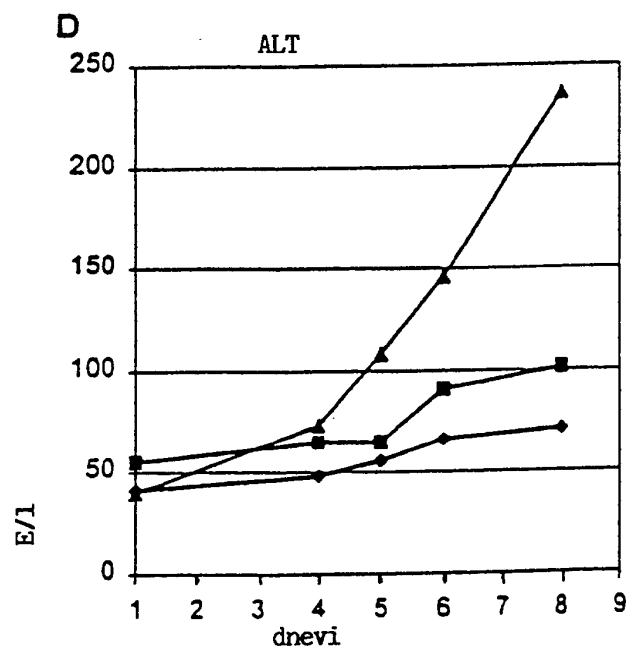
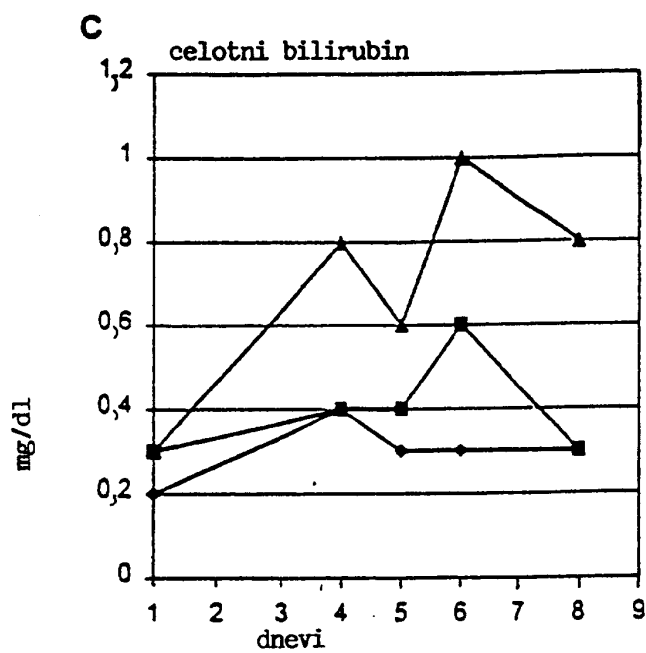


FIG. 8C - 8D

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14

10/25

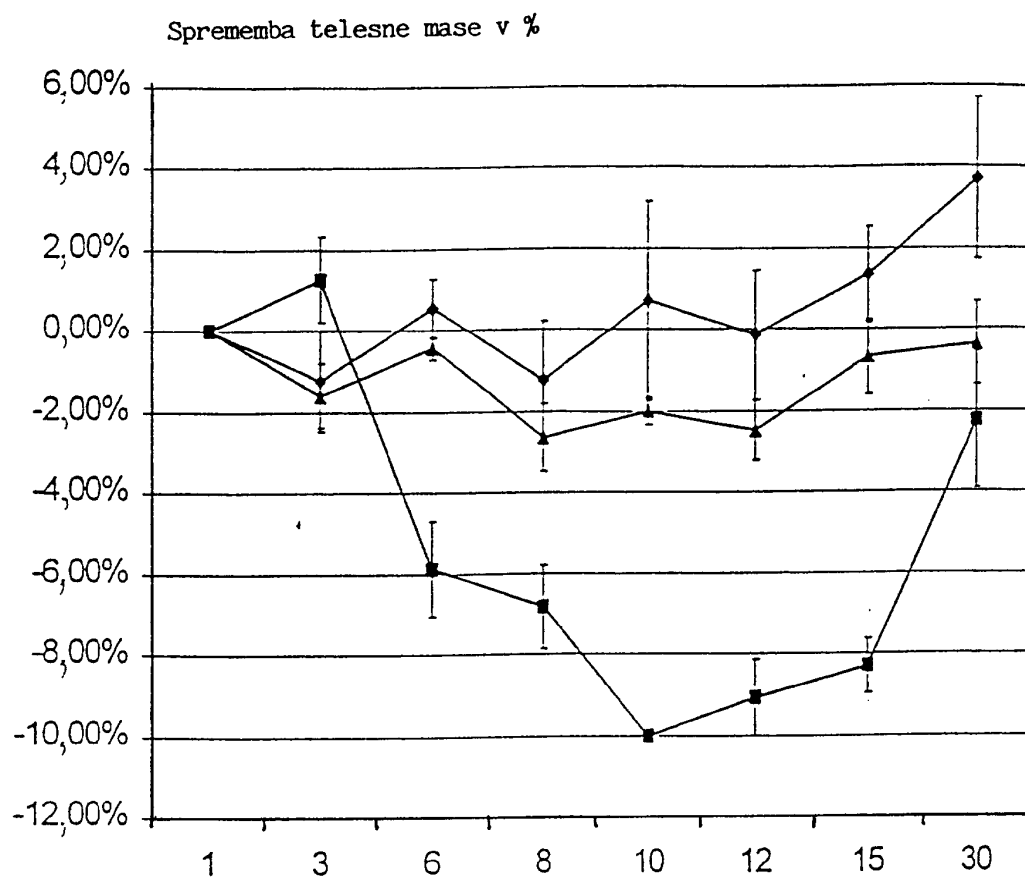
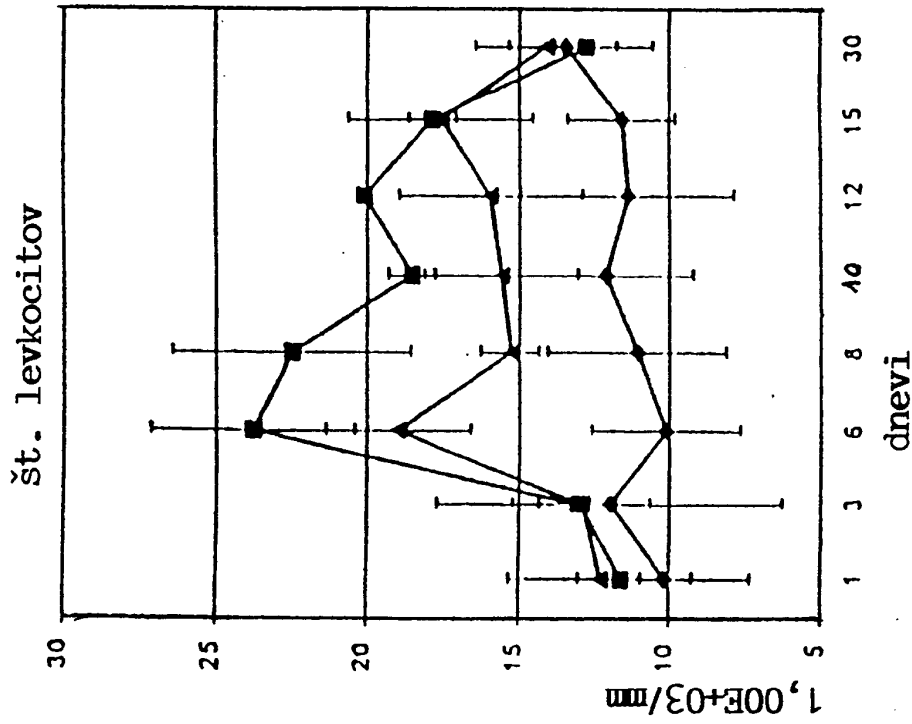


FIG. 9

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14

11/25

B



A

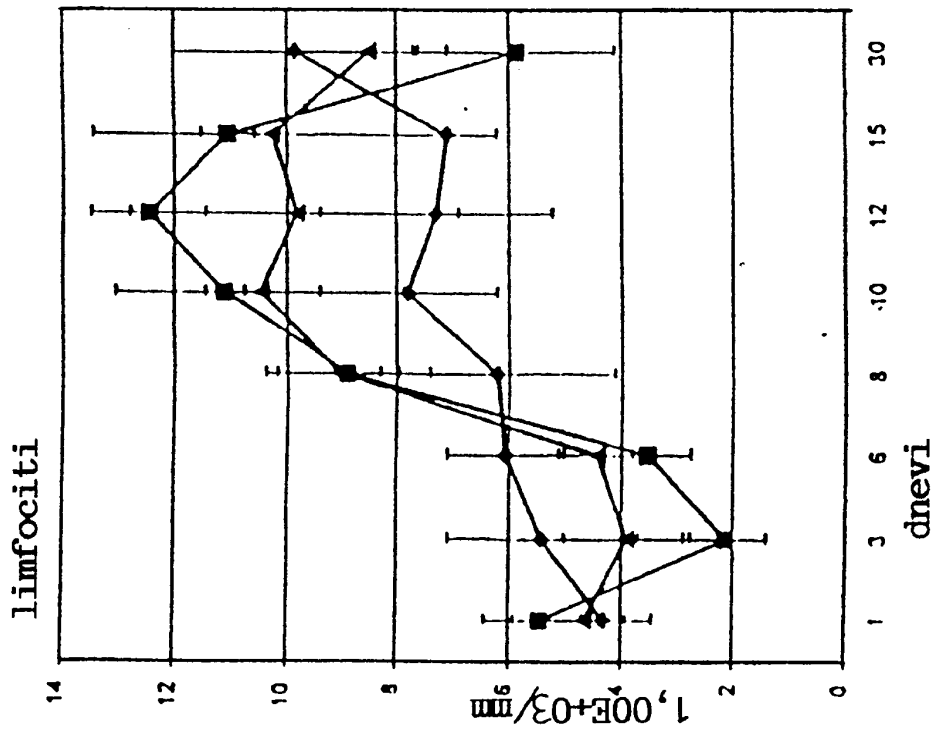


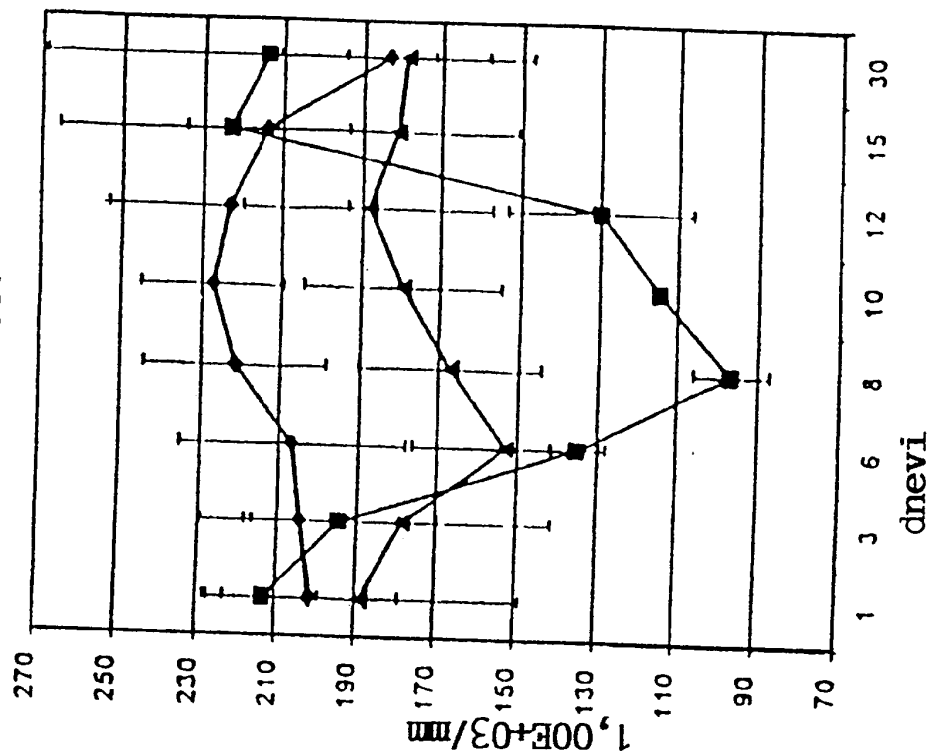
FIG. 10A-10B

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
 LJUBLJANA, ČOPOVA 14

12/25

D

št. trombocitov



C

nevtrofilci

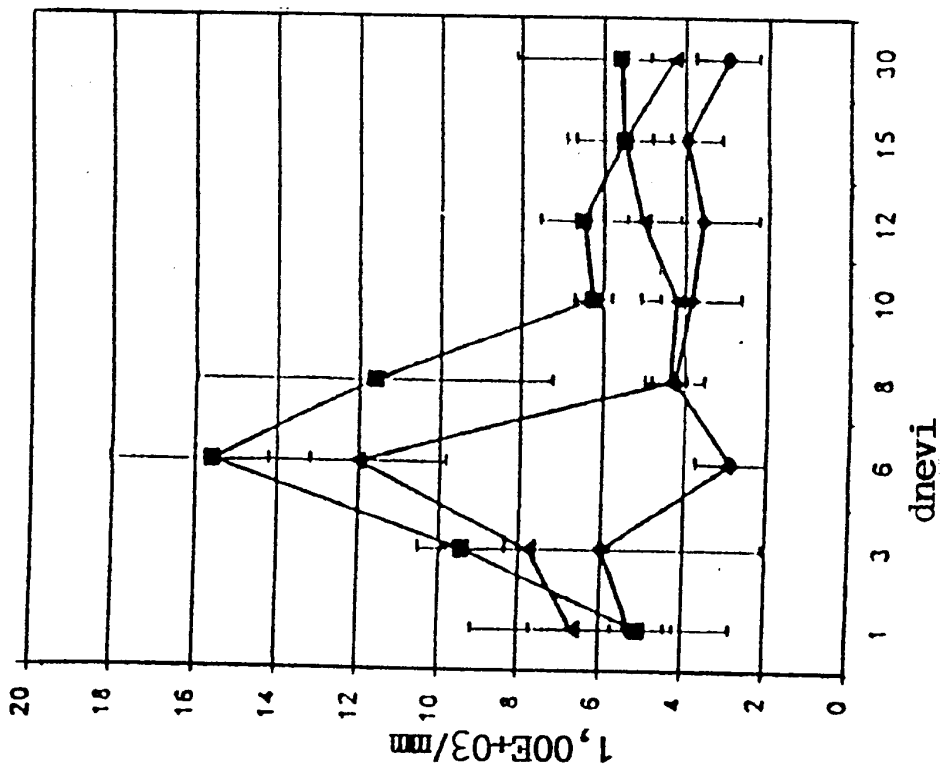


FIG. 10C - 10D

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14

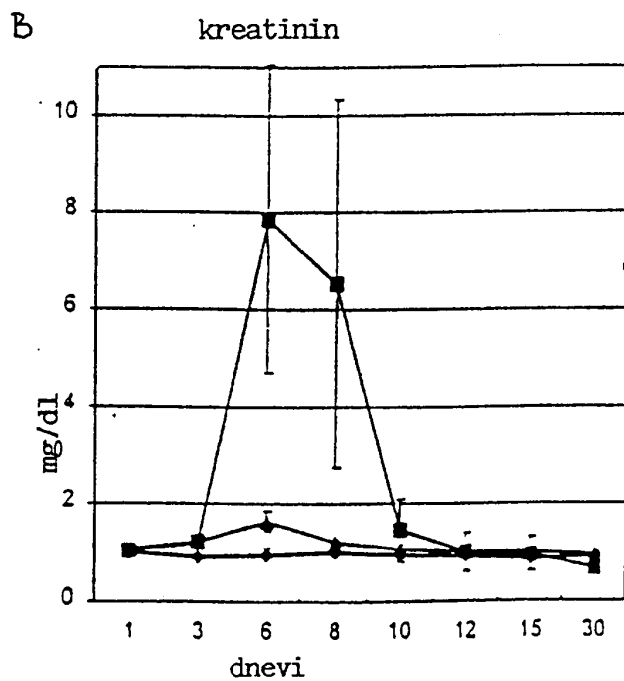
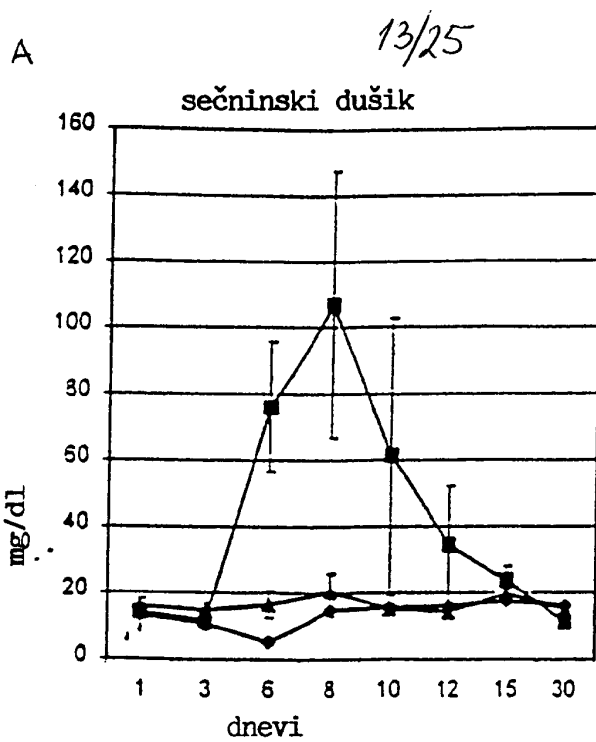


FIG. 11A -11B

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14

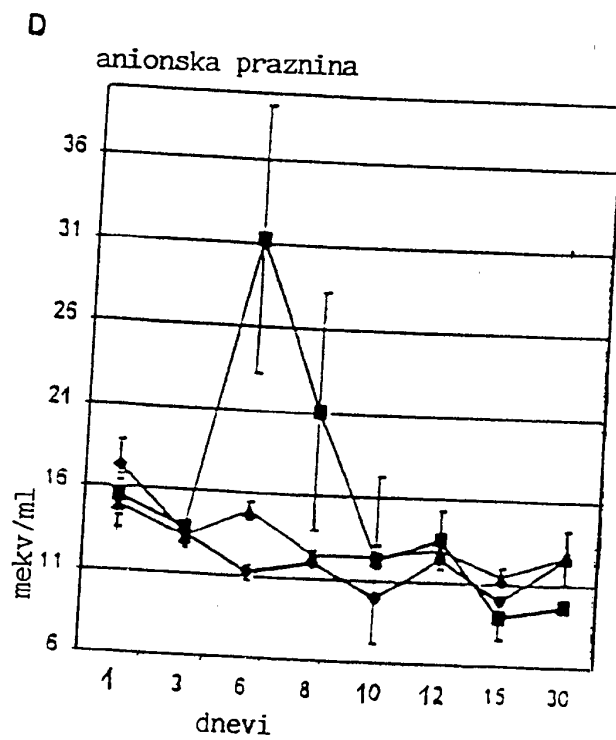
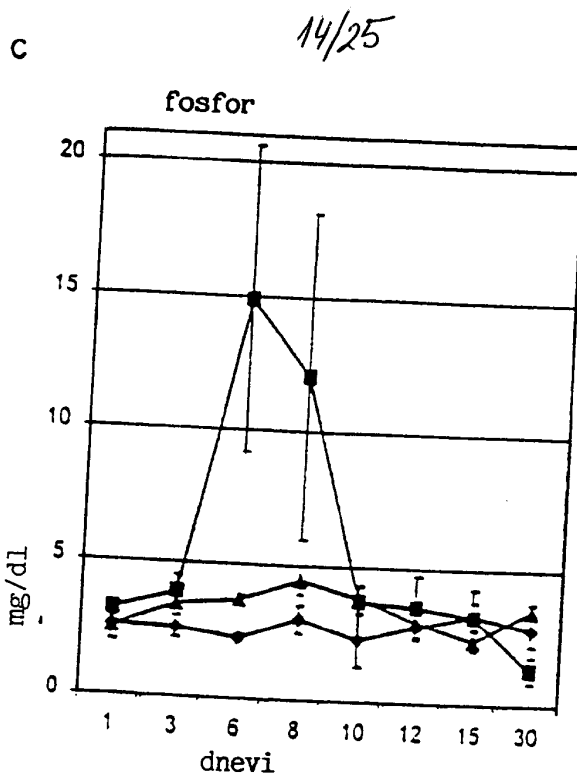


FIG. 11C - 11D

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14

15/25

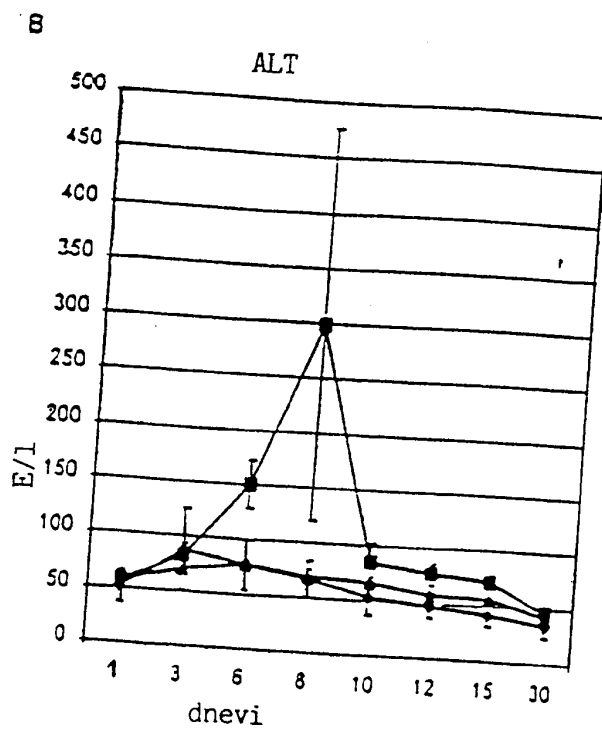
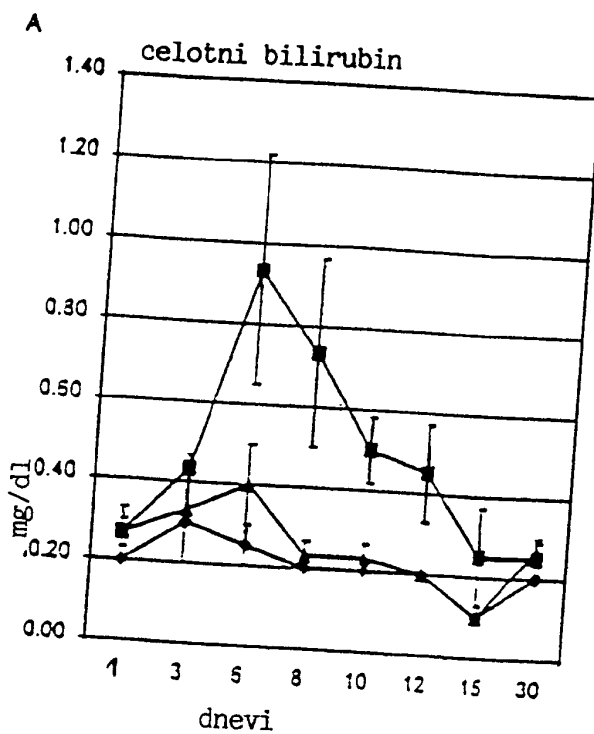


FIG. 12A- 12B

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, SLOVENIJA
6

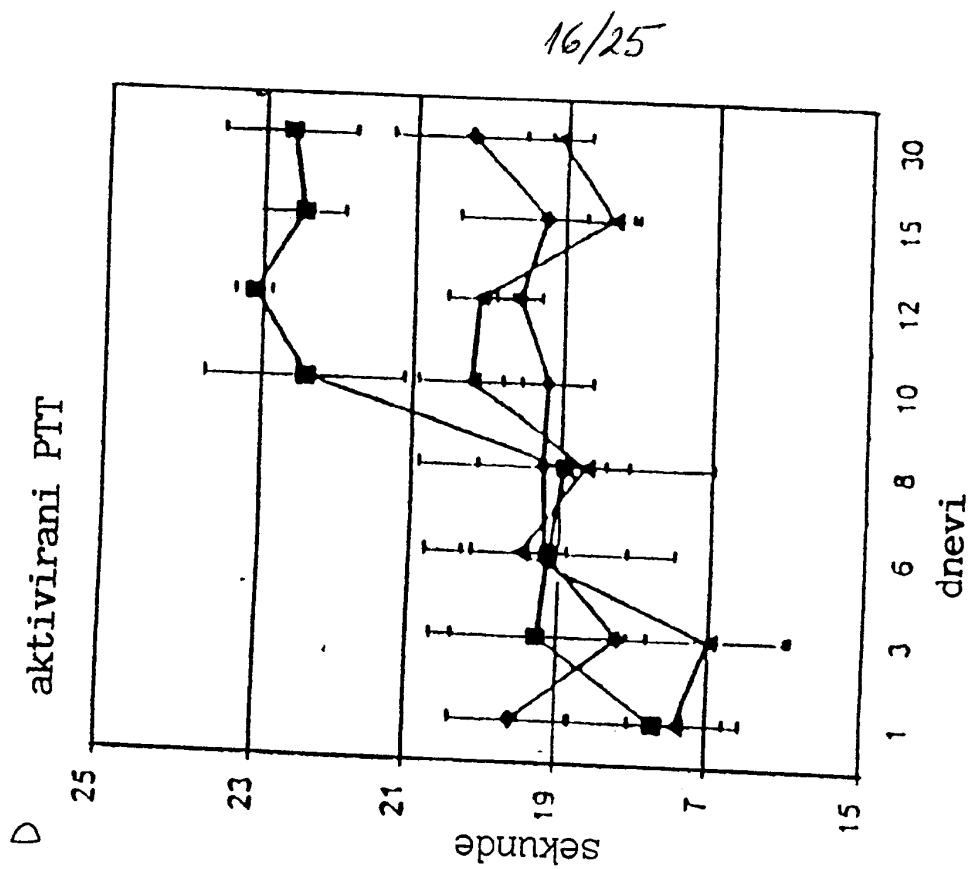
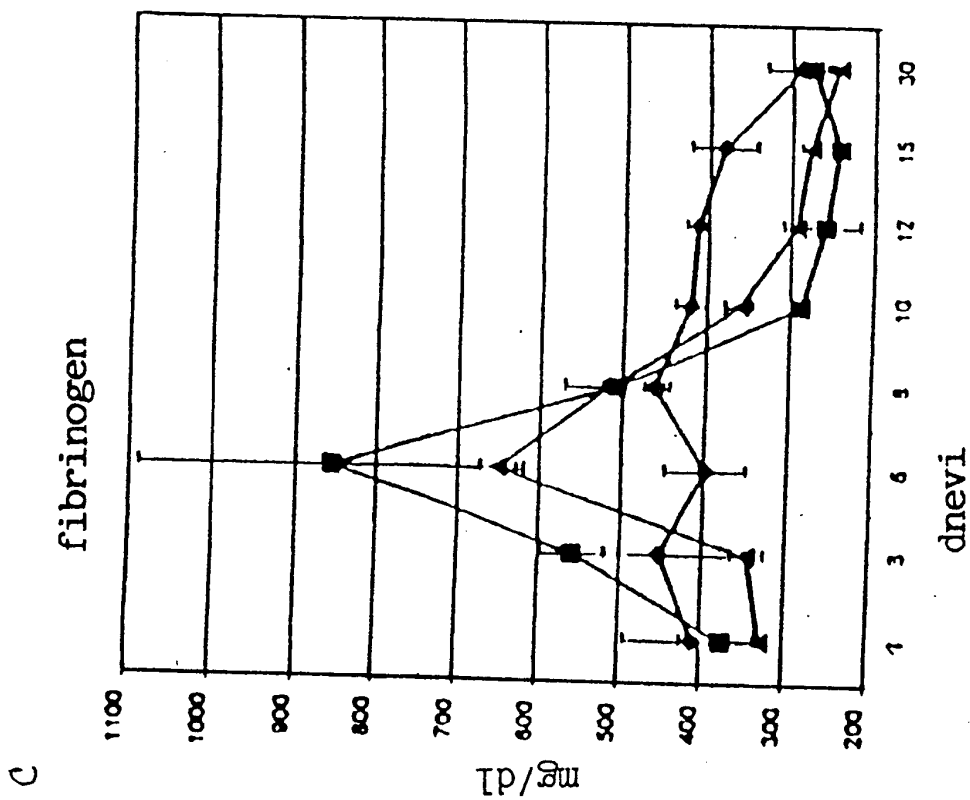
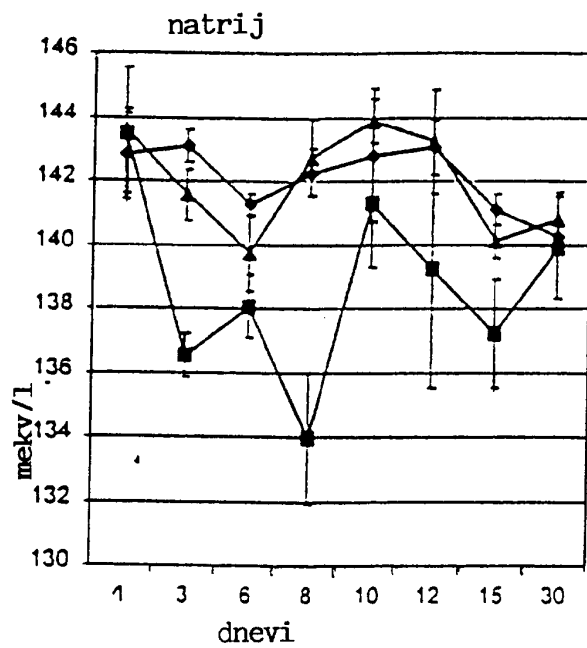


FIG. 12C - 12D

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14

17/25

A



B

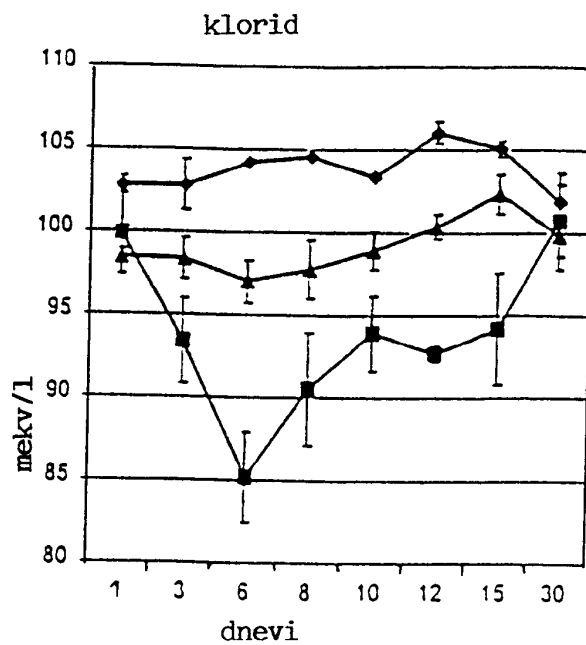


FIG. 13A - 13B

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
 UL. SLOVANSKA, 14
 1000 LJUBLJANA

18/25

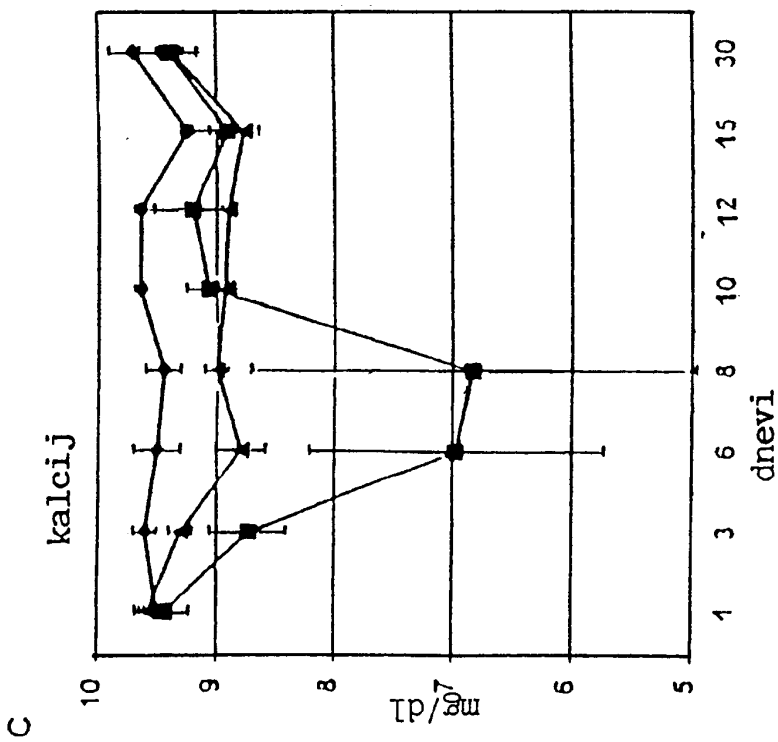
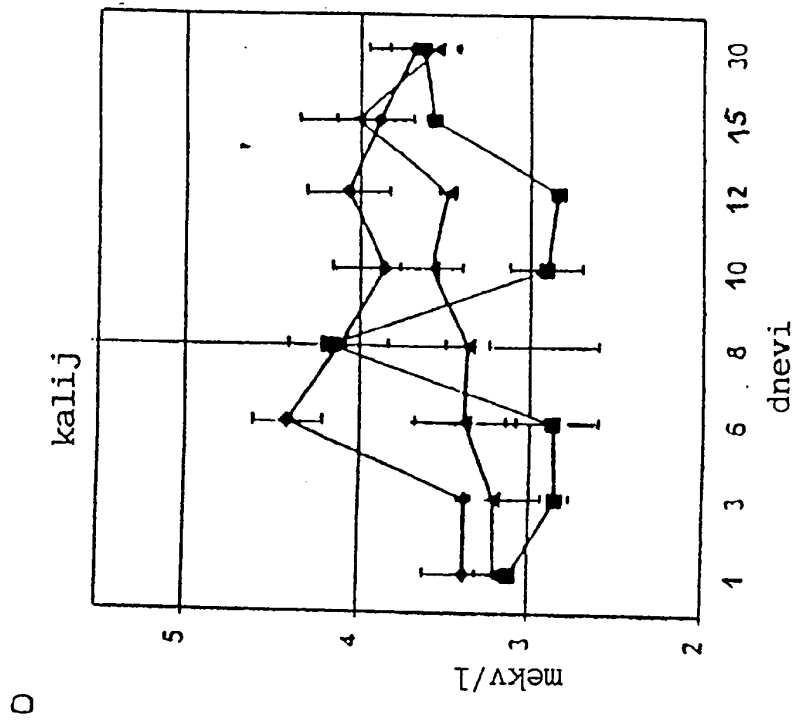


FIG. 13C - 13D

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14

Handwritten signature

19/25

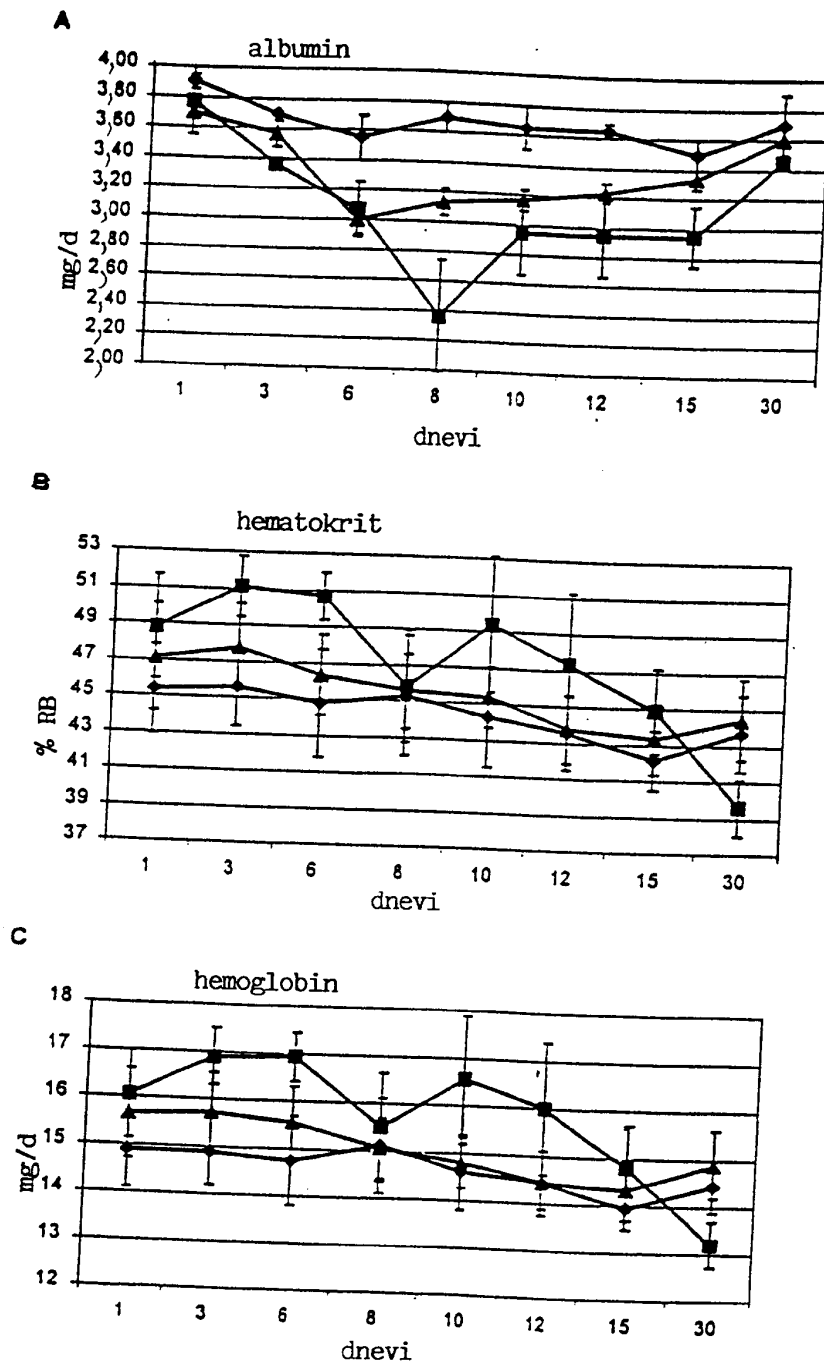


FIG. 14A - 14C

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14
6

20/25

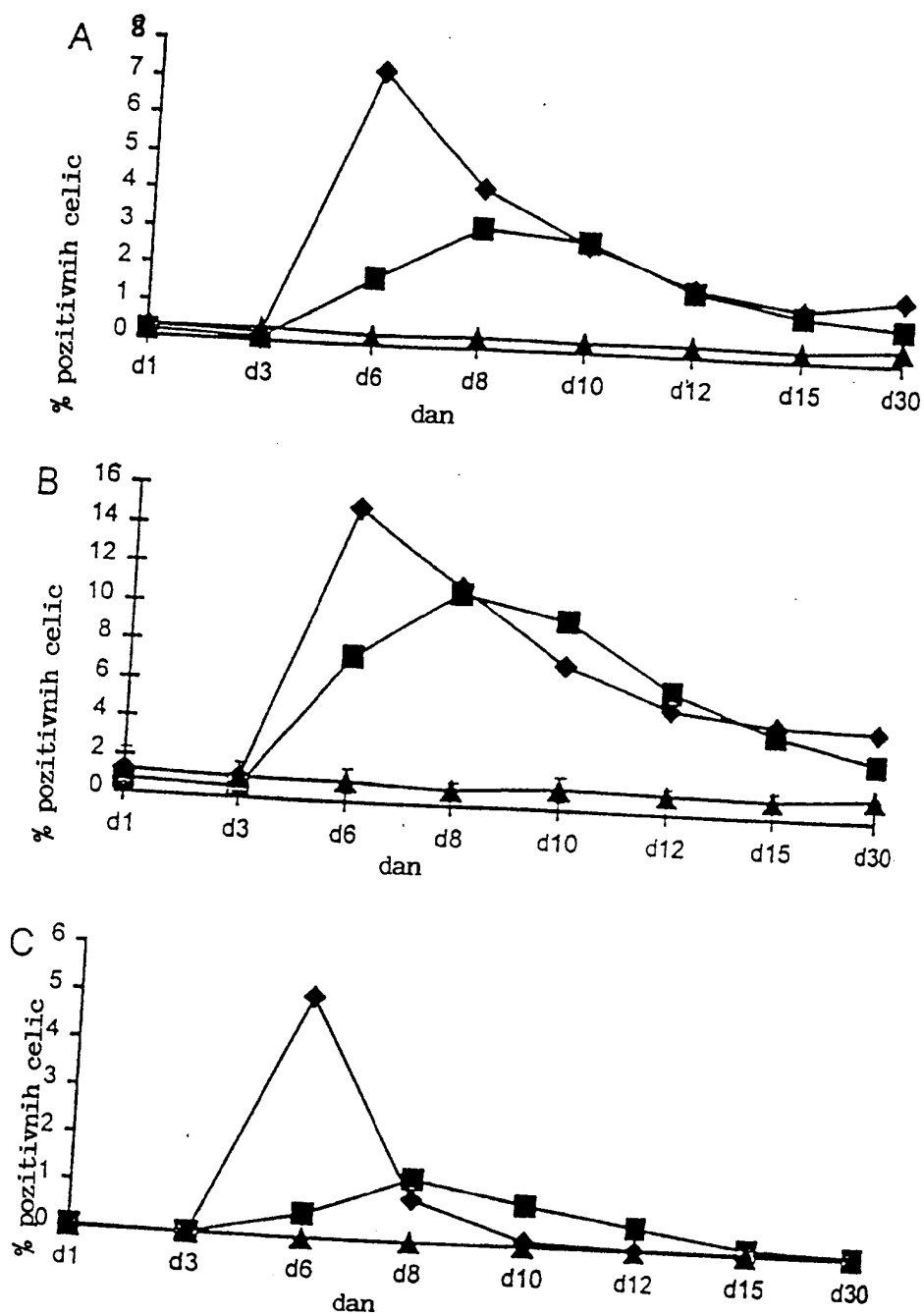


FIG. 15A - 15C

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14

6

21/25

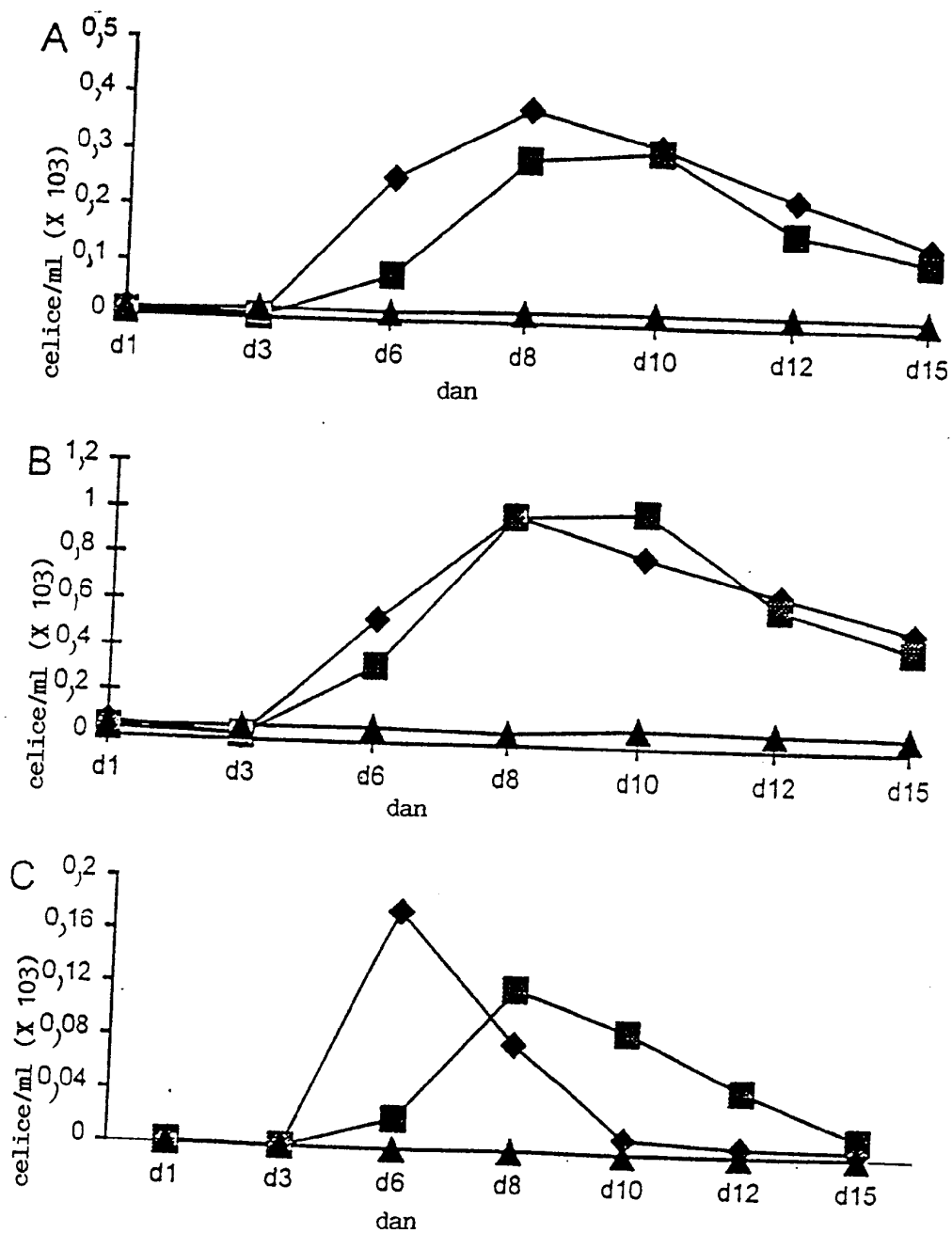


FIG. 16A - 16C

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14
6

22/25

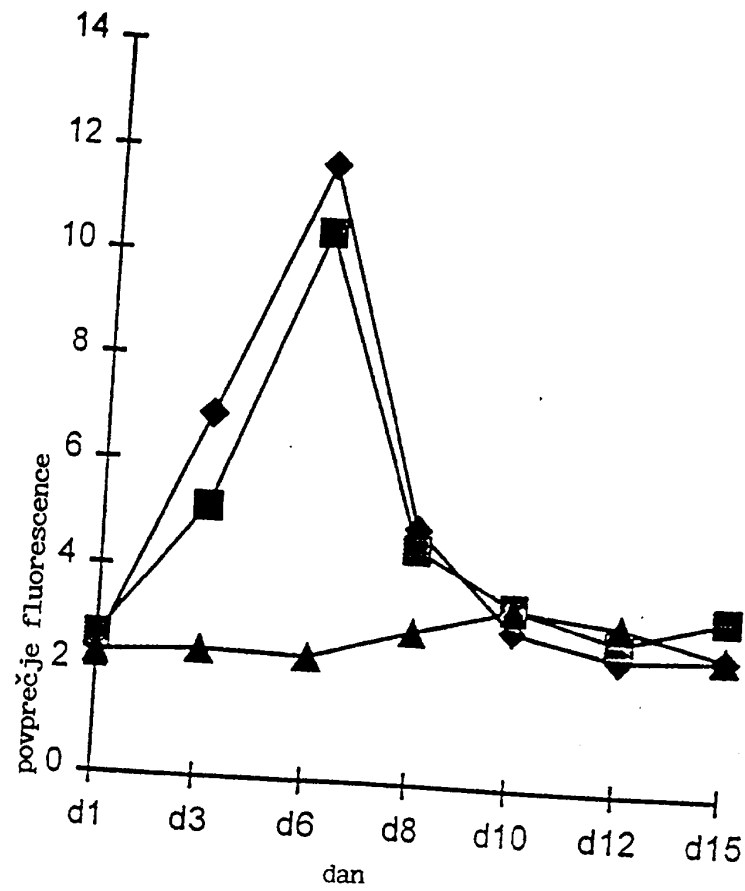


FIG. 17

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14
6

23/25

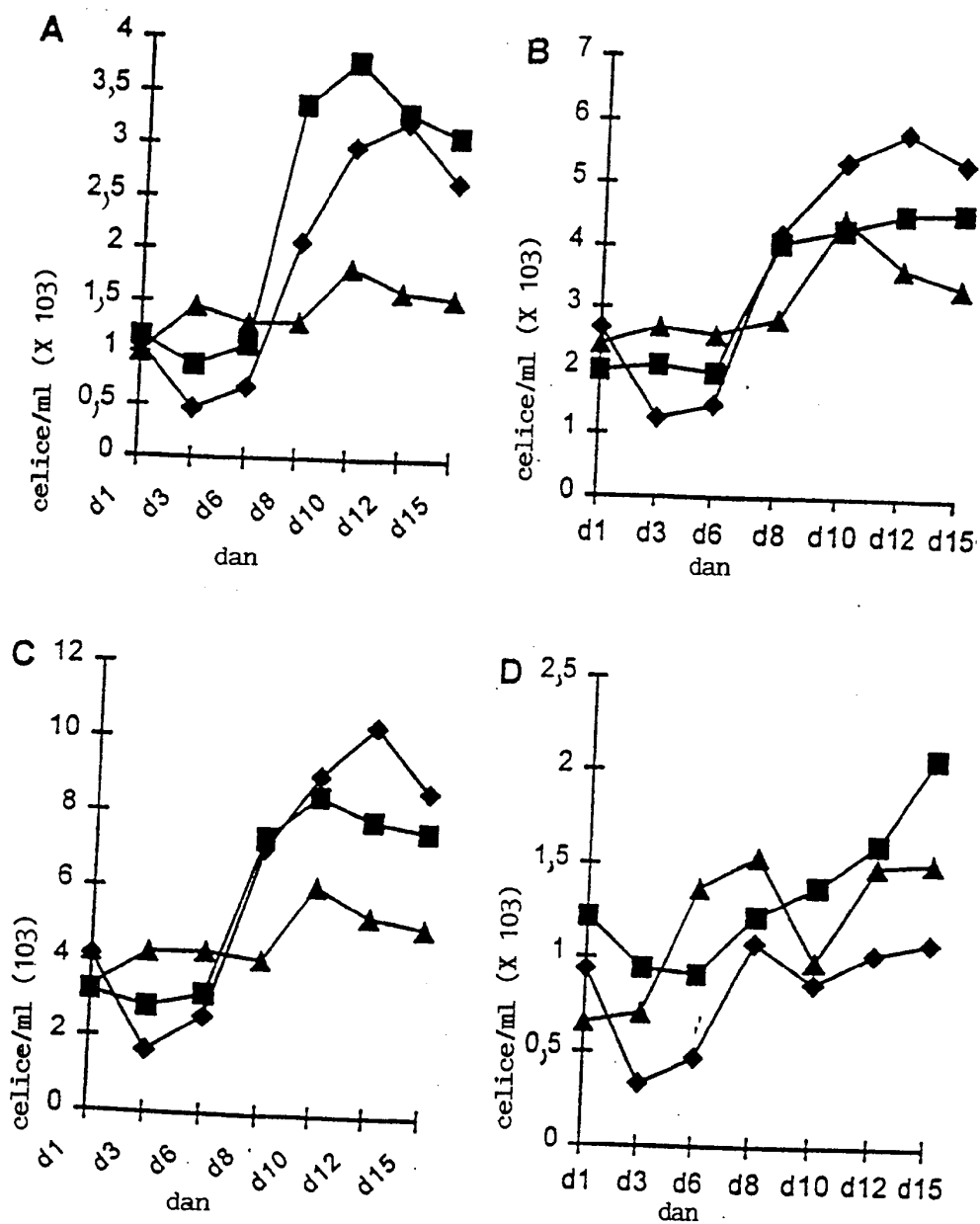


FIG. 18A - 18D

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14

6

Pu

24/25

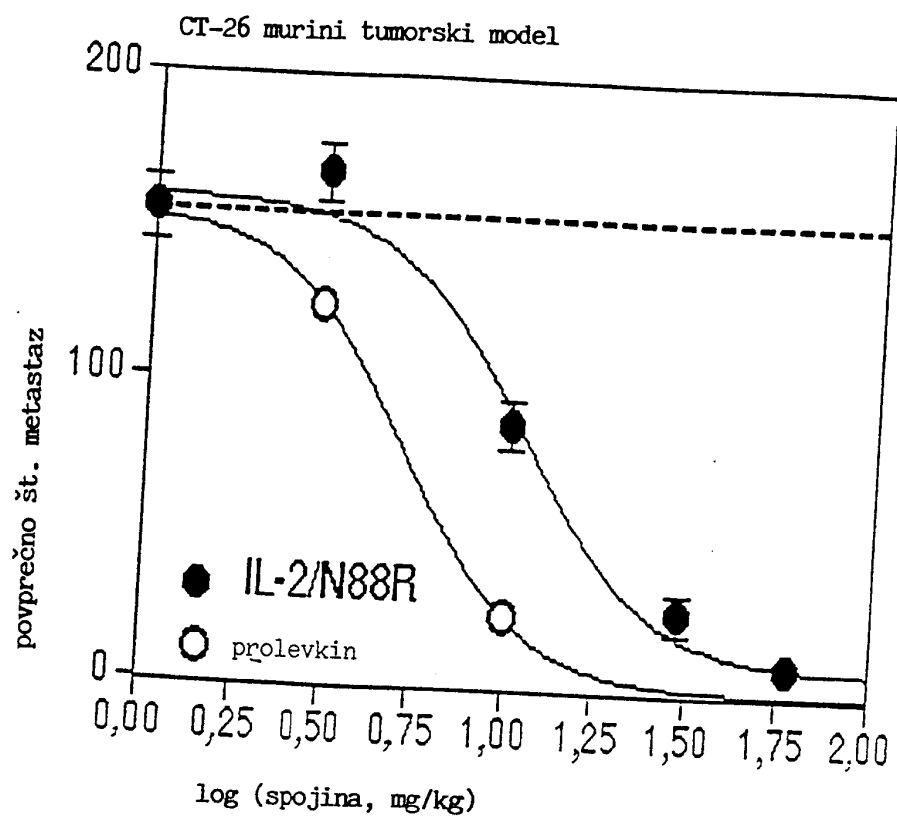


FIG. 19

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14

6

25/25

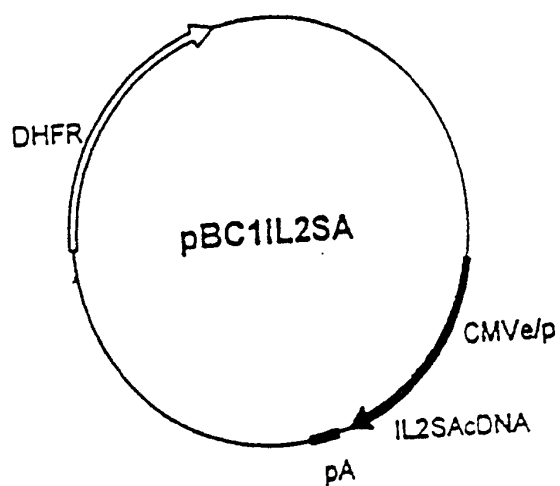


FIG. 20

PATENTNA AGENCIJA, d.o.o.
LJUBLJANA, COPOVA 14
6