



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 235 729** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **C 07 K 14/55, C 12 N 15/26, A 61 K 38/20, A 61 P 35/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

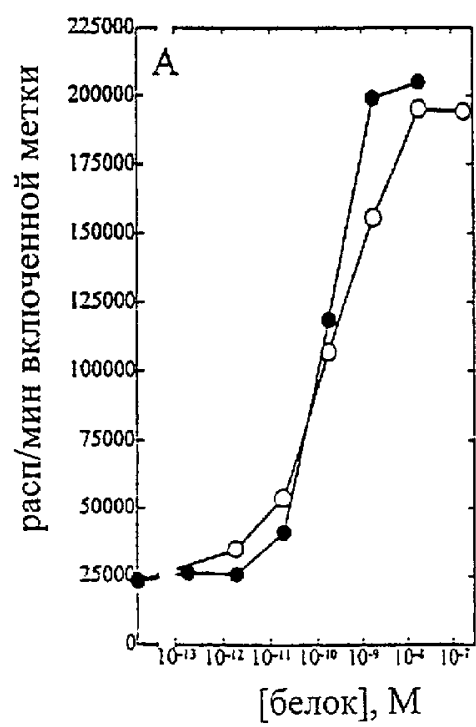
(21), (22) Заявка: 2000131593/04, 13.05.1999
(24) Дата начала действия патента: 13.05.1999
(30) Приоритет: 15.05.1998 US 09/080,080
(43) Дата публикации заявки: 20.04.2003
(46) Дата публикации: 10.09.2004
(56) Ссылки: XU D. et. al. European cytokine NETWORK. - 1995, v. 6, № 4, p. 237-244. ZURAWSKI S.M. et. al. EMBO journal. - 1990, v. 9, № 12, p.3899-3905. WO 9604306 A, 15.02.1996. RU 2107511 C1, 27.03.1998. RU 2003334 C1, 30.11.1998.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 15.12.2000
(86) Заявка РСТ: US 99/10643 (13.05.1999)
(87) Публикация РСТ: WO 99/60128 (25.11.1999)
(98) Адрес для переписки: 103064, Москва, ул. Казакова 16, НИИР-Канцелярия, "Патентные поверенные Квашнин, Сапельников и Партнеры", В.П.Квашнину

(72) Изобретатель: ШАНАФЕЛТ Армен Б. (US), ГРИВ Джеффри М. (US), ДЖЕСМОК Гари (US), ЛЕМБАЧ Кеннет Дж. (US), ВЭТЦЕЛЬ Гейл Д. (US)
(73) Патентообладатель: БАЙЕР КОРПОРЕЙШН (US)
(74) Патентный поверенный: Квашнин Валерий Павлович

(54) **СЕЛЕКТИВНЫЕ АГОНИСТЫ И АНТАГОНИСТЫ IL-2**

(57)
Изобретение относится к полипептиду (I), представляющему собой мутантный белок IL-2 человека с нумерацией согласно IL-2 дикого типа, где человеческий IL-2 замещен по крайней мере по одному положению, 20, 88 или 126, благодаря чему указанный мутантный белок активирует Т-клетки предпочтительно перед естественными киллерными (NK) клетками; фармацевтической композиции, обладающей иммуностимулирующей активностью, включающей полипептид I; полинуклеотиду, представляющему собой последовательность ДНК, кодирующую мутантный белок IL-2 человека; вектору pBC1IL 2SA для экспрессии

мутантного белка IL-2 человека; линии клеток яичников китайских хомячков; линии клеток африканской зеленой мартышки, штамму E.coli, линии клеток Spodoptera fugiperda, трансформированных вектором pBC1IL 2SA, которые продуцируют мутантный белок IL-2 человека; способу лечения млекопитающих, страдающих онкологическими заболеваниями, а также к способу отбора мутантных белков IL-2 по оценке их в исследованиях с применением IL-2R $\alpha\beta\gamma$ в сравнении с IL-2R $\beta\gamma$, где активность мутантного белка IL-2 повышается по отношению к IL-2 дикого типа в одном из исследований предпочтительно перед другим. 10 н. и 16 з.п.ф-лы, 8 табл., 20 ил.



Фиг. 1А



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 235 729** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 07 K 14/55, C 12 N 15/26, A 61 K 38/20, A 61 P 35/00**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2000131593/04, 13.05.1999

(24) Effective date for property rights: 13.05.1999

(30) Priority: 15.05.1998 US 09/080,080

(43) Application published: 20.04.2003

(46) Date of publication: 10.09.2004

(85) Commencement of national phase: 15.12.2000

(86) PCT application:
US 99/10643 (13.05.1999)

(87) PCT publication:
WO 99/60128 (25.11.1999)

(98) Mail address:
103064, Moskva, ul. Kazakova 16,
NIIR-Kantseljarija, "Patentnye poverennye
Kvashnin, Sapel'nikov i Partnery", V.P.Kvashninu

(72) Inventor: ShANAFELT Armen B. (US),
GRIV Dzhefri M. (US), DZhESMOK Gari
(US), LEMBACH Kennet Dzh. (US), VEhTTsEL'
Gejl D. (US)

(73) Proprietor:
BAJER KORPOREJShN (US)

(74) Representative:
Kvashnin Valerij Pavlovich

(54) **SELECTIVE AGONISTS AND ANTAGONISTS OF IL-2**

(57) Abstract:

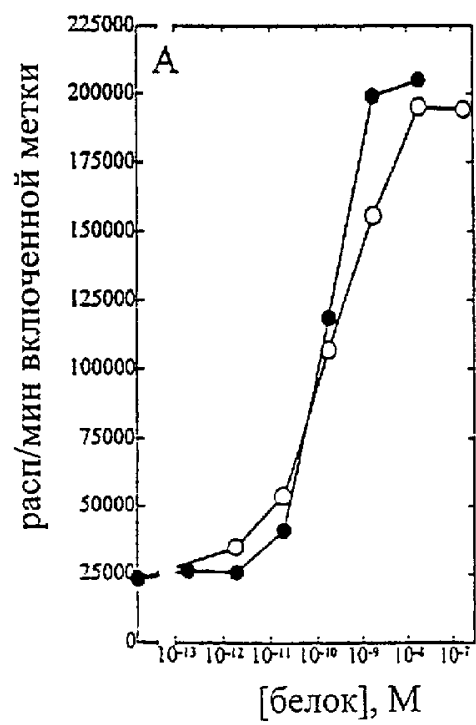
FIELD: molecular biology, proteins, biochemistry, pharmacy.

SUBSTANCE: invention relates to polypeptide (I) representing the mutant protein of human IL-2 (interleukin-2) wherein human IL-2 is substituted by at least one position (20, 88 or 126) that results to ability of mutant protein to activate T cells as compared with natural killer cell preferably. Invention relates also to a pharmaceutical composition eliciting with immunomodulating activity and comprising polypeptide (I); polynucleotide with DNA sequence encoding human mutant protein IL-2; vector pBC1IL 2SA used for expression of human mutant protein IL-2;

Chinese hamster ovary cell line; African green grivet cell line; strain E. coli; Spodoptera fugiperda cell strain transformed with vector pBC1IL 2SA that produce the human mutant protein IL-2; method for treatment of mammals suffering with oncological diseases and to a method for selection of mutant proteins IL-2 based on their estimation in investigations using IL-2R $\alpha\beta\gamma$ in comparison with IL-2R $\beta\gamma$ wherein activity of mutant protein IL-2 is enhanced with respect to IL-2 of wild type in some investigation as compared with another one.

EFFECT: valuable medicinal properties of polypeptide.

26 cl, 8 tbl, 20 dwg, 11 ex



Фиг. 1А

Предшествующий уровень техники

1. Область изобретения

Изобретение в общем относится к областям фармакологии и иммунологии. Более точно, изобретение направлено на новые соединения для селективного активирования Т-клеток (ФГА-бластов (Т-клеток, активированных фитогемагглютинином)) и снижения активирования естественных киллерных ("NK") клеток. Новые соединения включают варианты соединений семейства цитокинов, в частности человеческого интерлейкина-2 ("IL-2").

2. Описание области техники

Интерлейкин 2 (IL-2) является эффективным стимулятором иммунитета, активирующим различные клетки иммунной системы, включая Т-клетки, В-клетки и моноциты. IL-2 является также потенциальным и критическим фактором роста Т-клеток. Благодаря этим активностям IL-2 исследовали на возможность применения в лечении рака. Человеческий IL-2 является одобренным FDA (Управление по контролю за продуктами и лекарствами (США)) лекарством для лечения метастазирующей почечной карциномы и метастазирующей меланомы. Использование IL-2 у нуждающихся в нем пациентов ограничено из-за высокой токсичности, связанной с лечением Интерлейкином-2; по оценкам, в лучшем случае 20% пациентов хорошо переносят лечение. Токсичность, связанная с лечением IL-2, включает сильную лихорадку, тошноту, рвоту, сосудистую проницаемость и серьезную гипотензию. Несмотря на токсичность, IL-2 эффективен по своим показателям (объективный уровень ответа ~17%).

Несмотря на то, что проводился широкий структурный и функциональный анализ мышиного IL-2 (Zurawski, S. M. and 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. and Zurawski, G. (1992) *Embo J* 11: 3905-10; Zurawski, et al., *EMBO J*, 12: 5113-5119 (1993)), анализ человеческого IL-2 проводился ограниченно. Большинство исследований с мутантными белками IL-2 человека проводилось на мышиных клетках; однако ограниченное число исследований было проведено с использованием человеческих ФГА-бластов (Т-клетки, обработанные фитогемагглютинином), экспрессирующих высокоаффинный IL-2 рецептор IL-2R $\alpha\beta\gamma$. Исследования с использованием ФГА-бластов подтвердили значимость остатков Asp-20 и D-спирали человеческого IL-2. Было показано, что положения Asp-20 и Gln-126 являются основными остатками, отвечающими за взаимодействие с β - и γ -субъединицами рецептора IL-2 соответственно (описано в Theze, et al., *Immunol. Today*, 17,481-486 (1996)). Хотя было показано, что остатки в С-спирали мышиного IL-2 участвуют во взаимодействии с мышиным IL-2R ((Zurawski, et al., *EMBO J*, 12 5113-5119 (1993)), не было показано, что эквивалентные остатки в человеческом IL-2 обладают такими же свойствами (эти остатки в человеческом IL-2 соответствуют Asp-84 и Asn-88). Так как показана значительная видоспецифичность

для человеческого и мышиного IL-2 (активность человеческого IL-2 в мышиных клетках снижена ~ в 100 раз), сложно предсказать, происходят ли сходные взаимодействия в пределах вида. Ничего не известно об исследованиях с использованием клеток, экспрессирующих только человеческий рецептор IL-2R $\beta\gamma$ со средней аффинностью.

Была исследована активность некоторых мутантных белков IL-2 человека на человеческих ФГА-блестах (Xu, et al., *Eur. Cytokine Netw*, 6, 237-244 (1995)). Было показано, что мутантные белки, содержащие замены Asp-20 на лейцин (D20L), а также аргинин, аспарагин и лизин, сильно дефектны по способности индуцировать пролиферацию ФГА-бластов. Таким образом следует, что замена Asp-20 приведет к образованию мутантных белков с ограниченной активностью. Кроме того, в работе Xu et al. утверждается, что к 1995 г. не было идентифицировано мутантных белков IL-2, полезных для клинического или исследовательского применения.

Мутантный белок человеческого IL-2 Q126D, полученный Buchli и Ciardelli, *Arch. Biochem. Biophys*, 307(2): 411-415, (1993), обладает значительно сниженной активностью как по основному свойству, так и в агонизме; в эксперименте с Т-клетками человека он проявил активность, в 1000 раз меньшую, чем IL-2, и вел себя как частичный агонист. В эксперименте с мышиными Т-клетками мутантный белок был почти неактивен. Обе исследованные клеточные линии экспрессируют высокоаффинную форму рецептора IL-2. В клетках обоих типов была показана способность Q126D быть антагонистом IL-2-опосредованной активности, хотя в эксперименте с человеческими Т-клетками - только частично.

Zhi-yong, W., et al., *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 25(5): 558-560 (сентябрь 1993 г.) провели эксперименты по замене в IL-2 в положениях 62, 69, 99 и 126, демонстрирующие 20- и 30-кратное снижение активности 62-Leu-IL-2 и 126-Asp-IL-2 соответственно по сравнению с IL-2 дикого типа в эксперименте с мышиными Т-клетками (CTLL-2). Однако не сделано вывода или предположения о том, что замены по положению 126 могут обусловить активность, селективную к Т-клеткам по сравнению с NK клетками, или показать, будут ли такие замены иметь сходный эффект в человеческих Т-клетках.

В работе Collins et al., *PNAS USA* 85:7709-7713 (1988) сообщается, что замена Asp в положении 20 на Asn (D20N) или Lys (D20K) приводит к потере связывания как с рецептором высокой (IL-2R $\alpha\beta\gamma$, обозначенным в работе Collins et al. p55/p70), так и (промежуточной) средней аффинности (IL-2R $\beta\gamma$, обозначенным p70) в 100-1000 раз по сравнению с человеческим IL-2. Связывание с IL-2R α оказалось неизменным для обоих мутантных белков. Из этой работы следует, что нарушение связывания с IL-2-рецептором промежуточной (средней) аффинности (IL-2R $\beta\gamma$) приведет к нарушению связывания и с высокоаффинным IL-2- рецептором (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), при этом предполагается, что раздельное связывание или активация между IL-2R $\beta\gamma$ или

IL-2R $\alpha\beta\gamma$ недостижимы путем замены Asp в положении 20.

Brendt, W.G., et al., *Biochemistry* 33 (21):6571-6577 (1994) использовали комбинаторный кассетный мутагенез для одновременной замены положений 17-21 в природном IL-2, предполагается, что эти положения взаимодействуют с IL-2-рецептором промежуточной (средней) аффинности. Из 2610 проанализированных клонов только 42 были активны. Было обнаружено, что положения 20 и 21 имеют первостепенное значение для биологической активности. Не сделано предположений или выводов об индивидуальных заменах, за исключением L21V.

В патенте США №5229109 (Grimm et al.) утверждается низкая токсичность аналогов IL-2 при использовании в иммунотерапии и лечении рака. Свойства двух аналогов IL-2 с заменами в положениях Arg38 (на аланин) и Phe42 (на лизин) были изучены и сравнены со свойствами природного IL-2. Было обнаружено, что аналоги способны поддерживать способность связываться с промежуточным рецептором IL-2 при минимальном связывании с так называемым "высокоаффинным" рецептором. В то же время предполагалось, что рецептор с промежуточной (средней) аффинностью состоит только из p75 (IL-2R β), а рецептор с высокой аффинностью состоит только из рецепторного комплекса p55+p75 (IL-2R $\alpha\beta$). Также аналоги поддерживали способность стимулировать мононуклеарные клетки периферийной крови к производству лимфокин-активированных киллеров (LAK). Следует отметить, что секреция IL-1 β и TNF α в ответ на аналоги была значительно снижена по сравнению с природной молекулой IL-2. В этом патенте описаны аминокислотные остатки, которые будут специфически взаимодействовать с IL-2R α (p55); исключение взаимодействия с IL-2R α приведет к снижению активности на клетках, несущих высокоаффинный IL-2 рецептор, и не повлияет на активность клеток, несущих IL-2 рецептор с промежуточной активностью. Таким образом, продукция LAK клеток (предполагается, что они являются производными NK-клеток) будет поддерживаться. Мутации в белках, описанные здесь, направлены на аминокислотные положения 20, 88 и 126; считается, что эти положения специфически взаимодействуют с IL-2R β (p75; положения 20 и 88) и IL-2R γ (на момент подачи патента Grimm et al. неизвестно; положение 126). Как следствие, взаимодействие с IL-2R α остается неизменным. С механистической точки зрения мутантные белки, описанные Grimm et al., будут характеризоваться сниженным взаимодействием с высокоаффинным рецептором IL-2, но не повлияют на активность IL-2-рецептора с промежуточной (средней) аффинностью; мутантные белки, описанные в данной работе, обладают противоположными характеристиками, они характеризуются значительным дефектом по способности к взаимодействию с IL-2-рецептором с промежуточной аффинностью IL-2R $\beta\gamma$, и очень слабо или совсем не дефектны по функциональным

взаимодействиям с высокоаффинным IL-2-рецептором, IL-2R $\alpha\beta\gamma$.

В патенте США №5206344 (Gordon et al.) описаны мутантные белки IL-2, в которых одна из аминокислот зрелой нативной последовательности IL-2 заменена на цистеиновый остаток, затем эти белки обрабатывали и через замещенный цистеиновый остаток конъюгировали с полимером, выбираемым из ряда гомополимеров полиэтиленгликоля или полиоксиэтилированных полиолов, где гомополимеры не замещены или замещены с одного конца алкильной группой. Эти мутантные белки получают экспрессией в хозяине мутантных генов, эти гены были поставлены вместо генов, кодирующих белки хозяина, методом сайт-направленного мутагенеза. Кроме того, другие виды IL-2 могут быть конъюгированы через цистеиновый остаток в положении 125 зрелого IL-2, которое не является необходимым для биологической активности IL-2. Мутации, обуславливающие пониженную токсичность, не описаны.

В патенте США №4959314 (Lin et al.) описаны мутанты биологически активных белков, таких как IFN- β и IL-2, в которых цистеиновые остатки, не важные для биологической активности, были удалены или замещены на другие аминокислотные остатки для исключения сайтов межмолекулярного кросслинкинга или образования незаконных дисульфидных мостиков. Такие мутантные белки получают экспрессией в бактериях мутантных генов, эти гены были синтезированы из генов, кодирующих белки хозяина, методом олигонуклеотид-направленного мутагенеза. Мутации, обуславливающие пониженную токсичность, не описаны.

В патенте США №5116943 (Halenbeck et al.) описано, что биологически активный стандартный терапевтический белок защищают от окисления способом, включающим замещение каждого метионинового остатка, подверженного окислению хлорамином T или пероксидом, на консервативную аминокислоту, причем дополнительные, невосприимчивые к окислению метиониновые остатки не замещают. Устойчивым к окислению мутантным белком, получаемым таким образом, является предпочтительно мутантный белок интерлейкина-2 или интерферона- β человека, а консервативной аминокислотой - наиболее предпочтительно аланин. Мутации, обуславливающие пониженную токсичность, не описаны.

Патент США №4853332 (Mark et al.) описывает мутантные белки IFN- γ и IL-2, в которых цистеиновые остатки, не важные для биологической активности, были удалены или замещены другими аминокислотами для исключения сайтов межмолекулярного кросслинкинга или образования незаконных дисульфидных мостиков. В патенте заявлено, что замена в IL-2 цистеина в положении 125 на серин приводит к образованию мутантного белка с активностью, сравнимой с нативным IL-2.

Патент США №5696234 (Zurawski et al.) описывает мутантные белки цитокинов млекопитающих и способы поиска агонистов и антагонистов цитокинов млекопитающих. В

частности показано, что двойной мутант человеческого IL-2, P82A/Q126D, обладает антагонистической активностью на мышинных клетках Baf3, котрансфицированных α - и β -субъединицами IL-2R человека. Показано наличие небольшой агонистической активности. Также показано, что мутанты мышино IL-2 демонстрируют частичную агонистическую и антагонистическую активность на HT2 клетках, в частности это мутанты Q141D, Q141K, Q141V и Q141L. Активности мутантных белков, подтверждающие или предполагающие избирательный агонистический эффект мутаций по положениям 20, 88 и 126, не описаны.

Zurawski et al, описывает мутантные белки мышино IL-2, которые активны на клетках, экспрессирующих IL-2R $\alpha\beta\gamma$, и неактивны на клетках, экспрессирующих IL-2R $\beta\gamma$ (Zurawski, G., Trends Biotechnol. 9: 250-257 (1991); Zurawski, S.M. and Zurawski, G. Embo. J. 11:3905-3910 (1992)). Мутантные мышинные белки IL-2, обладающие такими свойствами, имеют замены Asp-34 на Ser или Thr, и Gln-141 на Lys. Asp-34 и Gln-141 мышино IL-2 эквивалентны Asp-20 и Gln-141 человеческого IL-2 соответственно. Хотя эти ссылки относятся к мутантным белкам IL-2 - "селективным агонистам", преимущественно описывается потенциал этих белков как антагонистов эндогенного IL-2, но не потенциал их более низкой токсичности.

В EP 0267795 A2 (Zurawski et al.) описан ряд мутантных белков мышино IL-2 по последовательности, включая мутанты, содержащие делеции и/или замены внутри первой трети биологически важных N-концевых аминокислотных остатков, но туда не включены, не обсуждаются и не предлагаются аминокислотные замены, предлагаемые в настоящей работе на эквивалентных остатках мышино IL-2. Существует потребность в улучшенной молекуле IL-2 с пониженной токсичностью и большей общей переносимостью.

Патент США №4738927 (Taniguchi et al.) описывает рекомбинантную ДНК, включающую рекомбинантную ДНК, кодирующую полипептид с биологической активностью IL-2, причем указанная активность - это стимулирование роста клеточной линии цитотоксических Т-лимфоцитов, и векторную ДНК, способную реплицироваться в прокариотических и эукариотических клетках; кодирующая последовательность указанного гена расположена в направлении вниз от промоторной последовательности, причем указанный полипептид в общем представляет собой от 132 до 134 аминокислот в аминокислотной последовательности полипептида. В работе также описаны ген, рекомбинантные ДНК векторы, клетки хозяина и способы рекомбинантного получения нативного IL-2. Taniguchi et al. не описывают варианты мутантных белков и не указывают положения в белке, отвечающие за сигнальную и связывающую активности.

Ясно, что мутантные белки IL-2, не обладающие ограничивающей дозу токсичностью получаемых ранее рекомбинантных белков IL-2, необходимы для использования терапевтических преимуществ этого цитокина.

Краткое изложение изобретения

Изобретение описывает полипептид, включающий мутантный белок человеческого IL-2, нумерованный согласно IL-2 дикого типа, где указанный человеческий IL-2 замещен по крайней мере по одному из положений 20, 88 или 126, посредством чего указанный мутантный белок активирует Т-клетки предпочтительно перед NK-клетками. Данное изобретение представляет менее токсичный мутантный белок IL-2, дающий возможность более широкого использования этого интерлейкина.

Кроме того, изобретение включает мутантные белки IL-2, содержащие единичные мутации по положениям Аспарат 20, Аспарагин 88 и Глутамин 126. Специфические мутантные белки обозначены D20X, N88X и Q126X, где X - специфическая аминокислота, которая, будучи замещенной в человеческий IL-2, обуславливает избирательную активность клеток, экспрессирующих IL-2R $\alpha\beta\gamma$ рецептор (например, Т-клеток), преимущественно перед клетками, экспрессирующими IL-2R $\beta\gamma$ рецептор (например, NK-клетками). Мутантные белки, обладающие более чем 1000-кратной селективностью, включают D20N, D20I, N88G, N88I, N88R и Q126L. В частности, эти белки демонстрируют также существенную активность IL-2 дикого типа на Т-клетках. Также идентифицированы другие мутации, обеспечивающие менее чем 1000-, но более чем 10-кратную селективность. Изобретение включает также полинуклеотиды, кодирующие входящие в изобретение мутантные белки, векторы, содержащие полинуклеотиды, трансформированные клетки хозяина, фармацевтические композиции, включающие мутантные белки, и терапевтические способы лечения с использованием этих белков.

Изобретение также включает способ отбора мутантных белков IL-2 по результатам анализов с использованием IL-2R $\alpha\beta\gamma$ в сравнении с IL-2R $\beta\gamma$, где активность мутантного белка IL-2 в одном анализе по сравнению с другим возрастает по отношению к IL-2 дикого типа. IL-2R $\alpha\beta\gamma$ и IL-2R $\beta\gamma$ представляют собой индивидуальные рецепторные субъединичные эктодомены в соответствующей конфигурации и используются для прямого измерения связывания мутантных белков IL-2 с каждым рецепторным комплексом. Анализ с использованием IL-2 $\alpha\beta\gamma$ учитывает ответ от IL-2 $\alpha\beta\gamma$ -несущих клеток, а анализ с использованием IL-2 $\beta\gamma$ - ответ от IL-2 $\beta\gamma$ -несущих клеток. IL-2 $\alpha\beta\gamma$ -несущими клетками являются ФГА-бласты, а IL-2 $\beta\gamma$ -несущими - NK-клетки. В анализе исследуется пролиферация и IL-2 $\alpha\beta\gamma$ - и IL-2 $\beta\gamma$ -несущих клеток.

Изобретение также относится к вектору, включающему полинуклеотид, кодирующий указанный в этом изобретении мутантный белок, вектору, обуславливающему экспрессию мутантного белка человеческого IL-2, обладающего способностью активировать ФГА-бласты и сниженной способностью активировать NK-клетки, вектору, способному обеспечить трансфекцию организма-мишени и последующую экспрессию in vivo мутантного белка

человеческого IL-2, кодируемого указанным полинуклеотидом.

Изобретение относится также к способу лечения больных, пораженных IL-2-излечиваемым заболеванием, путем назначения терапевтически эффективных количеств мутантного белка человеческого IL-2, нумерованного в соответствии с IL-2 дикого типа, обладающего способностью активировать ФГА-бласты и сниженной способностью активировать NK-клетки. Этот способ применим при состояниях, поддающихся лечению IL-2, таких как ВИЧ, рак, аутоиммунное заболевание, инфекционное заболевание; как адъювант при противораковой вакцине и обычной вакцинотерапии, для иммунной стимуляции в преклонном возрасте или при иммунистете, ослабленном другим образом, а также у пациентов с ГКИ (глубокий комбинированный иммунодефицит) и для других терапевтических целей, требующих стимуляции иммунной системы.

Краткое описание чертежей

Фиг.1-7 показывают кривые зависимости от доз для человеческого IL-2 дикого типа (IL-2) и D20H (фиг.1), IL-2 и D20I (фиг.2), IL-2 и N88G (фиг.3), IL-2 и N88I (фиг.4), IL-2 и N88R (фиг.5), IL-2 и Q126E (фиг.6), IL-2 и Q126L (фиг.7). А: Индивидуальный ответ на дозу IL-2 (закрашенные кружки) и мутантного белка (незакрашенные кружки) в исследовании пролиферации первичных Т-клеток человека (ФГА-бластов). В: Индивидуальный ответ на дозу IL-2 (закрашенные кружки) и мутантного белка (незакрашенные кружки) в исследовании пролиферации первичных NK-клеток.

Фиг.8А-8D. Токсичность пролейкина PROLEUKIN™ у шимпанзе оценивалась на двух животных (Х-159, треугольники, и Х-124, квадраты) по сравнению с наполнителем в качестве контроля (Х-126, ромбы). Токсичность оценивали по почечным параметрам (азот мочевины крови (BUN), А; креатинин, В) и функции печени (общий билирубин, С; аланин аминотрансфераза (ALT), D).

Фиг.9. График процентного изменения массы тела в течение 30 дней. Масса тела животных, которым давали IL-2/N88R (треугольники), пролейкин (квадраты) или наполнитель (ромбы), измерялась в указанные дни.

Фиг.10А-10D. Количество лимфоцитов (А), общих лейкоцитов (В), нейтрофилов (С) и тромбоцитов (D) у животных, которым давали IL-2/N88R (треугольники), пролейкин (квадраты) или наполнитель (ромбы), измерялось в указанные дни.

Фиг.11А-11D. Показатели азота мочевины крови (А, BUN), креатинина (В), фосфора (С) и времени активированного протромбина (D) у животных, которым давали IL-2/N88R (треугольники), пролейкин (квадраты) или наполнитель (ромбы), измерялись в указанные дни.

Фиг.12А-12D. Показатели общего билирубина (А), ALT (В), фибриногена (С) и времени активированного протромбина (D) у животных, которым давали IL-2/N88R (треугольники), пролейкин (квадраты) или наполнитель (ромбы), измерялись в указанные дни.

Фиг.13А-13D. Уровни натрия (А),

хлорид-ионов (В), кальция (С) и калия (D) в крови у животных, которым давали IL-2/N88R (треугольники), пролейкин (квадраты) или наполнитель (ромбы), измерялись в указанные дни.

5 Фиг.14А-14С. Уровни альбумина (А), гематокрита (В) и гемоглобина (С) в крови у животных, которым давали IL-2/N88R (треугольники), пролейкин (квадраты) или наполнитель (ромбы), измерялись в указанные дни.

10 Фиг.15А-15С. Действие IL-2/N88R (квадраты), пролейкина (ромбы) и наполнителя (треугольники) указано для общей популяции Т-клеток (А, CD3+ клеток), популяции CD4+ Т-клеток (В) и CD8+ Т-клеток (С).

15 Фиг.16А-16С. Действие IL-2/N88R (квадраты), пролейкина (ромбы) и наполнителя (треугольники) указано для общей популяции Т-клеток (А, CD3+ клеток), популяции CD4+ Т-клеток (В) и CD8+ Т-клеток (С).

20 Фиг.17. Действие IL-2/N88R и пролейкина на активацию Т-клеток по отношению к значению флуоресценции CD25-положительных клеток. Действие IL-2/N88R (квадраты), пролейкина (ромбы) и наполнителя (треугольники) указано для популяции CD3+CD4+ Т-клеток. Было получено недостаточное количество CD3+/CD8+ клеток для оценки значения флуоресценции на этой популяции.

25 Фиг.18А-18D. Действие IL-2/N88R (квадраты), пролейкина (ромбы) и наполнителя (треугольники) указано для популяции CD4+ Т-клеток (А, CD3+/CD4+ клетки), популяции CD8+ Т-клеток (В, CD3+/CD8+ клетки), общей популяции Т-клеток (С, CD3+ клетки) и популяции NK-клеток (D, CD3-/CD16+ клетки).

30 Фиг.19. График количества метастазов в легких по отношению к дозе у мышей, которым давали пролейкин (незакрашенные кружки) или IL-2/N88R (закрашенные кружки). Метастазы в легких подсчитывали по окончании исследования.

35 Фиг.20. Плазмидная карта IL-2/N88K-вектора pBC1IL2SA.

40 Описание предпочтительных вариантов осуществления

45 А. Предшествующий уровень техники

Действие IL-2 на Т-клетки опосредуется связыванием с IL-2-рецепторными белками. Определенные белки на поверхности Т-клеток связывают IL-2. Первым был идентифицирован единственный белок, называемый IL-2R α , состоящий из 55 kD (p55), он появляется при активации Т-клеток и был первоначально назван Тас-антигеном (от слов Т activation). IL-2R α связывается с IL-2 с константой K_d, равной приблизительно 10⁻⁸M, он также известен как "низкоаффинный" рецептор. Связывание IL-2 с клетками, экспрессирующими только IL-2R α , не приводит к какому-либо различному биологическому ответу.

60 Второй IL-2-рецептор - это связывающий комплекс, состоящий из IL-2R β и IL-2R γ ; IL-2R γ - это 64kD полипептид, известный также как общая γ (γ_c) цепь, так как он обнаруживается у ряда цитокиновых рецепторов. IL-2R β составляет от 70 до 75 kD (называется либо p70, либо p75) и является

членом семейства рецепторов цитокинов типа I, которые характеризуются наличием двух участков цистеин/WSXWS.

IL-2R β экспрессируется координированно с γ_c . Аффинность связывания IL-2 с IL-2R $\beta\gamma_c$ выше, чем с IL-2R α , константа K_d составляет приблизительно $10^{-9}M$; IL-2R $\beta\gamma_c$ известен также как IL-2-рецептор "с промежуточной аффинностью". IL-2 вызывает рост клеток, экспрессирующих IL-2R $\beta\gamma_c$, причем полумаксимальная стимуляция роста наблюдается при концентрации IL-2, приводящей к полумаксимальному связыванию (т.е. $1 \times 10^{-9}M$). IL-2R $\beta\gamma_c$ является тем же сигнальным рецепторным комплексом, который может связываться с IL-15.

Третьим известным IL-2-рецепторным комплексом является комплекс IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$. Клетки, экспрессирующие и IL-2R α , и IL-2R $\beta\gamma_c$, способны связывать IL-2 значительно прочнее с константой K_d , равной приблизительно $10^{-11}M$, таким образом IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ известен также как "высокоаффинный" комплекс. Стимуляция роста таких клеток происходит соответственно при низких концентрациях IL-2. И связывание с IL-2, и стимуляция роста могут быть заблокированы антителами к IL-2R α , IL-2R β или γ_c и более эффективно комбинацией антител к нескольким субъединицам рецептора. Эти наблюдения позволяют предположить, что IL-2R α образует комплекс с IL-2R $\beta\gamma_c$, увеличивающий сродство сигнального рецептора к IL-2 и обеспечивающий таким образом доставку сигнала роста при значительно более низких концентрациях IL-2. Полагают, что сначала IL-2 быстро связывается с IL-2R α , и это способствует ассоциации с IL-2R $\beta\gamma_c$. Покоящиеся Т-клетки экспрессируют IL-2R $\beta\gamma_c$ и только небольшое количество IL-2R α ; увеличение поверхности, на которой экспрессирован IL-2R α , может быть стимулировано IL-2. При активации Т-клеток, опосредованной рецептором антигена, быстро экспрессируется IL-2R α , таким образом снижается концентрация IL-2, необходимая для стимуляции роста. Связывание IL-2 с комплексом IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ приводит к передаче сигнала по сигнальному пути Jак/STAT.

Авторами были обнаружены мутантные белки человеческого IL-2, которые активируют Т-клетки (ФГА-бласты; клетки, экспрессирующие высокоаффинный IL-2-рецептор IL-2R $\alpha\beta\gamma$) предпочтительно перед естественными киллерными (NK) клетками (клетками, экспрессирующими IL-2-рецептор с промежуточной аффинностью IL-2R $\beta\gamma$). Мутантные белки, в которых Asp-20 заменен на гистидин (D20H) или изолейцин (D20I), Asn-88 заменен на аргинин (N88R), глицин (N88G) или изолейцин (N88I), или Gln-126 заменен на лейцин (Q126L) или глутамат (Q126E), демонстрируют неожиданно полную IL-2-активность на ФГА-бластах, и низкую активность (или ее отсутствие) на NK-клетках. Предыдущие исследования мутантных белков

человеческого IL-2 основывались на мышинных клеточных системах анализа, а при исследованиях на клетках человека не использовались клетки, экспрессирующие только IL-2R $\beta\gamma$ (такие, как NK-клетки). Кроме того, исследования с использованием человеческих ФГА-бластов показали, что замены Asp-20 (на Leu, Arg, Asp или Lys; Xu, et al., Eur. Cytokine Netw, 6, 237-244 (1995)) или Gln-126 (на Asp; Buchli and Ciardelli, Arch. Biochem. Biophys, 307(2): 411-415, (1993)) приводят к мутантным белкам человеческого IL-2 со значительно сниженной активностью. В предыдущих исследованиях с использованием мышинного IL-2 были идентифицированы мутантные белки IL-2 мыши с различными активностями (Zugawski, et al., EMBO J, 12, 5113-5119 (1993)), но ни одна из мутаций, приведших к этим результатам, не предполагала мутаций, идентифицированных в предлагаемой работе. Мутантные белки человеческого IL-2, содержащие идентичные замены в положениях, синонимичных положениям в мутантных белках мышинного IL-2, не обнаруживают схожей активности, таким образом, можно предположить, что примеры на мышах не могут предсказывать функциональности в человеческой системе. Авторам не известны исследования мутантных белков IL-2 человека, сравнивающие относительные активности в клетках, экспрессирующих IL-2-рецептор IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (например, ФГА-бластах) и в клетках, экспрессирующих IL-2-рецептор IL-2R $\beta\gamma$ (например, NK-клетках). Ожидается, что анализ *in vivo* подтвердит, что описанные мутантные белки обладают улучшенным терапевтическим индексом по сравнению с человеческим IL-2 дикого типа благодаря снижению токсичности и обеспечивают терапевтически полезные соединения для лечения заболеваний, требующих стимуляции иммунной системы.

Интерлейкин 2 (IL-2) используется в настоящее время в клинической практике для лечения метастатического рака почки. Однако его сильная токсичность ограничивает его применение группой наиболее здоровых пациентов, а ограничивающая дозу токсичность снижает его общую эффективность. Предполагают, что острая токсичность IL-2 обуславливается активацией NK-клеток, тогда как эффективность обусловлена прямой активацией Т-клеток (Jacobson, et al., Proc Natl Acad Sci USA (United States), Sep. 17, 1996, 93(19) p. 10405-10; Smith KA, Blood 1993, 81(6), p. 1414-23; Kaplan, et al., Biotechnology, 10 (2), p. 157-62). Т-клетки и NK-клетки экспрессируют различные рецепторы для IL-2 (Т-клетки: IL-2R $\alpha\beta\gamma$, высокоаффинный IL-2-рецептор; NK-клетки: IL-2R $\beta\gamma$, IL-2-рецептор с промежуточной активностью). Описанные в данной работе мутантные белки человеческого IL-2 активируют IL-2-рецептор Т-клеток и не активируют IL-2-рецептор NK-клеток.

Для того чтобы избежать активации NK-клеток с некоторым успехом применялась терапия низкими дозами IL-2 (Jacobson, et. el. (1996). Proc Natl Acad Sci USA 93: 10405-10). Эта стратегия основывалась на концепции о том, что при низких дозах IL-2 будет активироваться только

высокоаффинный IL-2-рецептор и не будет активироваться IL-2-рецептор с промежуточной активностью. Форма IL-2-рецептора с промежуточной активностью, IL-2R $\beta\gamma$, экспрессирована на NK-клетках, в то время как T-клетки экспрессируют высокоаффинную форму, IL-2R $\alpha\beta\gamma$.

Однако авторы подошли к проблеме токсичности с другой позиции. Было сделано предположение, что нарушение взаимодействия IL-2 с IL-2R β и/или с IL-2R γ путем определенных модификаций специфических связывающих остатков на связывающей поверхности IL-2 предотвратит эффективное связывание (и таким образом активацию) с клетками, экспрессирующими только IL-2R $\beta\gamma$. Однако на клетках, экспрессирующих IL-2R $\alpha\beta\gamma$, первоначально связывается IL-2R α , таким образом, связывание с клеткой все равно будет происходить и терапия низкими дозами, предложенная Jacobs et al., может давать токсические побочные эффекты. Благодаря связыванию с IL-2 α на поверхности клетки может происходить эффективное использование IL-2R β и IL-2R γ , несмотря на ослабленное взаимодействие модифицированного IL-2 с IL-2R β и/или IL-2R γ . Таким образом, может образоваться способный к сигнализации комплекс IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$. Мы полагаем, что вариант IL-2, способный селективно активировать высокоаффинные IL-2-рецепторы на T-клетках предпочтительно по отношению к IL-2-рецепторам с промежуточной активностью на NK-клетках, будет обладать повышенным терапевтическим индексом по сравнению с IL-2 дикого типа благодаря снижению профилю токсичности. Вариант IL-2 с повышенным терапевтическим индексом будет обладать значительно более широкой областью применения как в лечении рака (при прямой и/или вспомогательной терапии), так и иммунодефицита (например, ВИЧ и туберкулез). Другие возможные применения IL-2 обусловлены его иммуностимулирующей активностью и включают, кроме того, прямое лечение рака, иммунодефицита у пациентов с ВИЧ или ГКИ человека; инфекционных заболеваний типа туберкулеза; применение в качестве адъюванта в методах "раковой вакцины" и при показанной стимуляции иммунной системы, например при совершенствовании стандартных процедур вакцинации или для лечения пожилых людей.

Соответствующие замены в положениях Asp-20, Asn-88 или Gln-126 снижали связывающие взаимодействия либо для IL-2R β (Asp-20 и Asn-88), либо для IL-2R γ (Gln-126). Общий эффект таких замен привел к получению мутантных белков IL-2, которые сохраняли активность на T-клетках человека и обладали сниженной активностью на NK-клетках человека.

Так как не представлялось возможным предсказать результат данной замены до исследования на T- и NK-клетках, были сделаны замены на все возможные природные аминокислоты (кроме Cys) в положениях Asp-20, Asn-88 и Gln-126 и ограниченный, но разнообразный набор мутаций по положению Asp-84 для проверки их взаимодействия с IL-2R β . Если бы

наблюдалось видимое взаимодействие с IL-2R β , были бы сделаны дополнительные мутации по положению Asp-84. Данные по 46 отдельным заменам в указанных положениях приведены в табл. 1.

5 Мутации были внесены методом сайт-направленного мутагенеза на кДНК IL-2 дикого типа. Нужные клоны были субклонированы в экспрессионный вектор, подходящий для экспрессии в гетерологичной системе (например, E.coli, бакуловирус, дрожжевые клетки или клетки млекопитающих, такие как клетки яичников китайских хомячков (CHO)). Очищенные белки проверяли в исследованиях пролиферации T-клеток (ФГА-бластов) и NK-клеток.

10 Различные ответы, которые давали индивидуальные белки между этими исследованиями, т.е. ЕС 50, указывают мутации, влияющие на эти активности. Конкретно, мутантные белки, стимулирующие относительно более сильный ответ в исследовании на ФГА-бластах (T-клетках) (по отношению к IL-2 дикого типа) по сравнению с ответом в исследовании на NK-клетках (по отношению к IL-2 дикого типа) соответствуют заменам, обеспечивающим клеточную специфичность, основанную на способности специфических мутантов связываться и активировать IL-2R $\alpha\beta\gamma$, экспрессированный на этих клетках, но отсутствию способности связываться и таким образом активировать клетки, экспрессирующие только IL-2R $\beta\gamma$.

20 Мутантные белки IL-2, обладающие этим свойством, *in vivo* будут обладать иммуностимулирующими свойствами IL-2 с пониженной токсичностью, проявляющейся в сосудистой проницаемости и гипотензии, связанной с лечением IL-2.

35 В. Определения
Клетки линии CHO, использованные для получения описанного здесь рекомбинантного белка, были заложены в ATCC (American Type Culture Collection), 12301 Paraklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA, 5 мая 1999 года, депозит №РТА-8. Так как данный штамм относится к штаммам, зарегистрированным согласно условиям Будапештского соглашения, он будет доступен патентному ведомству государства, подписавшего Будапештское соглашение.

45 В данной работе "IL-2 дикого типа" означает IL-2, природный или рекомбинантный, содержащий последовательность 133 нормально встречающихся аминокислот, соответствующих природному IL-2 человека (за вычетом сигнального полипептида, состоящего из 20 дополнительных N-концевых аминокислот), аминокислотная последовательность которого описана у Fujita, et al., Pnas USA, 80, 7437-7441 (1983), с или без дополнительного N-концевого метионина, который обязательно содержится, когда белок экспрессируется как внутриклеточная фракция E.coli.

60 В данной работе "мутантный белок IL-2" означает полипептид, в котором сделаны специфические замены по отношению к зрелому белку интерлейкина-2 человека. В табл. 1 описаны 46 полученных мутантных белков с индивидуальными заменами и соответствующие данные их относительной активности. Предпочтительными продуктами являются мутантные белки, обладающие по

крайней мере 100-кратной относительной активностью. Наиболее предпочтительными являются следующие белки, обладающие более чем 1000-кратной относительной активностью: остаток (Asp) аспартата (D) в положении 20 ("D20"), при нумерации согласно IL-2 дикого типа, замещен на изолейцин ("D20I") или гистидин ("D20H"); остаток аспарагина (Asn) в положении 88 (N88) замещен на изолейцин (N88I) или аргинин (N88R) и остаток глутамина (Gln) в положении 126 (Q126) замещен на лейцин (Q126L), глутамат (Q126E) или аспартат (Q126D). По остальным, не замещенным, положениям предпочтительные мутантные белки IL-2 имеют аминокислотную последовательность, идентичную IL-2 дикого типа. Однако мутантные белки IL-2, описанные в данной работе, могут характеризоваться также аминокислотными вставками, делениями, заменами и модификациями в одном или нескольких сайтах по этим или другим остаткам полипептидной цепи нативного IL-2. В соответствии с этим изобретением любые подобные вставки, делеции, замены и модификации могут приводить к мутантным белкам IL-2, сохраняющим ФГА-блест-селективную активность при сниженной способности к активации NK-клеток, и составляют сущность данного изобретения.

Комбинирование предпочтительных или особо предпочтительных замен, описанных выше, в одной рекомбинантной молекуле IL-2 может привести к комбинации мутантов, обладающих активностью, аналогичной описанной для одиночных мутантов. Например, можно ожидать, что молекула IL-2, содержащая комбинацию двух или более мутаций, выбираемых из табл. 1, может привести к IL-2-агонисту, селективному по отношению к Т-клеткам, с относительной активностью, аналогичной относительной активности молекул с единичными заменами, описанными здесь. Комбинационные мутанты составляют объем и сущность данного изобретения.

Авторы предпочитают консервативные модификации и замены по другим положениям IL-2 (т.е. такие, которые оказывают минимальное влияние на вторичную или третичную структуру мутантного белка). Такие консервативные замены включают замены, описанные Dayhoff в The Atlas of Protein Sequence and Structure 5. (1978) и Argos в EMBO J., 8:779-785 (1989). Например, аминокислоты, принадлежащие одной группе, представляют консервативные замены:

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

Авторы также предпочитают модификации или замены, которые не вносят сайты для дополнительного межмолекулярного кросслинкинга или образования незаконных дисульфидных связей. Например, известно, что IL-2 содержит три цистеиновых остатка, в диком типе это положения 58, 105 и 125 зрелой последовательности.

Под "нумерацией согласно IL-2 дикого

типа" авторы понимают идентификацию выбранной аминокислоты в соответствии с положением, в котором эта аминокислота нормально встречается в зрелой последовательности IL-2 дикого типа. Если произведены вставки или делеции, то специалистам в данной области техники будет понятно, что Asp, нормально находящийся в положении 20, может быть сдвинут по положению в мутантном белке. Однако положение сдвинутого Asp можно легко определить сверкой и сопоставлением фланкирующих аминокислот с аминокислотами, фланкирующими Asp в IL-2 дикого типа.

Термин "типы клеток, несущих IL-2R $\alpha\beta\gamma$ рецептор" означает клетки, наличие этого типа рецепторов у которых известно, т.е. Т-клетки, активированные Т-клетки, В-клетки, активированные моноциты и активированные NK-клетки. Термин "типы клеток, несущих IL-2R $\beta\gamma$ рецептор" означает клетки, наличие этого типа рецепторов у которых известно, т.е. В-клетки, покоящиеся моноциты и покоящиеся NK-клетки.

Мутантные белки IL-2, представленные в данном изобретении, можно получить любым подходящим методом, известным в данной области техники. Такие методы включают конструирование последовательности ДНК, кодирующей мутантные белки IL-2, и экспрессию этих последовательностей в соответственно трансформированном хозяине. Этим методом можно получить мутантные белки, представленные в данном изобретении. Однако такие мутантные белки можно также получить, хотя это и менее предпочтительно, химическим синтезом или комбинацией химического синтеза и метода рекомбинантной ДНК. Методы серийного производства или перфузионного производства в общем соответствуют данной области техники. См. Freshey, R.I. (ed), "Animal Cell Culture: A Practical Approach", 2nd ed., 1992, IRL Press, Oxford, England; Mather, J.P. "Laboratory Scaleup of Cell Cultures (0.5-50 liters)", Methods Cell Biology 57: 219-527 (1998); Hu, W.S., and 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).

В одном из вариантов осуществления рекомбинантного способа получения мутантного белка, описанного в изобретении, последовательность ДНК конструируют путем выделения или синтеза последовательности ДНК, кодирующей IL-2 дикого типа, и последующего изменения кодона Asp20 на кодон изолейцина (I) сайт-специфическим мутагенезом. Этот метод хорошо известен. См., например, Mark et al., "Site-specific Mutagenesis Of The Human Fibroblast Interferon Gene", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, p. 5662-66 (1984); и патент США №4588585, включенный в данное описание путем ссылки.

Другим способом конструирования последовательности ДНК, кодирующей мутантные белки IL-2, описанные в данном изобретении, является химический синтез. Он включает, например, прямой химический

синтез белковой последовательности, кодирующей мутантный белок IL-2, обладающий свойствами, описанными в данном изобретении. Этим способом можно включать как природные, так и неприродные аминокислоты в положения, влияющие на взаимодействия IL-2 с IL-2R γ или IL-2R γ . Альтернативно ген, кодирующий требуемый мутантный белок IL-2, можно синтезировать химическим способом с использованием олигонуклеотидного синтезатора. Такие олигонуклеотиды конструируют, основываясь на аминокислотной последовательности требуемого мутантного белка IL-2 и выбирая те кодоны, которые предпочтительны в клетках хозяина, в которых будет получен рекомбинантный мутантный белок. В этом аспекте учитывается тот факт, что генетический код вырожден - одна аминокислота может кодироваться более чем одним кодоном. Например, Phe (F) кодируется двумя кодонами, TTC или TTT, Tyr (Y) кодируется TAC или TAT, а His (H) кодируется CAC или CAT. Trp (W) кодируется единственным кодоном, TGG. Соответственно следует учитывать, что для данной последовательности ДНК, кодирующей конкретный мутантный белок IL-2, существует несколько вырожденных последовательностей ДНК, кодирующих этот белок. Например, следует учитывать, что в дополнение к последовательности ДНК для белка D201, приведенной в SEQ ID NO:1, существует несколько вырожденных последовательностей, кодирующих указанный белок. Такие вырожденные ДНК рассматриваются в области данного изобретения. Таким образом, термин "вырожденные варианты" в контексте данного изобретения означает все последовательности ДНК, кодирующие и позволяющие экспрессию конкретного мутантного белка.

Последовательность ДНК, кодирующая мутантный белок IL-2, описываемый в данном изобретении, полученная сайт-направленным мутагенезом, химическим синтезом или другими методами, может включать или не включать ДНК, кодирующую сигнальную последовательность. Такая сигнальная последовательность, если она присутствует, должна узнаваться клеткой, выбранной для экспрессии мутантного белка IL-2. Последовательность может быть прокариотической, эукариотической или комбинацией этих двух типов. Она может быть также сигнальной последовательностью природного IL-2. Включение сигнальной последовательности зависит от того, предполагается ли секреция требуемого мутантного белка IL-2 из рекомбинантных клеток, в которых он был получен. Если выбраны прокариотические клетки, обычно предпочтительно, чтобы последовательность ДНК не кодировала сигнальную последовательность. Если выбраны эукариотические клетки, обычно предпочтительно, чтобы кодировалась сигнальная последовательность, и наиболее предпочтительно, чтобы использовалась сигнальная последовательность IL-2 дикого типа.

Для синтеза гена, кодирующего мутантный белок IL-2, соответствующий данному изобретению, можно применять стандартные

способы. Например, можно использовать полную аминокислотную последовательность для конструирования обратно транскрибируемого гена. Можно синтезировать олигомер ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный белок IL-2. Например, можно синтезировать несколько небольших олигонуклеотидов, кодирующих части требуемого полипептида, и затем лигировать их. Отдельные олигонуклеотиды содержат обычно перекрывающиеся 5' или 3' участки для комплементарной сборки.

Будучи собранной (синтезом, сайт-направленным мутагенезом или другим способом), последовательность ДНК, кодирующая мутантный белок IL-2, должна быть введена в вектор для экспрессии и связана с контролирующей экспрессию последовательностью, подходящей для экспрессии мутантного белка в требуемом трансформированном хозяине. Правильность сборки может быть подтверждена нуклеотидным секвенированием, рестрикционным картированием и экспрессией биологически активного полипептида в подходящем хозяине. В данной области техники известно, что для получения высоких уровней экспрессии трансфицированного гена в хозяине ген должен быть связан с контролирующими транскрипционную и трансляционную экспрессию последовательностями, функционирующими в выбранном хозяине.

Выбор контролирующей экспрессию последовательности и вектора для экспрессии зависит от выбора хозяина. Может быть задействован широкий набор комбинаций хозяин/вектор для экспрессии. Векторы, используемые для экспрессии в эукариотических хозяевах, включают, например, векторы, содержащие контролирующую экспрессию последовательности из SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота, аденовируса или цитомегаловируса. Векторы, используемые для экспрессии в бактериальных хозяевах, включают известные бактериальные плазмиды, такие как плазмиды из E.coli, включающие col E1, pCR1, pER32z, pMB9 и их производные, плазмиды с широкой видоспецифичностью, такие как RP4, фаговые ДНК, например многочисленные производные фага лямбда, например NM989, и других ДНК-фагов, таких как M13 и нитчатых фагов с одноцепочечной ДНК. Векторы, используемые для экспрессии в клетках дрожжей, включают плазмиду 2 μ и ее производные. Векторы, используемые в клетках насекомых, включают pVL 941. Мы предпочитаем pFastBac™ 1 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD). Gate et al., "Isolation Of The Bovine And Human Genes For Mullerian Inhibiting Substance And Expression Of The Human Gene In Animal Cells", Cell, 45, p.685-98 (1986).

Кроме того, в этих векторах можно использовать любую из широкого набора контролирующих экспрессию последовательностей. Используемые контролирующие экспрессию последовательности включают последовательности, ассоциируемые со структурными генами вышеупомянутых векторов для экспрессии. Примерами

используемых контролирующих экспрессию последовательностей являются, например, ранние и поздние промоторы SV40 или аденовируса, lac система, trp система, TAC или TRC система, участки главного оператора и промотора фага лямбда, например PL, контрольные участки fd оболочечного белка, промотор 3-фосфоглицерат киназы или других гликолитических ферментов, промоторы кислой фосфатазы, например PhoA, промоторы дрожжевой системы α -спаривания, полиэдрический промотор Бакуловируса и другие известные последовательности, контролирующие экспрессию генов прокариотических или эукариотических клеток или вирусов, и различные комбинации этих последовательностей.

Для получения мутантных белков IL-2, описанных в данном изобретении, можно использовать любого подходящего хозяина, включая бактериальные клетки, клетки грибов (включая дрожжи), растений, насекомых, млекопитающих или другие подходящие клетки или клеточные линии животных; а также трансгенных животных или растения. Более подробно, эти хозяева могут включать хорошо известных эукариотических и прокариотических хозяев, таких как штаммы *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, грибы, дрожжи, клетки насекомых, таких как *Spodoptera frugiperda* (Sf9), клетки животных, такие как клетки яичников китайских хомячков и мышинные клетки, такие как NS/O, клетки африканской зеленой мартышки, такие как COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 и BNT 10, и клетки человека, а также клетки растений в клеточной культуре. Для экспрессии в клетках животных мы предпочитаем культуры клеток CHO и COS 7, а особенно - линии CHO клеток CHO (DHFR-) или HKB.

Следует учитывать, что не все векторы и контролирующие экспрессию последовательности будут функционировать одинаково хорошо при экспрессии описанных здесь последовательностей ДНК. И также не все хозяева одинаково хорошо подойдут для одной системы экспрессии. Однако специалист в данной области техники может сделать выбор между этими векторами, контролирующими экспрессию последовательностями и хозяевами без лишнего экспериментирования. Например, при выборе вектора следует учитывать хозяина, так как вектор должен в нем реплицироваться. Следует учитывать также копияность вектора и возможность контролировать копияность и экспрессию каких-либо других белков, кодируемых этим вектором, таких как маркеры антибиотиков. Например, векторы, предпочтительные для осуществления данного изобретения, включают такие, которые позволяют кодировать мутантный белок ДНК амплифицироваться с определенным количеством копий. Такие амплифицируемые векторы хорошо известны в данной области техники. Они включают, например, векторы, которые можно накапливать DHFR амплификацией (см., например, Kaufman, United States Patent 4470461, Kaufman and Sharp, "Construction Of A Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis Of Signals Utilized For Efficient

Expression", Mol. Cell. Biol. 2, p.1304-19 (1982)) или амплификацией с глутамин синтетазой ("GS") (см., например, патент США 5122464 и опубликованную европейскую заявку 338841).

При выборе последовательности, контролирующей экспрессию, следует учитывать разнообразные факторы. Эти факторы включают, например, относительную силу последовательности, ее контролируемость и совместимость с последовательностью ДНК, кодирующей мутантный белок IL-2, особенно это касается возможных вторичных структур. Хозяев следует выбирать с учетом их совместимости с выбранным вектором, токсичности продукта, кодируемого описанными в изобретении последовательностями ДНК, характеристик их секреции, их способности правильно складывать полипептиды, требований к их ферментации или культивированию и легкостью очистки продуктов, кодируемых последовательностями ДНК.

Учитывая указанные параметры, специалист в данной области техники может подобрать различные комбинации вектор/последовательность контроля экспрессии/хозяин, которые позволят экспрессировать требуемые последовательности ДНК при ферментации или крупномасштабном использовании животной культуры, например, при использовании клеток CHO или COS 7.

Получаемые согласно данному изобретению мутантные белки IL-2 могут быть гликозилированы или дегликозилированы в зависимости от организма хозяина, использованного для получения белка. Если в качестве хозяина выбраны бактерии, то мутантные белки IL-2 будут негликозилированы. С другой стороны, эукариотические клетки будут гликозилировать мутантные белки IL-2, хотя, возможно, не совсем так, как гликозилирован природный IL-2. Мутантный белок, производимый трансформированным хозяином, можно очистить любым подходящим методом. Известны различные методы для очистки IL-2. Смотри, например, Current Protocols in Protein Science, v. 2. Eds: 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.). Авторы предпочитают переосаждение из тел включения, образуемых в *E. coli*, или из кондиционированной среды культур клеток дрожжей или млекопитающих, продуцирующих данный белок, с использованием катионного обмена, гель-фильтрации и/или обращеннофазовой жидкостной хроматографии. Смотри ниже примеры 1 (*E.coli*) и 10 (перфузия CHO клеток).

Биологическая активность описываемых в изобретении мутантных белков IL-2 может быть исследована любым подходящим методом, известным в данной области техники. Такие исследования включают пролиферацию ФГА-бластов и NK-клеток. Мутантные белки с подходящей активностью, т.е. полностью активные по отношению к IL-2R $\alpha\beta\gamma$, с пониженной активностью на клетках, несущих IL-2R $\beta\gamma$, определяют по результатам двух анализов. "Относительная

активность" мутантного белка измеряется по отношению к IL-2 дикого типа и, как описано далее в примерах, представляет отношение активности пролиферации ФГА-бластов к активности пролиферации NK-клеток.

Описываемый в изобретении мутантный белок IL-2 следует назначать в дозе, примерно соответствующей или превышающей дозу, применяемую при лечении природным или рекомбинантным IL-2 дикого типа. Предпочтительно назначать эффективное количество мутантного белка IL-2. "Эффективное количество" означает количество, способное предотвратить или снизить тяжесть или распространение состояния или показания, при котором требуется лечение. Специалистам в данной области техники будет понятно, что эффективное количество мутантного белка IL-2 зависит от заболевания, дозы, графика приема мутантного белка IL-2, от того, назначается ли мутантный белок IL-2 один или в комплексе с другими лекарственными средствами, от времени полужизни состава в сыворотке и от общего состояния здоровья пациента.

Мутантный белок IL-2 предпочтительно вводят в составе, включающем фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает носитель, который не оказывает неблагоприятного действия на пациентов, которым его назначают. Такие фармацевтически приемлемые носители хорошо известны в данной области техники. Мы предпочитаем 2% HSA/PBS при pH 7,0.

Мутантные белки IL-2 могут быть введены в состав фармацевтических композиций хорошо известными методами. Например, в Remington's Pharmaceutical Science by E.W. Martin, включенной в описание изобретения в качестве ссылки, описаны подходящие составы. Фармацевтическая композиция с мутантным белком IL-2 может быть приготовлена в различных формах, включая жидкость, гель, лиофилизованное вещество или другую подходящую форму. Предпочтительная форма зависит от конкретного показания к применению и будет очевидна специалисту в данной области техники.

Фармацевтическая композиция с мутантным белком IL-2 может назначаться перорально, в аэрозоле, внутривенно, внутримышечно, внутривенно, внутривенно, внутривенно или подкожно или другим приемлемым способом. Предпочтительный способ введения зависит от конкретного показания к применению и будет очевиден специалисту в данной области техники. Фармацевтическая композиция, содержащая мутантный белок IL-2, может назначаться совместно с другими лекарственными средствами. Эти средства могут быть введены в состав данной фармацевтической композиции или применяться отдельно от мутантного белка IL-2, либо одновременно, либо согласно другому графику приема. Кроме того, фармацевтическая композиция с мутантным белком IL-2 может применяться в качестве вспомогательного средства при других видах лечения.

Таким образом, данное изобретение обеспечивает составы и способы лечения ВИЧ, рака, аутоиммунного заболевания,

инфекционных заболеваний, для применения в качестве адъюванта раковой вакцины и при обычной вакцинной терапии, для стимуляции иммунитета у пожилых людей или других пациентов с ослабленным иммунитетом, а также у больных ГКИ, или для других терапевтических методов, требующих общей стимуляции иммунной системы животных, предпочтительно млекопитающих, наиболее предпочтительно человека. Как было отмечено ранее, IL-2 обладает разными активностями. К ним относятся стимуляция ФГА-бластов, покоящихся Т-клеток, В-клеток, моноцитов и NK-клеток и т.д.; мутантные белки, описанные в данной работе, обладают активностью на клетках, экспрессирующих только высокоаффинный IL-2-рецептор, таких как покоящиеся Т-клетки, но не на тех, которые экспрессируют рецептор с промежуточной активностью, таких как NK-клетки или моноциты.

Также предполагается использование последовательностей ДНК, кодирующих мутантные белки IL-2, в генной терапии. Применение в генной терапии включает лечение тех заболеваний, при которых ожидается, что IL-2 обеспечит терапевтический эффект благодаря активации Т-клеток, например, при ВИЧ, раке, аутоиммунном заболевании, инфекционных заболеваниях, для применения в качестве адъюванта раковой вакцины и при обычной вакцинной терапии, для стимуляции иммунитета у пожилых людей или других пациентов с ослабленным иммунитетом, а также у больных ГКИ, и при других заболеваниях или инфекционных агентах, восприимчивых к IL-2 опосредованному иммунному ответу.

Местная доставка мутантных белков IL-2 при использовании генной терапии может обеспечить попадание лекарственного средства в требуемую область. Рассматриваются методики применения генной терапии как *in vitro*, так и *in vivo*. Известно несколько методов доставки потенциально терапевтических генов к определенным клеточным популяциям. См. например, Mulligan, "The Basic Science Of Gene Therapy", Science, 260: 926-31 (1993). Эти методы включают:

1) прямой перенос генов. См. например, Wolff et al., "Direct Gene transfer Into Mouse Muscle In Vivo", Science, 247:1465-68 (1990);

2) доставка ДНК через липосомы. См. например, 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) перенос ДНК посредством ретровирусов. См., например, 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) перенос ДНК посредством ДНК-содержащих вирусов. Такие ДНК-вирусы включают аденовирусы (предпочтительны

векторы на основе Ad-2 или Ad-5), герпес вирусы (предпочтительны векторы на основе герпес симплекс вируса) и парвовирусы (предпочтительны векторы на основе "дефектных" или неавтономных парвовирусов, более предпочтительны векторы на основе аденоассоциированных вирусов, наиболее предпочтительны - на основе AAV-2). См., например, Ali et al., "The Use Of DNA Viruses As Vectors For Gene Therapy", Gene Therapy, 1:367-84 (1994); патент США 4797368, включенный в описание в качестве ссылки, и Патент США 5139941, включенный в описание в качестве ссылки.

Выбор конкретной векторной системы для переноса требуемого гена зависит от различных факторов. Одним из важных факторов является природа популяции клеток-мишеней. Хотя ретровирусные векторы интенсивно изучались и использовались при применении генной терапии, они, в общем, не подходят для инфицирования неделящихся клеток. Кроме того, ретровирусы обладают онкогенным потенциалом.

Преимущества аденовирусов состоят в том, что они обладают более широкой видоспецифичностью, могут инфицировать молчащие и окончательно дифференцированные клетки, такие как нейроны и гепатоциты, и по существу неонкогенны. См., например, Ali et al., "The Use Of DNA Viruses As Vectors For Gene Therapy", Gene Therapy, 1:367 (1994). Аденовирусы, по-видимому, не интегрируют в геном хозяина. Так как они существуют экстрахромосомно, значительно снижается риск инсерционного мутагенеза. Ali et al., "The Use Of DNA Viruses As Vectors For Gene Therapy", Gene Therapy, 1:373 (1994).

Аденоассоциированные вирусы (AAB) обладают теми же преимуществами, что и векторы на основе аденовирусов. Однако AAB демонстрируют способность к сайт-специфической интеграции в хромосому человека 19. Ali et al., "The Use Of DNA Viruses As Vectors For Gene Therapy", Gene Therapy, 1:377 (1994).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения ДНК, кодирующая мутантный белок IL-2, используется в генной терапии иммунодефицитных заболеваний, таких как ВИЧ; инфекционных заболеваний, таких как туберкулез; и раковых заболеваний, таких как карцинома почки.

Согласно этому варианту осуществления генная терапия при помощи ДНК, кодирующей мутантные белки IL-2, описанные в данном изобретении, при необходимости назначается пациенту параллельно или сразу после постановки диагноза.

Этот подход обладает преимуществом селективной активности мутантных белков IL-2 и предотвращает токсичность и неблагоприятные воздействия. Специалисту в данной области техники будет понятно, что согласно этому способу осуществления изобретения можно использовать любой подходящий вектор для генной терапии, включающий ДНК, кодирующую мутантный белок IL-2. Методы для конструирования таких векторов известны. См., например, Anderson, W.F., Human Gene Therapy, Nature, 392 25-30 (1998); Verma, I.M., and Somia,

N., Gene Therapy - Promises, Problems, and Prospects, Nature, 389 239-242 (1998). Введение вектора, содержащего ДНК, кодирующую мутантный белок IL-2, в требуемый сайт можно осуществить при использовании известных методик.

Для лучшего понимания изобретения ниже приведены примеры. Эти примеры служат только иллюстрацией и не рассматриваются как ограничивающие объем и сущность изобретения каким-либо образом.

C. Примеры

Пример 1. Получение мутантных белков в E.coli. Мутантные белки были получены сайт-направленным мутагенезом при использовании праймеров, содержащих кодоны, относящиеся к требуемой мутации, как это описано Kunkel TA, Roberts JD, and Zokour RA, "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" (1987), Methods Enzymol 154:367-382. Кратко, человеческую кДНК IL-2, содержащую сайты рестрикционных ферментов Bam HI и Xba I, субклонировали в фаговый вектор M13 mp19 (New England Biolabs, Beverly, MA) с использованием этих сайтов. кДНК IL-2 дикого типа была получена при использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР) с пула кДНК образованных из мРНК, выделенной из лимфоцитов периферийной крови человека, индуцированных за 24 часа 12-мурилат-13-ацетатом форбола (10 нг/мл). В ПЦР использовались праймеры: для 5' конца открытой рамки считывания IL-2:

5'-CCT CAA CTC CTG AAT TCA TGT ACA GGA TGC-3' (SEQ ID NO: 3);

и для 3' конца открытой рамки считывания IL-2:

5'-GGA AGC GGA TCC TTA TCA AGT CAG TGT TGA G-3' (SEQ ID NO: 4).

В каждый олигонуклеотид были включены сайты ферментов рестрикции Eco RI (5' конец) и Barn HI (3' конец), они выделены курсивом. ПЦР проводили в следующих условиях: 1 минута при 94°C, 1 минута при 58,7°C и 1 минута при 72°C в течение 25 циклов. Правильность полученной таким способом IL-2кДНК подтверждали секвенированием с использованием набора

Sequenase® (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL) согласно протоколу, указанному производителем. Содержащая урацил одноцепочечная ДНК (У-ДНК) была получена трансформацией штамма CJ236 E. coli (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) вектором M13 mp19, содержащим У-2кДНК. Для сайт-направленного мутагенеза использовали праймеры, содержащие 15 нуклеотидов, гомологичных матричной У-ДНК с 5' стороны от кодонов, предназначенных для мутагенеза, нуклеотиды, включающие требуемую замену, и 10 нуклеотидов, гомологичных матричной У-ДНК с 3' конца от последнего измененного нуклеотида. Первоначально сайт-направленный мутагенез использовали для введения сайта рестрикции NcoI в начало зрелой последовательности человеческого IL-2. Внесение этого сайта включает N-концевой остаток метионина, который направляет экспрессию в цитоплазматическом пространстве E.coli при использовании, например, вектора для экспрессии pET3d. Праймер, использованный для этой цели представлял собой:

5'-GCA CTT GTC ACA AAC ACC ATG GCA CCT ACT TCA AGT-3' (SEQ ID NO: 5)

Специфические праймеры, использованные для внесения мутаций в положения D20, N88 и Q126, представляли собой:

D20X: 5'-GGA GCA TTT ACT GCT GNN NTT ACA GAT G-3' (SEQ ID NO:6)

N88X: 5'-GGG ACT TAA TCA GCN NNA TCA ACG TAA TAG-3' (SEQ ID NO:7)

Q126X 5'-GGA TTA CCT TTT GTN NNA GCA TCA TCT C-3' (SEQ ID NO:8)

где NNN заменяли на соответствующие кодоны гистидина (CAC) или изолейцина (ATC) (в положении D20), аргинина (CGT), глицина (GGT), или изолейцина (ATC) (в положении N88), или лейцина (CTG) (в положении Q126). Другие мутации вносили с применением аналогичной стратегии и соответствующего кодона для данной мутации. Праймеры фосфорилировали T4 полинуклеотид киназой (New England Biolabs, Beverly, MA) согласно протоколу, указанному производителем. После отжига праймера на матричной U-ДНК и амплификации с помощью T7 ДНК полимеразы (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) клетки *E. coli* штамма DH5 α^{TM} (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) трансформировали 5 мкл реакционной смеси и высевали на среду LB, содержащую 0,7% агара. После инкубации при 37°C материал колоний размножали отбором единичных колоний и переносом их в 2 мл среды LB, с последующей инкубацией при 37°C в течение ночи. Одноцепочечную ДНК получали с использованием набора для выделения M13 (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA) согласно протоколу, указанному производителем, а клоны, содержащие требуемую мутацию, идентифицировали секвенированием одноцепочечной ДНК с использованием набора для секвенирования Sequenase® (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL) согласно протоколу, указанному производителем. КДНК мутантного белка IL-2 из репликативной формы ДНК, соответствующей колониям, содержащим корректно мутированную последовательность, выделяли с использованием Nco I и Xba I и субклонировали в плазмидный вектор pET3a (Stratagene, San Diego, CA) (Strat). Штамм *E. coli* BL21 трансформировали содержащим мутантный белок вектором pET3a, растили до показателя ABS₂₈₀ (оптической плотности при 280 нм) 0,60-1,0, и в этот момент добавляли 0,4 mM ИПТГ (изопропилтиогалактозид) для индукции продукции мутантного белка IL-2.

Пример 2. Экстракция и очистка мутантных белков IL-2 из *E. coli*

Через три часа после индукции клетки собирали центрифугированием при 10,000×g. Для ренатурации и очистки рекомбинантных мутантных белков IL-2 клетки сначала диспергировали в 10-кратном объеме (объем/влажная масса) буфера сахара/Трис/ЭДТА (0,375 M сахарозы, 10 mM Трис HCl pH 8,0, 1 mM ЭДТА). Диспергированные клетки озвучивали ультразвуком при 300 W с 30-секундными интервалами в ледяной бане на приборе Missonix модель XL2020, оснащенном 1-дюймовым стандартным электродом. Затем озвученный материал центрифугировали при

17,000×g в течение 20 минут при 4°C. Осадок, который на этом этапе должен быть белого цвета, промывали ресуспендированием и центрифугированием один раз в буфере сахара/Трис/ЭДТА, дважды в буфере Трис/ЭДТА (50 mM Трис HCl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА), затем ресуспендировали в 10-кратном объеме буфера 0,1 M Трис HCl, pH 8,0 (на этом этапе отбирали образец для анализа в геле) и центрифугировали в течение 20 минут при 17,000×g.

Осадок растворяли добавлением 3-кратного объема 8 M гуанидин хлорида в 0,1 M Трис HCl (pH 8,0) и 0,1% (объем/объем) 2-меркаптоэтанола. После инкубации в течение 2 часов при комнатной температуре материал центрифугировали в течение 20 минут 17,000×g. Полученный раствор диализовали в течение приблизительно 20 часов против 20-кратного объема 10 mM Трис HCl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА при 4°C. Раствор центрифугировали при 17,000×g в течение 20 минут, доводили трифторуксусной кислотой до концентрации 0,1% и фильтровали через фильтр 0,22 мкм. Раствор немедленно переносили в силиконизированный флакон и загружали на колонку C8 (Vydac 208TP54). Мутантные белки IL-2 очищали, применяя 20-минутный линейный градиент с использованием 45-85% ацетонитрила в 0,1% ТФУ. Концентрацию элюированного белка определяли по показателю A280 и аминокислотным анализом. Затем белок разделили на аликваты (100 мл) в силиконизированные пробирки и хранили при -20°C. Таким образом, очищенный мутантный белок представлял собой единичную полосу в SDS-полиакриламидном геле (SDS-ПААГ) (SDS - додецилсульфат натрия) (окрашивание серебром) и оценивался аминокислотным анализом (типичная точность >90%).

Пример 3. Исследование пролиферации Т-клеток

Моноядерные клетки периферийной крови (PBMC) выделяли из приблизительно 100 мл нормальной крови человека (Irwin Memorial Blood Bank, San Francisco, CA), разведенной в соотношении 1:2 холодным фосфатным буфером Dulbecco (свободный от Ca^{2+} и Mg^{2+} , DPBS). Материал центрифугировали на подложке Ficoll-Paque (Pharmacia) для отделения клеток PBMC, которые затем промывали большим количеством холодного DPBS. ФГА-бласты (активированные Т-клетки) получали ресуспендированием клеток в среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Hyclone), к которой добавляли до 1% (вес/объем) каждого из компонентов: L-глутамин; заменимые аминокислоты; пируват натрия; и антибиотик - противомикозное вещество (среда RPMI) при плотности 1×10^6 клеток/мл. Добавляли фитогемагглютинин (ФГА-Р; Sigma) до конечной концентрации 10 мкг/мл и инкубировали клетки при 37°C, 5% CO_2 в течение 3 дней. Клетки собирали и промывали дважды DPBS, ресуспендировали в среде RPMI и высевали на 96-луночные планшеты с плоским дном с плотностью 1×10^6 клеток/луночку в 200 мкл с различными концентрациями IL-2 или мутантного белка в среде RPMI. Планшеты инкубировали в течение 48 часов при 37°C, обрабатывали 1

мкКю ³H-тимидина (DuPont NEN®, Boston, MA)/лунку в течение 6 часов, собирали и измеряли радиоактивность после сбора клеток на фильтры из стекловолокна.

Пример 4. Исследование пролиферации NK-клеток

Моноядерные клетки периферийной крови (PBMC) выделяли из приблизительно 100 мл нормальной крови человека (Irwin Memorial Blood Bank, San Francisco, CA), разведенной в соотношении 1:2 холодным фосфатным буфером Dulbecco (свободный от Ca²⁺ и Mg²⁺, DPBS). Материал центрифугировали на подложке Ficoll-Paque (Pharmacia) для отделения клеток PBMC, которые затем промывали большим количеством холодного DPBS. Отделяли NK-клетки от остальных клеток. Для этих целей предпочтителен набор для выделения NK-клеток Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany; Cat# 465-01). Набор состоит из двух реактивов, колонок для разделения и очень мощного магнитного штатива для колонки. Первый реактив - это смесь конъюгированных с гаптеном моноклональных антител CD3, CD4, CD19, CD33 изотипа IgG1 мыши. Этот реактив предназначен для отделения клеток PBMC от Т-клеток, В-клеток и миелоидных клеток. Судя по всему, можно использовать любой подходящий набор антител, распознающих эти типы клеток. Вторым реактивом состоит из коллоидных суперпарамагнитных микробусин MAC, конъюгированных с антигаптеновым антителом. Клетки ресуспендировали в PBS, содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 2 мМ ЭДТА (PBS/EDTA). Объем суспензии зависит от количества клеток и приводится в графике Miltenyi Biotec. Обычно 2-5×10⁸ клеток PBMC ресуспендировали в 800 мкл буфера и затем использовали по 200 мкл каждого реагента. После инкубации с реагентами клетки (ресуспендированные в 2 мл буфера) наносили на колонку. Все клетки, кроме NK-клеток, связываются с магнитом, а NK-клетки отделяются и собираются на выходе. Клетки промывали, ресуспендировали в среде RPMI (содержит: RPMI 1640, к которой добавлены до 1% каждого из компонентов: L-глутамин; заменимые аминокислоты; пируват натрия; и антибиотик - противомикозное вещество (все компоненты от GibcoBRL, Gaithersburg, MD); 10% эмбриональную бычью сыворотку (Hyclone)) и высевали на 96-луночные планшеты с плоским дном с плотностью 1×10⁵ клеток/лунку в 200 мкл. Клетки собирали и промывали дважды в DPBS, ресуспендировали в среде RPMI и высевали на 96-луночные планшеты с плоским дном с плотностью 1×10⁵ клеток/лунку в 200 мкл с различными концентрациями IL-2 или мутантного белка в среде RPMI. Планшеты

инкубировали в течение 48 часов при 37°C, обрабатывали 1 мкКю ³H-тимидина (DuPont NEN®, Boston, MA)/лунку в течение 6 часов, собирали и измеряли радиоактивность после сбора клеток на фильтры из стекловолокна.

Пример 5. Мутантные белки, активирующие Т-клетки предпочтительно перед NK-клетками

Мутантные белки получали, используя сайт-направленный мутагенез (Kunkel et al. (1987), Methods Enzymol 154: 367-382) в положениях Asp-20, Asn-88 и Gln-126, и экспрессировали в E.coli с использованием системы для экспрессии pET-3a согласно описанию, предлагаемому производителем (Stratagene). Мутантные белки очищали восстановлением тел включения в гуанидин-HCl, переосаждали и подвергали ВЭЖХ как описано ранее. Полученный белок характеризовался чистотой >95% согласно анализу в окрашенном серебром SDS-ПААГ; концентрация и чистота белка определялись аминокислотным анализом (AAA) (точность AAA обычно >90%). Последовательность мутантных белков с подходящей активностью подтверждали масс-спектрометрическим анализом. Очищенные таким образом белки подвергали описанным выше исследованиям на Т- и NK-клетках. Относительные активности мутантных белков IL-2 в этих исследованиях приведены в табл. 1.

Таблица 1
Оценка селективной по отношению к Т-клеткам активности мутантных белков.

Мутантный белок	Относительная активность	
	На Т-клетках по отношению к NK-клеткам	На Т-клетках
IL-2 дикого типа	1	1.00000
D20 мутантные белки		
D20A	5	0.00024
D20H	3900	0.37081
D20I	7600	4.59635
D20K	330	0.05301
D20L	100	0.00063
D20M	490	0.05372
D20N	160	0.03000
D20Q	100	0.03180
D20R	33	0.00018
D20S	170	0.06640
D20T	1	1.00000
D20V	10	0.00093
D20Y	1000	0.06587
N88 мутантные белки		
N88A	50	0.50000
N88E	10	0.01172
N88F	22	0.02222
N88G	980	8.33333
N88H	3	0.00100
N88I	9600	0.98074
N88K	3	0.00010
N88L	4	0.00400
N88M	250	0.25000
N88R	6200	0.89730

Мутантный белок	Относительная активность		Относительная активность
	На Т-клетках по отношению к НК-клеткам	на Т-клетках	на НК-клетках
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 мутантные белки			
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

Активности мутантных белков описываются как относительная концентрация мутантного белка, требуемая для получения 50% от максимального ответа (EC_{50}), в сравнении с EC_{50} для IL-2 дикого типа в том же исследовании; в случае проведения нескольких анализов одного мутантного белка приводится среднее геометрическое полученных величин. Значения EC_{50} для IL-2 дикого типа лежат в пределах между -10 и 150 pM в исследовании на Т-клетках, и -50 и -200 pM в исследовании на НК-клетках. Это соотношение вычисляется для каждого мутантного белка с учетом активности, определяемой в исследованиях на Т- и НК-клетках, полученных от одного донора.

Активности мутантных белков можно разделить на 6 обширных категорий: 1) 1000-кратная селективность по отношению к Т-клеткам; 2) 100- <1000-кратная Т-клеточная селективность; 3) 10- <100-кратная селективность по отношению к Т-клеткам; 4) активность по отношению к Т-клеткам, повышенная по сравнению с IL-2; 5) селективность по отношению к НК-клеткам; 6) 10-кратная селективность либо к Т-, либо к НК-клеткам.

Класс 1: D20H, I и Y; N88G, I и R.

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

Класс 3: D20R; N88A, E, F, S и V; Q126F, I, N, R и S.

Класс 4: D20I; N88G; Q126E, L, M, N и R.

Класс 5: Q126A, H.

Класс 6: D20A, T и V; N88H, K, L, W и Y; Q126K, P, T, W и Y.

Внутри классов 1-3 предпочтительными являются мутантные белки, обладающие на Т-клетках активностью, близкой или превышающей активность IL-2 дикого типа. В классе 1 это белки D20H и I; N88G, I и R; в классе 2 - N88M и T, Q126D, E, G, L и V; в классе 3 - N88A, Q126F и G. Предсказано, что мутантные белки Класса 4 обладают большей, чем IL-2 дикого типа, потенциальной активностью *in vivo*.

По табл. 1 можно заметить, что ни одна единичная мутация не привела к инактивации мутантного белка IL-2 в обоих исследованиях.

Однако можно заключить, что комбинация мутаций по отдельным положениям, приведших к значительному снижению активности, потенциально может привести к антагонистической активности IL-2 на Т-клетках или других типах клеток, несущих высокоаффинный IL-2-рецептор. Получение такого антагониста предсказывается на основании этих данных, так как мутации вносились только для изменения взаимодействия с IL-2R β и IL-2R γ . Одним из таких примеров может быть двойной мутант D20R/Q126T. Предполагается, что сочетание слабоактивных мутаций в одной молекуле будет обладать комбинаторным эффектом, то есть активность D20R на Т-клетках - 0,00018, активность Q126T - 0,0001, и ожидается, что активность двойного мутанта D20R/Q126T будет составлять 0,000000018 активности IL-2 дикого типа на Т-клетках. Согласно приведенным данным можно составить и другие комбинации мутаций.

Пример 6. Биологическая активность IL-2 дикого типа и мутантных белков IL-2

На фиг.1-7 показаны кривые зависимости от дозы для IL-2 дикого типа (IL-2) и D20H (фиг.1), IL-2 и D20I (фиг.2), IL-2 и N88G (фиг.3), IL-2 и N88I (фиг.4), IL-2 и N88R (фиг.5), IL-2 и Q126E (фиг.6) и IL-2 и Q126L (фиг.7). А: Индивидуальный ответ на дозу IL-2 (закрашенные кружки) и мутантного белка (незакрашенные кружки) в исследовании пролиферации первичных Т-клеток (ФГА-бластов) человека. В: Индивидуальный ответ на дозу IL-2 (закрашенные треугольники) и мутантного белка (незакрашенные треугольники) в исследовании пролиферации первичных НК-клеток человека.

В частности, согласно графику приведенного на фиг.1 эксперимента доза IL-2 дикого типа, дающая 50% максимальной пролиферации (EC_{50}), составляет $\sim 1,5 \times 10^{-10}$ М в исследовании на Т-клетках (А) и $\sim 1 \times 10^{-10}$ М - на НК-клетках (В). Величина EC_{50} для D20H составила $\sim 2 \times 10^{-10}$ М в исследовании на Т-клетках и оценивалась $> 1 \times 10^{-5}$ М на НК-клетках. Таким образом, в этом исследовании конечное превышение активности D20H на Т-клетках над активностью на НК-клетках составляет >50,000 раз. Аналогичные результаты были получены при использовании крови других доноров (данные не приведены).

Согласно графику приведенного на фиг.2 эксперимента доза IL-2 дикого типа, дающая 50% максимальной пролиферации (EC_{50}), составляет $\sim 1,5 \times 10^{-10}$ М в исследовании на Т-клетках (А) и $\sim 3 \times 10^{-10}$ М - на НК-клетках (В). Величина EC_{50} для D20I составила также $\sim 1,5 \times 10^{-10}$ М в исследовании на Т-клетках и оценивалась $\sim 5 \times 10^{-6}$ М на НК-клетках. Таким образом, в этом исследовании конечное превышение активности D20I на Т-клетках над активностью на НК-клетках составляет $\sim 16,000$ раз.

Аналогичные результаты были получены при использовании крови других доноров (данные не приведены).

Согласно графику приведенного на фиг.3 эксперимента доза IL-2 дикого типа, дающая 50% максимальной пролиферации (EC_{50}),

составляет $\sim 4 \times 10^{-11}$ М в исследовании на Т-клетках (А) и $\sim 2 \times 10^{-10}$ М - на NK-клетках (В). Величина EC_{50} для N88G составила $\sim 5 \times 10^{-12}$ М в исследовании на Т-клетках и оценивалась $\sim 3 \times 10^{-8}$ М на NK-клетках. Таким образом, в этом исследовании конечное превышение активности N88G на Т-клетках над активностью на NK-клетках составляет $\sim 1,200$ раз. Аналогичные результаты были получены при использовании крови других доноров (данные не приведены).

Согласно графику приведенного на фиг.4 эксперимента доза IL-2 дикого типа, дающая 50% максимальной пролиферации (EC_{50}), составляет $\sim 1,5 \times 10^{-10}$ М в исследовании на Т-клетках (А) и $\sim 1 \times 10^{-10}$ М - на NK-клетках (В). Величина EC_{50} для N88I составила $\sim 4 \times 10^{-10}$ М в исследовании на Т-клетках и оценивалась $\sim 5 \times 10^{-6}$ М на NK-клетках. Таким образом, в этом исследовании конечное превышение активности N88I на Т-клетках над активностью на NK-клетках составляет $\sim 18,000$ раз. Аналогичные результаты были получены при использовании крови других доноров (данные не приведены).

Согласно графику приведенного на фиг.5 эксперимента доза IL-2 дикого типа, дающая 50% максимальной пролиферации (EC_{50}), составляет $\sim 1,5 \times 10^{-10}$ М в исследовании на Т-клетках (А) и $\sim 1 \times 10^{-10}$ М - на NK-клетках (В). Величина EC_{50} для N88R составила $\sim 9 \times 10^{-11}$ М в исследовании на Т-клетках и оценивалась $\sim 3 \times 10^{-7}$ М на NK-клетках. Таким образом, в этом исследовании конечное превышение активности N88R на Т-клетках над активностью на NK-клетках составляет $\sim 5,000$ раз. Аналогичные результаты были получены при использовании крови других доноров (данные не приведены).

Согласно графику приведенного на фиг.6 эксперимента доза IL-2 дикого типа, дающая 50% максимальной пролиферации (EC_{50}), составляет $\sim 8 \times 10^{-12}$ М в исследовании на Т-клетках (А) и $\sim 5 \times 10^{-11}$ М - на NK-клетках (В). Величина EC_{50} для Q126E составила $\sim 8 \times 10^{-13}$ М в исследовании на Т-клетках и оценивалась $\sim 2 \times 10^{-9}$ М на NK-клетках. Таким образом, в этом исследовании конечное превышение активности Q126E на Т-клетках над активностью на NK-клетках составляет ~ 400 раз. Аналогичные результаты были получены при использовании крови других доноров (данные не приведены).

Согласно графику приведенного на фиг.7 эксперимента доза IL-2 дикого типа, дающая 50% максимальной пролиферации (EC_{50}), составляет $\sim 5 \times 10^{-11}$ М в исследовании на Т-клетках (А) и $\sim 8 \times 10^{-11}$ М - на NK-клетках (В). Величина EC_{50} для Q126L составила $\sim 2 \times 10^{-11}$ М в исследовании на Т-клетках и оценивалась $\sim 2 \times 10^{-8}$ М на NK-клетках. Таким образом, в этом исследовании конечное превышение активности Q126L на Т-клетках над активностью на NK-клетках составляет ~ 625 раз. Аналогичные результаты были получены при использовании крови других доноров (данные не приведены).

Пример 7. Исследование токсичности на шимпанзе

Из мутантных белков IL-2, приведенных в табл. 1, был выбран IL-2/N88R из-за его

выраженной избирательной агонистической активности по отношению к Т-клеткам в исследованиях на первичных Т- и NK-клетках человека. По сравнению с IL-2 дикого типа он в $\sim 6,000$ раз более активен на Т-клетках, чем на NK-клетках, а по отношению к Т-клеткам обладает активностью, по существу равной активности IL-2 дикого типа. IL-2/N88R получали в клетках CHO, очищали и оценивали активность и токсичность на модели шимпанзе. На этой модели *in vivo* у белка обнаружена активность, сравнимая с активностью коммерчески доступного рекомбинантного варианта IL-2 (PROLEUKINTM, Chiron Corporation, Emeryville, CA), в отличие от которого мутантный белок обладает только мягкими побочными эффектами (как по объективным, так и по клиническим параметрам).

А. Экспериментальная работа

1. Материалы и методы

Часть исследования, включающая работу с животными, проводилась в исследовательском центре New Iberia Research Center (New Iberia, LA, Sponsor Bayer Corporation, Berkeley, CA) и включала две фазы исследований и 11 самцов шимпанзе от молодого до взрослого возраста, с массой тела в пределах от 45 до 70 кг.

Фаза I являлась стадией определения дозы и включала подкожное введение дозы наполнителя или подкожное введение дозы пролейкина, составлявшей $1,2 \text{ мг/м}^2$, дважды в день (BID) в течение 5 дней. Фаза II заключалась в сравнении действия наполнителя, пролейкина и IL-2/N88R, введенных подкожно, каждые 12 часов (q12h) в течение 5 дней. Дозу IL-2/N88R подбирали таким образом, чтобы его воздействие было сравнимо с пролейкином, исходя из анализа фармакокинетики. Образцы крови отбирали для анализа химического состава крови, CBC, гематологии/коагуляции и для ФСК-анализа (ФСК - флуоресцентная сортировка клеток) популяций Т- и NK-клеток, как подробно описано в разделах 5 и 6.

Таблица 2А.

Протокол Фазы I

Номер группы	Количество животных	Тестируемое вещество	Доза	Частота
1	1	наполнитель	NA	BID в течение 5 дней
2	2	пролейкин	$1,2 \text{ мг/м}^2$	BID в течение 5 дней

Таблица 2В

Протокол Фазы II

Номер группы	Количество животных	Тестируемое вещество	Доза	Частота
1	2	наполнитель	$2,4 \text{ мл/кг}$	q12 h в течение 5 дней
2	3	пролейкин	$1,2 \text{ мг/м}^2$	q12 h в течение 5 дней
3	3	IL-2/N88R	$1,2 \text{ мг/м}^2$	q12 h в течение 5 дней

2. Процедура введения дозы

В дни, когда отбирали кровь, перед введением исследуемого вещества или наполнителя животным давали общую анестезию с применением кетамина IM в количестве приблизительно 10 мг/кг . В дни, когда отбор проб крови не требовался, перед введением исследуемого вещества или наполнителя животных физически иммобилизовали в тесной клетке. Дозу вводили подкожно каждые 12 часов в течение 5 дней, шерсть в районе инъекций состригали

в первый день исследования. Место и время инъекции записывали при введении каждой дозы.

3. Клинические наблюдения

(а) Ежедневные наблюдения и потребление пищи. Каждое животное наблюдалось дважды в день, и о любом отклонении сообщалось руководителю исследования. Животные, выглядевшие больными, брались под наблюдение руководителя исследования, ветеринара проекта и представителя спонсора. Потребление пищи подтверждалось и фиксировалось дважды в день методом визуального наблюдения.

(б) Масса тела. Массу тела определяли до исследования, перед введением дозы в первый день и каждый раз при усыплении животного для отбора крови.

(с) Наблюдение мест инъекций. Места инъекций осматривались ежедневно. Любые отклонения, такие как покраснение или набухание, фиксировались.

График отбора проб в Фазе II
Таблица 3А

Время	ПФК (полная формула крови)	Химический анализ	Коагуляция	ФСК	Исследование спонсора
До исследова-	X	X	X	X	X
День 1, до введения	X	X	X	X	X
День 1, 15 мин					X
День 3, до введения	X	X	X	X	X
День 3, 15 мин					X
Время	ПФК (полная формула крови)	Химический анализ	Коагуляция	ФСК	Исследование спонсора
День 6	X	X	X	X	X
День 8	X	X	X	X	X
День 10	X	X	X	X	X
День 12	X	X	X	X	X
День 15	X	X	X	X	X
День 30	X	X	X	X	X

4. Работа с пробами

(а) Химический анализ сыворотки. От каждого животного в указанные выше сроки собирали приблизительно по 2 мл крови в пробирки без антикоагулянта. Документировали время отбора пробы и оставляли кровь при комнатной температуре для свертывания. Затем образцы центрифугировали, собирали сыворотку и отправляли ее в лабораторию NIRC Clinical Pathology Laboratory. Стандартная панель исследования сыворотки лаборатории NIRC представлена в табл. 4.

Панель химического состава сыворотки
Таблица 4

Натрий	Фосфор
Калий	Азот мочевины
Хлорид	Креатинин
Общий билирубин	Общий белок
Щелочная фосфатаза	Альбумин
Лактат дегидрогеназа (LDH)	Соотношение Альбумин/Глобулин
Аспартат аминотрансфераза (AST)	Глюкоза
Аланин аминотрансфераза (ALT)	Кальций
Диоксид углерода (CO ₂)	Гамма-глутамил трансфераза (GGT)

(b) Гематология. От каждого животного в указанные выше сроки собирали приблизительно по 2 мл крови в пробирки с ЭДТА и отправляли в лабораторию NIRC Clinical Pathology Laboratory. Проводили стандартное для NIRC гематологическое исследование всех образцов, включавшее полную формулу крови, дифференциальную и тромбоцитарную формулу.

(с) Исследования спонсора. В указанные выше сроки собирали приблизительно по 6 мл крови в пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Документировали время отбора крови. Образцы центрифугировали, плазму отделяли и разносили алиquotы по трем отдельным пробиркам. Плазму хранили замороженной (-60°C или ниже) и по окончании исследования отправили в Bayer Corporation, Berkeley, CA.

5. Исследование ФСК

(а) Методика. Примерно 5 мл крови отбирали в натрий гепариновый антикоагулянт в сроки, указанные для ФСК-анализа.

Полный образец крови был получен либо в ЭДТА, либо в ACD, либо в гепарине. Количество клеток доводили до уровня 2-20 тысяч в мм³.

Для проведения исследования на антитела помечали соответствующим образом 12x75 стеклянных или пластиковых пробирок. В каждую пробирку добавляли антитело или смесь антител в объеме, предлагаемом производителем.

В каждую пробирку добавляли по 100 мкл хорошо перемешанного образца крови и смесь инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.

После инкубации добавляли по 2 мл лизирующего раствора (Becton Dickinson FACS brand lysing solution, BD# 92-0002), аккуратно перемешивали и оставляли на 10 минут при комнатной температуре. Затем пробирки центрифугировали при комнатной температуре в течение 5 минут при 300xg. Декантировали супернатанты, удаляли излишки жидкости и к каждому клеточному осадку добавляли по 1 мл буфера PBS (Gibco 14190-144). После аккуратного перемешивания пробирки центрифугировали при комнатной температуре в течение 5 минут при 300xg. Декантировали супернатанты, удаляли излишки жидкости и к каждому клеточному осадку добавляли по 1 мл фиксирующего раствора (0,5% раствор формальдегида, полученный разведением 10% формальдегида (Polyscience, Inc. #0418) буфером PBS в соотношении 1:20) и аккуратно ресуспендировали перемешиванием. Затем образцы анализировали в цитометре Coulter EPICS SL Flow Cytometer.

В исследовании использовали следующие антитела: изотипный контроль MigG1/MigG1 (Becton Dickinson, Cat. # 349526), CD45-PerCP (Becton Dickinson, Cat. # 347464), CD8-FITC (Becton Dickinson, Cat. # 347313), CD25-PE (Becton Dickinson, Cat. # 30795X), CD4-FITC (Becton Dickinson, Cat. # 340133), CD16-PE (Becton Dickinson, Cat. # 347617), CD3-PerCP (Becton Dickinson, Cat. # 347344).

6. Профиль коагуляции

В указанные выше сроки отбирали

приблизительно по 2 мл полной крови в пробирки с цитратом натрия в качестве антикоагулянта. Профиль коагуляции состоял из времени протромбина (PT), времени активированного неполного тромбопластина (APTT) и фибриногена.

В. Результаты и обсуждение

1. Определение дозы пролейкина

Первичной целью этой фазы было определение оптимальной дозы пролейкина для сравнения с IL-2/N88R. Эта доза пролейкина должна быть переносимой (меньшей максимальной переносимой дозы) и в идеале должна вызывать клинически достоверный, но умеренный и обратимый токсический эффект. Доза пролейкина, составляющая 1,2 мг/м² дважды в день, была определена в качестве начальной на основании кросс-экстраполяции требований к дозам пролейкина, их токсичности и ответа на пролейкин содержащихся в неволе обезьян *Супомолгус*.

Двум шимпанзе вводили пролейкин указанным способом. На протяжении курса у животных наблюдалось значительное снижение активности, беспокойство и обезвоживание. У обоих животных на 3 или 4 день развились тяжелые желудочно-кишечные симптомы, включавшие снижение аппетита, диарею, рвоту. Введение препарата одному из животных (номер X-159) было прекращено после 3 дней из-за сильной почечной (фиг.8А и В) и умеренной печеночной (фиг.8С и D) дисфункции, отраженной в химических показателях крови. Эти показатели включали повышение уровня азота мочевины крови (BUN), креатинина и общего билирубина, ALT (аланин-аминотрансферазы) (SGPT (сывороточная глутамопировиноградная трансаминаза). Животному X-159 на 3 и 4 день, а животному X-124 только на 4 день ввели внутривенно раствор лактата Рингера в качестве восстанавливающего средства и для предотвращения дальнейшей дегидратации. На 8 день животное X-159 исключили из исследования из-за почечной дисфункции и возможного тромба на правой ноге, на что указывал очень слабый пульс (бедренный) и то, что вся икра была холодная и увеличенная. Хотя значительная токсичность наблюдалась в одном животном, у другого наблюдались менее тяжелые симптомы, и профиль неблагоприятных эффектов у обоих животных был обратим. Основываясь на этих данных, в качестве подходящих для сравнения препаратов доз были выбраны 1,2 мг/м² пролейкина и эквивалентная (по воздействию) доза IL-2/N88R, каждые 12 часов.

2. Сравнение IL-2/N88R и пролейкина

Клинические наблюдения. В табл. 5 приведены клинические наблюдения, сделанные в течение исследования. Величины оцениваются по шкале от 0 до 5, где 5 означает "тяжелое". Все животные, которым вводили пролейкин, были тяжело больны; наблюдалась одна смерть, связанная с введением пролейкина. Величины, приведенные после 6 дня, для группы пролейкина отражают данные, полученные от оставшихся двух животных. Наиболее очевидным побочным эффектом применения IL-2/N88R было умеренное желудочно-кишечное расстройство (рвота),

хотя введение препарата индуцировало условную токсичность, оцениваемую параметрами, приведенными в табл. 4. Масса тела животных группы, которым вводили пролейкин, снизилась на 6% на 6 день и на 10% на 10 день, после этого медленно восстановилась (фиг.9). Напротив, у животных из групп IL-2/N88R и Наполнитель максимальное наблюдавшееся снижение массы составляло 1-3%.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Таблица 5.

Клинические наблюдения

Препарат	Общее состояние	Потеря аппетита	Рвота	ЖКТ	Недомогание
IL-2/N88R	хорошее	1	1	2	1
пролейкин	тяжелая боль	5	4/5	5	4/5
Наполнитель	нормальное	0	0	0	0

*Шкала от 0 до 5, где 5 – "тяжелое"

(а) Гематология. IL-2/N88R вызывал клеточные эффекты, согласующиеся с активацией пролейкина, в частности лимфоцитоз (фиг.10А), также наблюдалось увеличение количества лейкоцитов (фиг.10В) и нейтрофилов (фиг.10С). В течение исследования IL-2/N88R вызывал незначительную тромбоцитопению (низшая точка ~15%) по сравнению с пролейкином (низшая точка ~50%) (фиг.10D).

(b) Функция почек. На 6 и 8 дни уровни BUN были заметно выше у животных, которым вводили пролейкин (фиг.11А). Уровни BUN составляли более 130 мг/дл у двух из этих животных; также у двух животных резко повысились уровни креатинина на 6 и 8 дни (фиг.11В), что указывает на полное прекращение работы почек. Кроме того, у животных, которым вводили пролейкин, сильно возрос дефицит как фосфора сыворотки, так и анионов на 6 и 8 дни. Напротив, у всех животных, которым вводили IL-2/N88R, эти параметры работы почек оставались в основном в норме на протяжении исследования (фиг.11С и D).

(с) Функция печени. У животных группы, которой вводили пролейкин, общий билирубин более чем утроился на 6 день и оставался высоким до 10 дня (фиг.12А). Напротив, только у одного животного группы IL-2/N88R наблюдалось временное незначительное повышение этого параметра на 3 и 6 день. Уровень SGPT сыворотки резко повысился и достиг более 100 ед/л у всех животных группы, которой вводили пролейкин, на 6 день (фиг.12В). Уровень SGPT у животного A199 достиг 651 ед/л, а уровень SGOT (сывороточная глутамощавелевоуксусная трансаминаза) - 2789 ед/л (Лабораторный Журнал: NIRC#8754-9852-Фаза II, Таблица 1. Индивидуальные и групповые средние химические показатели, стр.17 из 21 в табл.), что указывает на тяжелую печеночную недостаточность.

(d) Коагуляция. Уровень фибриногена более чем удвоился у животных как группы, которой вводили пролейкин, так и группы IL-2/N88R и достиг максимума на 6 день (фиг.12С). Увеличение уровня у животных группы, которой вводили пролейкин, произошло раньше, чем у животных группы IL-2/N88R. Это отражено показателями 51% против 5% на 3 день. Изменения уровня фибриногена являются скорее результатом острого белкового ответа, чем дефектов

коагуляции, так как в этот период не наблюдалось значительных изменений уровня АРТТ или РТ (фиг.12D). Однако, начиная с 10 дня, у животных группы, которой вводили пролейкин, наблюдалась явная тенденция к увеличению уровня АРТТ, хотя его абсолютные значения оставались в пределах нормы. Такая же тенденция, хотя и в меньшей степени, наблюдалась у животных группы IL-2/N88R. Интересным оказался тот факт, что в соответствующий период времени уровень фибриногена снижался в обеих группах.

(е) Гомеостаз. У двух из трех животных группы, которой вводили пролейкин, уровень натрия в сыворотке снизился до значения меньше 135 мэкв/л на 8 день, но оставался в норме у остальных животных (фиг.13А). Уровень хлорида у животных группы, которой вводили пролейкин, также снизился до значения меньше 95 мэкв/л на 3 день и оставался низким до 15 дня (фиг.13В). Уровень кальция был ниже у двух из трех животных группы, которой вводили пролейкин, на 6 и 8 дни и достиг значений 4,9 и 3,1 мг/дл у животного А199 (фиг.13С). Уровень калия снижался до значений меньше 3 мэкв/л с 3 по 12 дни у животных группы, которой вводили пролейкин, кроме животного А 199, у которого уровень калия фактически снизился до уровня токсичности 7,2 мэкв/л перед исключением его из исследования (фиг.13D).

(f) Признаки проницаемости сосудов. Уровень альбумина сыворотки снижался как в группе, которой вводили (37%), так и в группе IL-2/N88R (19%) (фиг.14А). Повышение уровня гематокрита наблюдалось в группе, которой вводили пролейкин, на 3 и 6 дни (фиг.14В). Напротив, как в группе, получавшей наполнитель, так и в группе IL-2/N88R уровень гематокрита снижался в соответствующий период и оставался низким, указывая на среднюю анемию, которая и ожидалась из-за многократного отбора проб крови (фиг.14В и С). Повышение уровня гематокрита в группе, которой вводили пролейкин, совместно со снижением альбумина согласуется с развитием синдрома проницаемости капилляров.

3. Активация клеток

Эффективность пролейкина и IL-2/N88R отслеживали по различию в процентном содержании CD25-положительных лимфоцитов (движение + пролиферация) и по значению флуоресценции CD25 или количеству СВ25-антигенов, экспрессированных на поверхности данной Т-клетки (CD25=низкоаффинному IL-2R). Экспрессию CD25 отслеживали на общей популяции Т-клеток (CD3+ клетки), а также на популяциях CD3+CD4+ и CD3+CD8+.

Активность IL-2 на НК-клетках отслеживали по анализу движения CD3-CD16+ и CD3-CD25+CD16+НК-клеток. Абсолютное количество CD3+, CD4+, CD8+, НК-клеток определяли умножением процентного содержания клеток на количество лимфоцитов в мм, данные получали во время гематологического анализа.

(а) CD25-регуляция экспрессии на поверхности Т-клеток. Согласно уровню CD25-положительных клеток процентное содержание активированных Т-клеток

регулировалось в сторону увеличения на 6 день исследования, в основном на CD3+CD4+ популяции Т-клеток. Оказалось, что пролейкин индуцирует экспрессию CD25 в более высоком проценте общей популяции CD3+, CD3+CD4+ и CD3+CD8+ субпопуляций Т-клеток на 6 день. Однако на 8 день процент клеток, экспрессирующих CD25-антиген, был идентичен в лимфоцитах шимпанзе, которым вводили пролейкин, и шимпанзе, которым вводили IL-2/N88R (фиг.15А, В и С). Ни у шимпанзе, которым вводили пролейкин, ни у тех, которым вводили IL-2/N88R, не наблюдалось окрашивания CD25 на поверхности популяции НК-клеток. Предполагается, что этот результат объясняется недостатком экспрессии IL-2R α (антигена, на который направлено окрашивание CD25 на клеточной поверхности) на поверхности выбранной популяции НК-клеток (CD3-/CD16+).

Абсолютное количество CD3+CD25+ Т-клеток определяли так же, как и процентное содержание CD3+CD25+ Т-клеток, причем оказалось, что пролейкин более активен, чем IL-2/N88R (фиг.16А). Обнаружено, что IL-2/N88R обладает потенциалом активации Т-клеток, сходным с потенциалом пролейкина на CD3+CD4+ Т-клеточной популяции, так как увеличение абсолютного количества CD3+CD4+CD25+ лимфоцитов, вызываемое IL-2/N88R, идентично такому же эффекту, вызываемому пролейкином (фиг.16 В). Обнаружено, что пролейкин увеличивает количество CD3+CD8+CD25+ Т-клеток в большей степени, чем IL-2/N88R (фиг.16С).

При введении как пролейкина, так и IL-2/N88R наблюдалась идентичная кинетика количества молекул CD25 (по значению флуоресценции), экспрессированных на CD3+CD4+ субпопуляции Т-клеток (фиг.17).

(b) Движение лимфоцитов: влияние введения пролейкина и IL-2/N88R

Активность пролейкина и IL-2/N88R на популяциях Т- и НК-клеток определяли по анализу различий в абсолютном количестве циркулирующих лимфоцитов до, во время и после введения (фиг.18). Обнаружено, что IL-2/N88R обладает большей, чем пролейкин, активностью по увеличению абсолютного количества циркулирующих CD3+CD4+ лимфоцитов (фиг.18А) и несколько сниженной по сравнению с пролейкином активностью по увеличению абсолютного количества циркулирующих CD3+CD8+ лимфоцитов (фиг.18В). Оба соединения обладают сравнимым, хотя и умеренным эффектом на увеличение общего количества CD3+ лимфоцитов (фиг.18С). Ни пролейкин, ни IL-2/N88R не влияют на движение НК-клеток (фиг.18D).

С. Выводы

IL-2/N88R был выбран путем анализа мутантных белков IL-2 в исследованиях на первичных Т- и НК-клетках человека. Он обладает 6,000-кратной селективностью *in vitro* по отношению к Т-клеткам по сравнению с НК-клетками. С учетом этого клеточного профиля было постулировано, что IL-2/N88R будет вызывать только слабые побочные эффекты при дозировке, которая вызовет значительную активацию Т-клеток. Эксперименты на шимпанзе, сравнивавшие пролейкин и IL-2/N88R, подтвердили, что IL-2/N88R обладает значительно лучшим

профилем безопасности, чем пролейкин при сохранении сравнимой способности вызывать активацию Т-клеток.

Пример 8. Эффективность IL-2-селективного агониста N88R на модели мышинной метастазирующей в легкие опухоли СТ-26.

Методика: Мышам (Balb/c, самки, возраст 6-8 недель) в 0 день вводили внутривенно (IV) в боковую хвостовую вену 1×10^5 клеток СТ-26 (карцинома толстой кишки мыши) в 0,2 мл PBS. Лечение проводили пролейкином или IL-2/N88R в различных дозах (растворитель: 5% раствор декстрозы в воде (D5W)) или D5W, введением внутривенно, один раз в день в течение 8 дней (QD $\times$ 8), начиная с 1 дня после имплантации. IL-2/N88R готовили при комнатной температуре разведением в D5W, используя силиконизированные ампулы и туберкулиновые шприцы, и вводили животным в течение 2 часов после приготовления. Пролейкин готовили добавлением в каждую ампулу 0,7 мл стерильной воды для инъекций (SWFI) (до конечной концентрации 1,86 мг/мл). Разведения готовили так же, как описано для IL-2/N88R в D5W (табл. 6). Животных забивали на 11 день. Легкие удаляли и взвешивали, промывали в PBS и переносили ткань в раствор Боуэна (Bouin). Через 24 часа ткань переносили в 10% формалин. Количество метастатических колоний в легких подсчитывали под микроскопом для препарирования.

Таблица 6.
Дозы и группы в исследовании на модели мышинной опухоли СТ-26.

Группы	N	Препарат	Доза, мг/кг
1	14	D5W	NA
2	11	пролейкин	3 мг/кг
3	11	пролейкин	10 мг/кг
4	11	IL-2/N88R	1 мг/кг
5	12	IL-2/N88R	3 мг/кг
6	12	IL-2/N88R	10 мг/кг
7	12	IL-2/N88R	30 мг/кг
8	11	IL-2/N88R	60 мг/кг

В табл. 7 приведено количество метастаз, подсчитанное в каждой мыши. При введении пролейкина и IL-2/N88R наблюдалась сравнимая эффективность. При введении высоких доз IL-2/N88R (группа 8, 60 мг/кг) у всех мышей, кроме одной, наблюдалось 12 метастаз или меньше. Этот результат контрастирует с результатом применения высшей дозы пролейкина, при которой у всех выживших мышей наблюдалось 12 метастаз или больше.

Таблица 7.
Количество метастазов в каждой мыши и среднее количество метастазов.

Группа	Количество метастазов в легких (для каждой мыши)	Среднее	Станд. ошибка	Значение Р
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	0.97278
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	171 176 186 159 192 139 117 200 195 115 92	168	9.31	0.43401
6	92 111 112 114 109 84 68 47 58 49 112	87	8.16	0.00060
7	15 13 59 62 25 55 46 16 9 4 8 2	26	6.57	0.00000
8	7 0 3 2 4 9 7 0 12 55 0	9	4.75	0.00000

Значительное снижение количества метастазов наблюдалось у мышей, которым вводили IL-2/N88R в дозах 10,30 и 60 мг/кг (группы 6, 7 и 8 соответственно) и у мышей, которым вводили пролейкин в дозе 10 мг/кг (группа 3). Эти результаты отображены графически на фиг.19. График строили, используя логарифм доз: для пролейкина дозы были 3 и 10 мг/кг; для IL-2/N88R - 1,3, 10, 30 и 60 мг/кг. Согласно кривой, построенной по нелинейному закону (по 4 параметрам), величины IC₅₀ составили 5,2 мг/кг для пролейкина и 10,9 мг/кг для IL-2/N88R.

По данным этого эксперимента были вычислены величины IC₅₀ по отношению к снижению количества метастазов, для IL-2/N88R - 10,9 мг/кг (8,6 - 13,9 мг/кг при достоверности 95%) и для пролейкина - 5,2 мг/кг (3,5 - 7,7 мг/кг при достоверности 95%).

Данные по выживанию мышей представлены в табл. 8. В группе мышей, которым вводили 10 мг/кг пролейкин, одна (1) мышь умерла на 7 день и еще пять (5) - на 8 день. По одной (1) мыши пало на 8 день в группах, которым вводили 3 или 10 мг/кг IL-2/N88R, и не отмечалось смертей у мышей, которым вводили 1, 30 или 60 мг/кг IL-2/N88R. Кроме того, большинство мышей, которым вводили 3 или 10 мг/кг пролейкина, были умирающими, среди мышей, которым вводили IL-2/N88R, умирающих не наблюдалось.

Таблица 8.
Выживание мышей, которым вводили IL-2/N88R или пролейкин.

Группа	День			
	0	7 ¹	8	11
D5W ¹	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
пролейкин: 3мг/кг ²	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
пролейкин: 10мг/кг ²	100.0%	90.9%	45.5%	45.5%
IL-2/N88R: 1мг/кг ³	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
IL-2/N88R: 3мг/кг ³	100.0%	100.0%	91.7%	91.7%
IL-2/N88R: 10мг/кг ³	100.0%	100.0%	91.7%	91.7%
IL-2/N88R: 30мг/кг ³	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
IL-2/N88R: 60мг/кг ³	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

¹n=14 мышей в группе

²n=11 мышей в группе

³n=12 мышей в группе

⁴До 7 дня смертей не наблюдалось.

Животные обеих групп, которым вводили пролейкин, были умирающими. Среди животных, которым вводили IL-2/N88R, умирающих не наблюдалось.

Итак, в этих исследованиях показано, что IL-2/N88R так же эффективен в снижении тяжести опухолевого заболевания, как и пролейкин (согласно подсчету метастазов в легких на модели СТ-26). Кроме того, было показано, что IL-2/N88R значительно менее токсичен, чем пролейкин.

Пример 9. Получение стабильных, высокопродуктивных клеточных линий CHO, экспрессирующих IL2N88R

Клеточные линии со стабильной продукцией, секретирующие большие количества мутантного белка IL2N88R, были получены трансфекцией клеток CHO(dhfr-) вектором для экспрессии, приведенным на фиг.20 (ATCC Депозит №_PTA-8). Отдельные элементы вектора для экспрессии IL2N88R указаны на плазмидной карте (фиг.20). Обозначения: CMV e/p=цитомегаловирусный ранний промотор; PA=сигнал полиаденилирования из SV40; DHFR=кассета экспрессии дигидрофолат редуктазы.

Вектор сконструирован при использовании стандартных методик рекомбинантной ДНК. Общие ссылки: Sambrook et al., Molecular Cloning, 2d ed., 1989, Cold Spring Harbor Press; Short Protocols in Molecular Biology, 2d ed., 1992, John Wiley & Son; Methods in Enzymology, v. 185, Ed. Goeddel et al. Academic Press, Inc., London, 1991. Экспрессионный вектор содержит отдельные кассеты для экспрессии гена IL2N88R и амплифицируемого и селективного гена DHFR (дигидрофолат редуктазы). Около 1×10^6 клеток CHO (яичников китайских хомячков) трансфицировали 10 мкг PBC1IL2SA при использовании реактивов Lipofectin (Life Technology Inc., Bethesda, Maryland) согласно указаниям производителя. Затем клетки отбирали в присутствии 50 нМ метотрексата и растили в среде DME/F12, дефицитной по тимидину и гипоксантину, с добавлением 5% диализованной эмбриональной бычьей сыворотки. Клеточные популяции анализировали на продукцию IL2N88R с использованием коммерческого набора для ELISA (R & D Systems). Затем высокопродуктивные популяции отбирали в среды, содержащие возрастающие концентрации метотрексата (от 100 до 400 нМ метотрексата) и анализировали на продукцию IL2N88R. Затем применяли клонирование с ограниченным разведением для получения клонов с высокой и стабильной продуктивностью. Клонирование проводили в отсутствие метотрексата с использованием стандартных методик работы с культурами клеток.

Пример 10. Получение IL2N88R без использования сыворотки в перфузионном биореакторе

Непрерывное производство IL2N88R было организовано с применением непрерывной перфузионной ферментации. В 19-литровый ферментер Уитона (Wheaton) загрузили клетки стабильной линии CHO из примера 9 в концентрации 2×10^6 клеток/мл и инкубировали при уровне обмена среды 5 л/день. Использовали среду на основе среды DME/F12 (Life Technologies, Inc., Rockville, MD) с добавлением рекомбинантного человеческого инсулина (10 мкг/мл) (HUMULIN™, Eli Lilly, Inc., Indianapolis, IN) и FeSO₄ ЭДТА (50 мкМ). Плотность клеток поддерживали на уровне 4×10^6 клеток/мл. Средний дневной выход ферментера составлял ~200 мг/день. Продукция IL2N88R стабильно поддерживалась в течение 30 дней.

Пример 11. Очистка IL-2/N88R, полученного в клетках CHO

Перфузионный элюат, описанный выше, обрабатывали следующим образом. Перфузионную среду собирали и наносили на колонку с S-сефарозой. Колонку уравнивали 20 мМ фосфатным буфером с 5 мМ NaCl при pH 7,0. Проводимость исходного материала ("TCF") доводили до 4 мСм добавлением воды, а pH доводили до указанного значения фосфорной кислотой.

После загрузки TCF колонку промывали тем же буфером, который использовали, уравнивания. Элюирование осуществляли сдвигом pH. Мутантные белки элюировали 20 мМ этаноламином, pH 10,5, с образованием S-элюата.

Анионный обмен проводили пропусканием S-элюата через колонку QAE Fast Flow™ (Pharmacia), уравненную 10 мМ бикарбонатным буфером при pH 10,5. Скорость прохождения поддерживали на уровне 250 см/ч. После промывания до линии основания IL-2SA элюировали 20 мМ фосфатом pH 4,0.

Хроматографию на гидроксиапатите (HAP) проводили пропусканием разбавленного элюата QAE (1:1 WFI (вода для инъекций)) через колонку, заполненную керамическим гидроксиапатитом (Тип П, BioRad, Hercules, CA), уравненную 10 мМ фосфатом при pH 7,0. Скорость прохождения поддерживали на уровне 250 см/час. После промывания до линии основания IL-2SA элюировали 100 мМ фосфатом pH 7,0.

Элюат с гидроксиапатита подвергали ультрафильтрации до объема 300 мл с использованием устройства Millipore Pelicon-2 с тремя картриджами PES 5K (Millipore Corporation, Bedford, MA).

Элюат HAP после ультрафильтрации очищали пропусканием через гель-фильтрационную колонку S100HR (Pharmacia) при скорости 35 см/ч. Колонку уравнивали 10 мМ фосфатом и 150 мМ NaCl pH 7,0.

Фракцию после гель-фильтрации разводили WFI до достижения проводимости 4,0 мСм/см и повторно наносили на S-сефарозу в описанных выше условиях. IL2SA элюировали 10 мМ Фосфатным буфером с 1M NaCl при pH 7,0.

Конечную фракцию после катионного обмена диализовали против фосфатного буфера PBS в течение ночи и разводили стерильным PBS до концентрации 6 мг/мл. Итоговый раствор стерильно фильтровали, разделяли на аликвоты и замораживали при -70°C. Общий выход составил 65%.

Специалист в данной области техники может разработать и другие варианты осуществления изобретения. Из изобретения следует способ получения мутантных белков, не обязательно специально описанных в данной работе, но обладающих способностью активировать Т-клетки, что подтверждается пролиферацией ФГА-бластов и сниженной пролиферацией NK-клеток, и, таким образом, эти белки составляют объем и сущность данного изобретения. Концепция и экспериментальный подход, описанные в данной работе, применимы к другим цитокинам, использующим гетерологичные многомерные рецепторные системы, в частности это относится к цитокинам IL-7, IL-9 и IL-15, IL10, интерферону α и интерферону γ .

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

В данной заявке содержатся следующие последовательности:

SEQ ID NO: 1: аминокислотная последовательность интерлейкина-2 человека (hIL-2)

SEQ ID NO: 2: последовательность кДНК IL-2

SEQ ID NO: 3: 5' Праймер для ПЦР IL-2

SEQ ID NO: 4: 3' Праймер для ПЦР IL-2

SEQ ID NO: 5: Праймер для мутагенеза для IL-2 экспрессионного вектора

SEQ ID NO: 6: Праймер для мутагенеза для мутаций D20X

SEQ ID NO: 7: Праймер для мутагенеза для мутаций N88X

SEQ ID NO: 8: Праймер для мутагенеза для мутаций Q126X

Формула изобретения:

1. Полипептид, представляющий собой мутантный белок интерлейкина-2 человека с нумерацией согласно IL-2 дикого типа, где человеческий IL-2 замещен по крайней мере по одному положению 20, 88 или 126, благодаря чему указанный мутантный белок активнрует Т-клетки предпочтительно перед естественными киллерными (NK) клетками.

2. Полипептид, представляющий собой мутантный белок IL-2 человека по п.1, в котором положение 20 замещено по сравнению с IL-2 дикого типа.

3. Полипептид, представляющий собой мутантный белок IL-2 человека по п.2, в котором положение 20 замещено на изолейцин.

4. Полипептид, представляющий собой мутантный белок IL-2 человека по п.2, в котором положение 20 замещено на гистидин.

5. Полипептид, представляющий собой мутантный белок IL-2 человека по п.1, в котором положение 88 замещено по сравнению с IL-2 дикого типа.

6. Полипептид, представляющий собой мутантный белок IL-2 человека по п.5, в котором положение 88 замещено на аргинин.

7. Полипептид, представляющий собой мутантный белок IL-2 человека по п.5, в котором положение 88 замещено на изолейцин.

8. Полипептид, представляющий собой мутантный белок IL-2 человека по п.5, в котором положение 88 замещено на глицин.

9. Полипептид, представляющий собой мутантный белок IL-2 человека по п.1, в котором положение 126 замещено по сравнению с IL-2 дикого типа.

10. Полипептид, представляющий собой мутантный белок IL-2 человека по п.9, в котором положение 126 замещено на аспарат.

11. Полипептид, представляющий собой мутантный белок IL-2 человека по п.9, в котором положение 126 замещено на глутамат.

12. Полипептид, представляющий собой

мутантный белок IL-2 человека по п.9, в котором положение 126 замещено на лейцин.

13. Фармацевтическая композиция, обладающая иммуностимулирующей активностью, включающая полипептид по п.1 в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

14. Полинуклеотид, представляющий собой последовательность ДНК, кодирующую мутантный белок IL-2 человека по п.1, и ее вырожденные варианты.

15. Вектор pBC1IL2SA для экспрессии мутантного белка IL-2 человека, содержащий полинуклеотид по п.14.

16. Линия клеток яичников китайских хомячков, трансформированная вектором по п.15, которая продуцирует мутантный белок IL-2 человека.

17. Линия клеток африканской зеленой мартышки, трансформированная вектором по п.15, которая продуцирует мутантный белок IL-2 человека.

18. Штамм E.Coli, трансформированный вектором по п.15, который продуцирует мутантный белок IL-2 человека.

19. Линия клеток Spodoptera frugiperda, трансформированная вектором по п.15, которая продуцирует мутантный белок IL-2 человека.

20. Способ лечения млекопитающих, страдающих онкологическими заболеваниями, поддающимися лечению IL-2, путем введения терапевтически эффективного количества мутантного белка IL-2 человека по п.1.

21. Способ по п.20, где заболевание, поддающееся лечению IL-2, представляет собой рак, в том числе почечную карциному, карциному толстой кишки и злокачественную меланому.

22. Способ отбора мутантных белков IL-2 по оценке их в исследованиях с применением IL-2R $\alpha\beta\gamma$ в сравнении с IL-2R $\beta\gamma$, где активность мутантного белка IL-2 повышается по отношению к IL-2 дикого типа в одном из исследований предпочтительно перед другим.

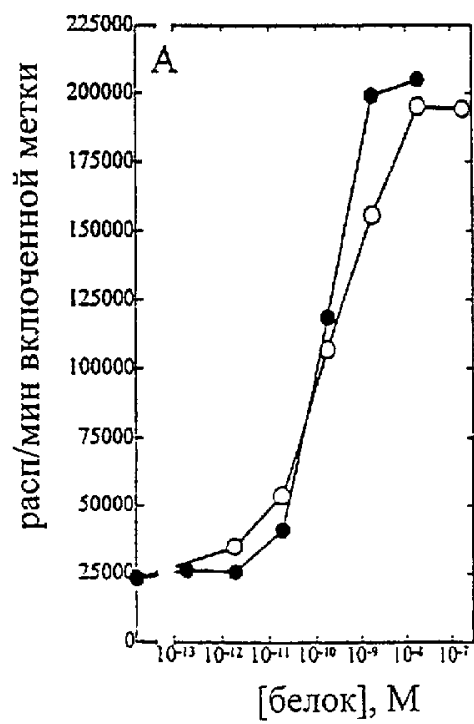
23. Способ по п.22, где IL-2R $\alpha\beta\gamma$ и IL-2R $\beta\gamma$ представляют собой отдельные рецепторные субъединичные эктодомены в соответствующей комбинации и используются для оценки прямого связывания мутантных белков IL-2 с каждым рецепторным комплексом.

24. Способ по п.22, где в исследовании с использованием IL-2R $\alpha\beta\gamma$ учитывается ответ IL-2R $\alpha\beta\gamma$ -несущих клеток, а в исследовании с использованием IL-2R $\beta\gamma$ учитывается ответ IL-2R $\beta\gamma$ -несущих клеток.

25. Способ по п.24, где IL-2R $\alpha\beta\gamma$ -несущими клетками являются ФГА-бласты, а IL-2R $\beta\gamma$ -несущими клетками являются NK-клетки.

26. Способ по п.25, где исследуется пролиферация как IL-2R $\alpha\beta\gamma$ -несущих клеток, так и IL-2R $\beta\gamma$ -несущих клеток.

60



Фиг. 1А

```

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

```

```

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

```

```

<400> 3
cctcaactcc tgaattcatg tacaggatgc 30

```

```

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

```

```

<400> 4
ggaagcggat ccttatcaag tcagtgttga g 31

```

```

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

```

```

<400> 5
gcacttgcca caaacaccat ggcacctact tcaagt 36

```

```

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

```

```

<400> 6
ggagcattta ctgctgnnnt tacagatg 28

```

```

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

```

```

<400> 7
gggacttaat cagcnnnatic aacgtaatag 30

```

```

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

```

```

<400> 8
ggattacett ttgtnnnagc atcatctc 28

```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИД. № 1:

- (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
- (A) ДЛИНА: 133
 - (B) ТИП: аминокислотная
 - (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
 - (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: белок
- (A) ОПИСАНИЕ: белок интерлейкина-2 человека, зрелая последовательность
- (iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: нет
 - (iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет
- (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. ИД. № 1:

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu
1				5					10					15
His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn
				20					25					30
Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr
		35					40					45		
Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu
		50					55					60		
Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser
		65					70					75		
Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn
		80					85					90		
Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys
		95					100					105		
Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg
		110					115					120		
Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr		
		125					130							

RU 2 2 3 5 7 2 9 C 2

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИД. № 2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 465
(B) ТИП: нуклеотидная
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: две
(E) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеотид

(A) ОПИСАНИЕ: кДНК интерлейкина-2 человека, включающая сигнальный пептид и два концевых стоп-кодона

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: нет

(iii) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. ИД. № 2:

ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT TGC ATT GCA CTA AGT CTT GCA
CTT 48
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala
Leu

GTC ACA AAC AGT GCA CCT ACT TCA AGT TCT ACA AAG AAA ACA CAG
CTA 96
Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln
Leu

CAA CTG GAG CAT TTA CTG CTG GAT TTA CAG ATG ATT TTG AAT GGA
ATT 144
Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly
Ile

AAT AAT TAC AAG AAT CCC AAA CTC ACC AGG ATG CTC ACA TTT AAG
TTT 192
Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys
Phe

TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACA GAA CTG AAA CAT CTT CAG TGT CTA
GAA 240
Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu
Glu

GAA GAA CTC AAA CCT CTG GAG GAA GTG CTA AAT TTA GCT CAA AGC
AAA 288
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser
Lys

AAC TTT CAC TTA AGA CCC AGG GAC TTA ATC AGC AAT ATC AAC GTA
ATA 336
Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val

Ile

GTT CTG GAA CTA AAG GGA TCT GAA ACA ACA TTC ATG TGT GAA TAT
GCT 384

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr
Ala

GAT GAG ACA GCA ACC ATT GTA GAA TTT CTG AAC AGA TGG ATT ACC
TTT 432

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr
Phe

TGT CAA AGC ATC ATC TCA ACA CTG ACT TGA TAA
465

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr STP STP

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИД. № 3:

- (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
 - (A) ДЛИНА: 30
 - (B) ТИП: нуклеотидная
 - (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
 - (F) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (iv) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеотид
- (A) ОПИСАНИЕ: 5' ПЦР-праймер, IL-2
- (iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: нет
- (ix) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет
- (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. ИД. № 3:

ССТСААСТСС TGAATTСATG TACAGGATGC
30

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИД. № 4:

- (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
 - (A) ДЛИНА: 31
 - (B) ТИП: нуклеотидная
 - (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
 - (G) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеотид
- (A) ОПИСАНИЕ: 3' ПЦР-праймер, IL-2
- (iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: нет
- (iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет
- (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. ИД. № 4:

GGAAGCGGAT CСТТАТСААG TCAGTGTТGA G

3 1

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИД. № 5:

- (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
 - (A) ДЛИНА: 36
 - (B) ТИП: нуклеотидная
 - (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
 - (H) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеотид
- (A) ОПИСАНИЕ: праймер для мутагенеза для вектора экспрессии PL-2
- (iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: нет
- (iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет
- (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. ИД. № 5:

GCACCTTGTCA CAAACACCAT GGCACCTACT TCAAGT

3 6

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИД. № 6:

- (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
 - (A) ДЛИНА: 28
 - (B) ТИП: нуклеотидная
 - (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
 - (I) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеотид
- (A) ОПИСАНИЕ: праймер для мутагенеза для мутаций D20X
- (iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: нет
- (iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет
- (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. ИД. № 6:

GGAGCATTТА CTGCTGNNNT TACAGATG

2 8

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИД. № 7:

- (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
 - (A) ДЛИНА: 30
 - (B) ТИП: нуклеотидная
 - (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
 - (J) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеотид

- (A) ОПИСАНИЕ: праймер для мутагенеза для мутаций N88X
 (iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: нет
 (iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет
 (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. ИД. № 7:

GGGACTTAAT CAGCNNNATC AACGTAATAG

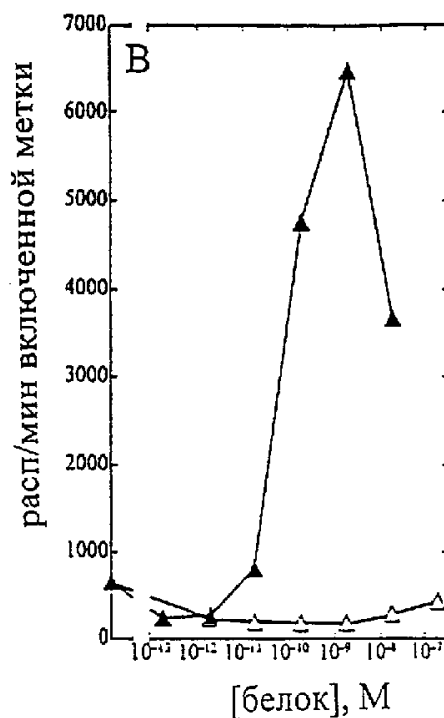
30

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИД. № 8:

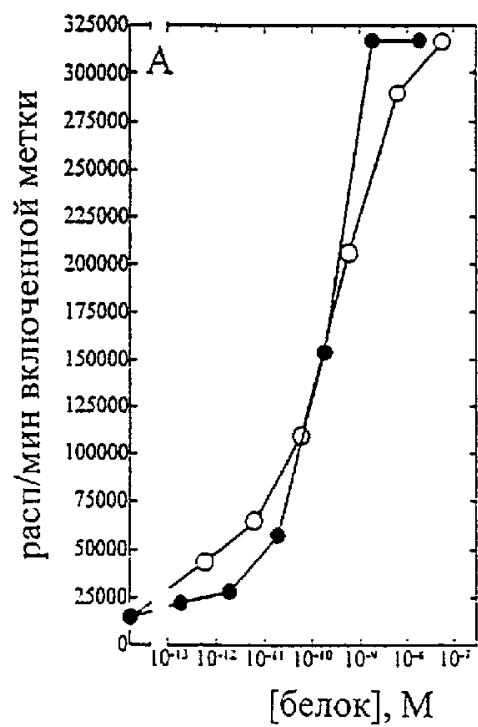
- (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
 (A) ДЛИНА: 28
 (B) ТИП: нуклеотидная
 (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
 (K) ТОПОЛОГИЯ: линейная
 (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеотид
 (A) ОПИСАНИЕ: праймер для мутагенеза для мутаций Q126X
 (iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: нет
 (iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: нет
 (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. ИД. № 8:

GGATTACSTT TTGTNNNAGC ATCATCTC

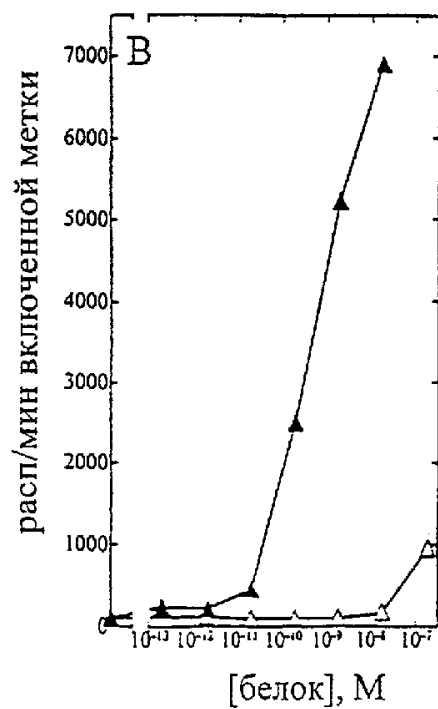
28



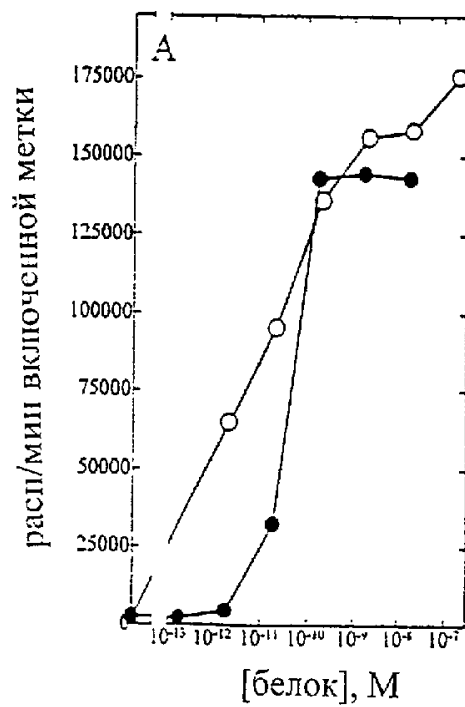
Фиг. 1В



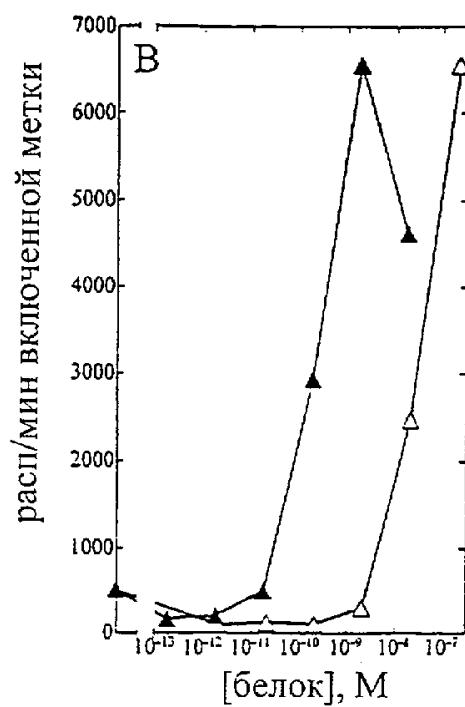
Фиг.2А



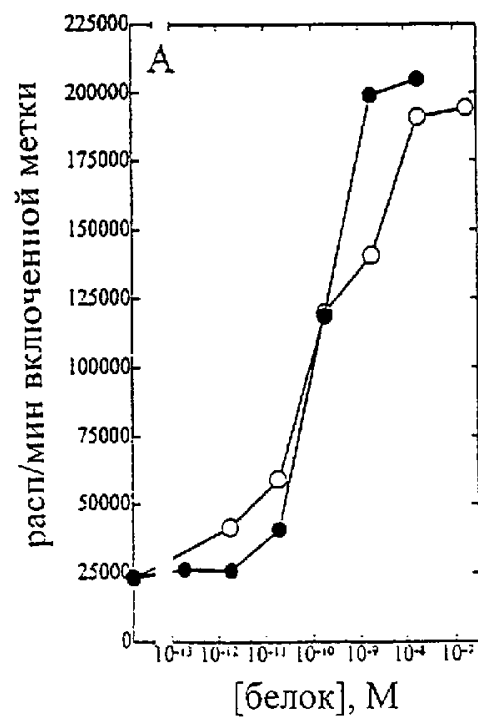
Фиг.2В



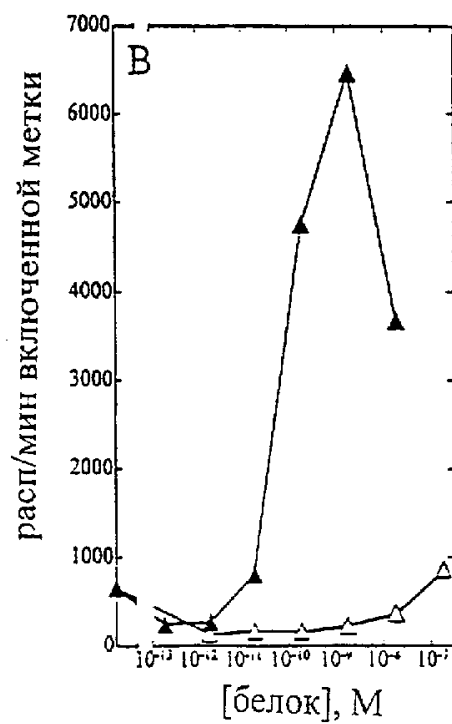
Фиг.3А



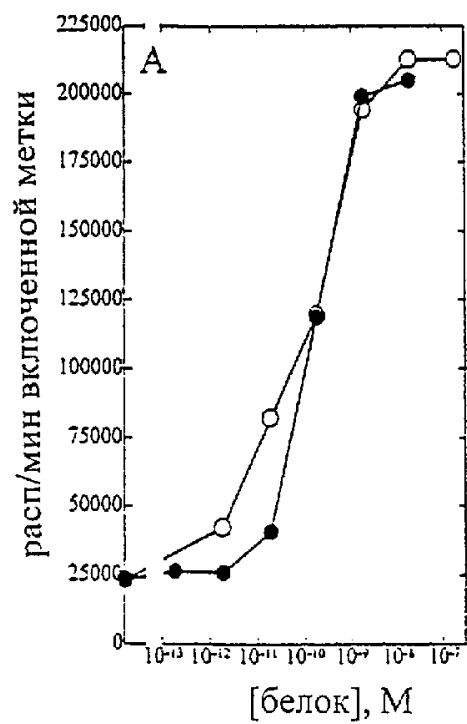
Фиг.3В



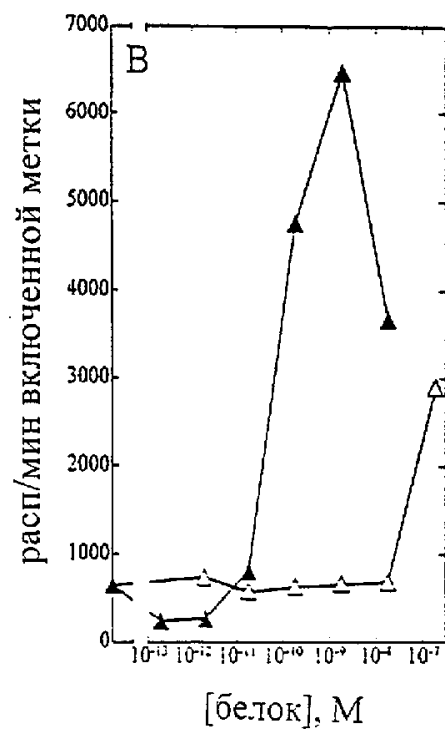
Фиг.4А



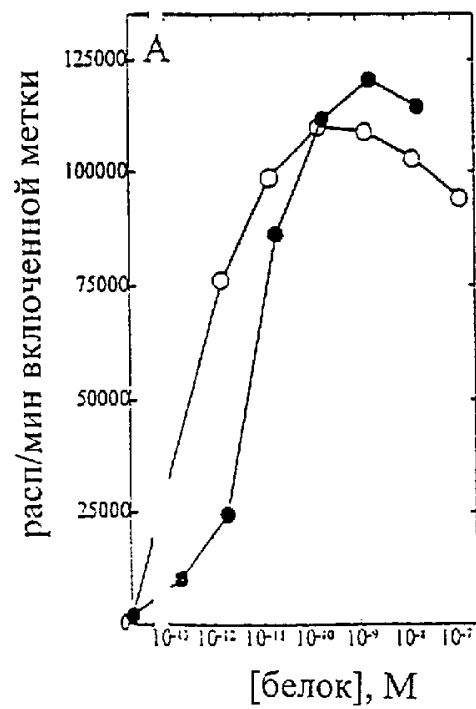
Фиг.4В



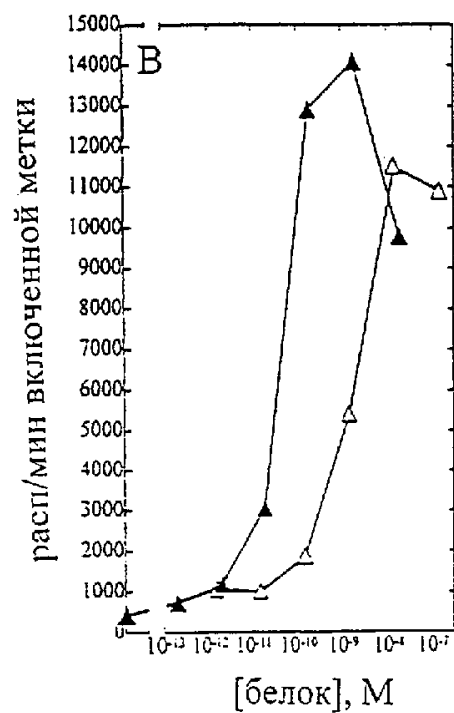
Фиг.5А



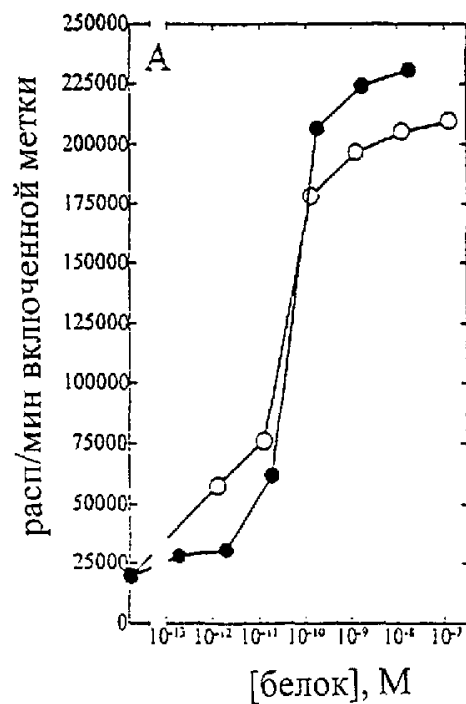
Фиг.5В



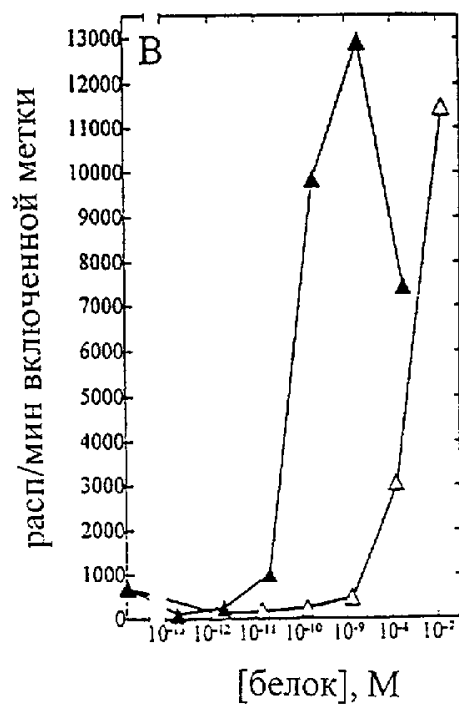
Фиг.6А



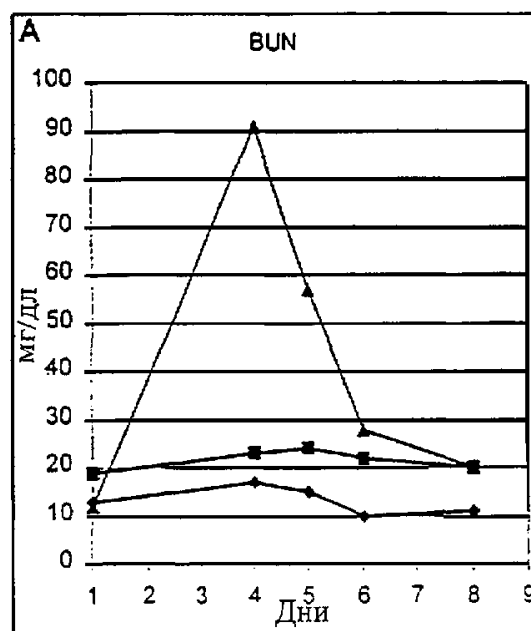
Фиг.6В



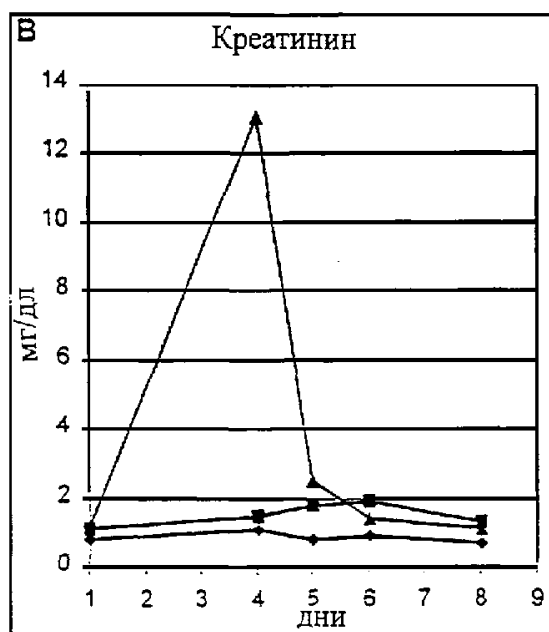
Фиг. 7А



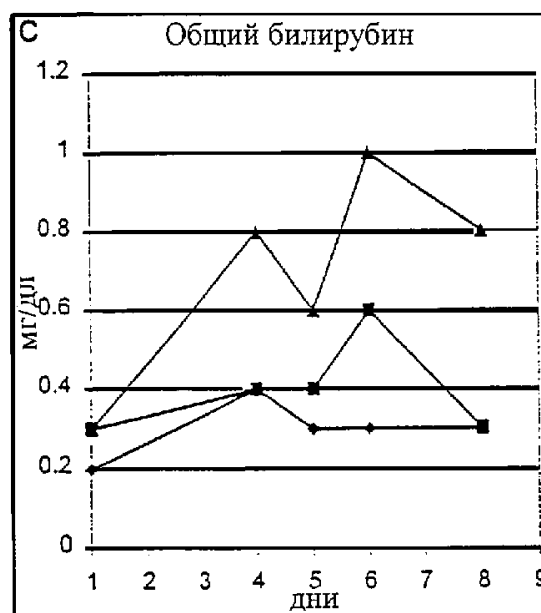
Фиг. 7В



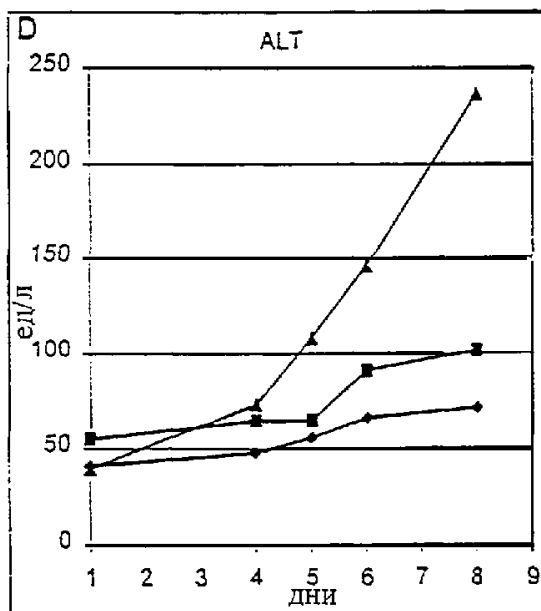
Фиг.8А



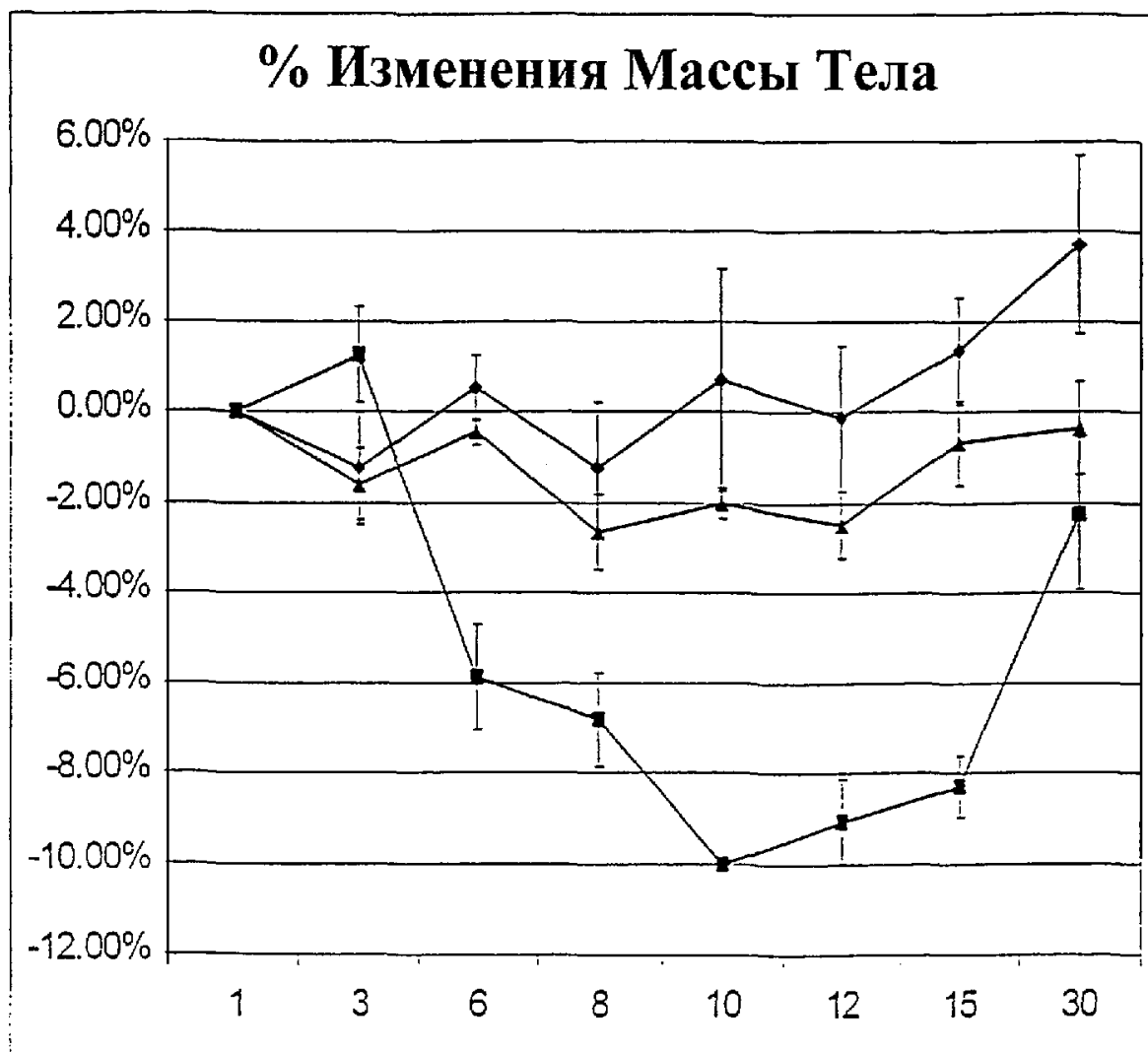
Фиг.8В



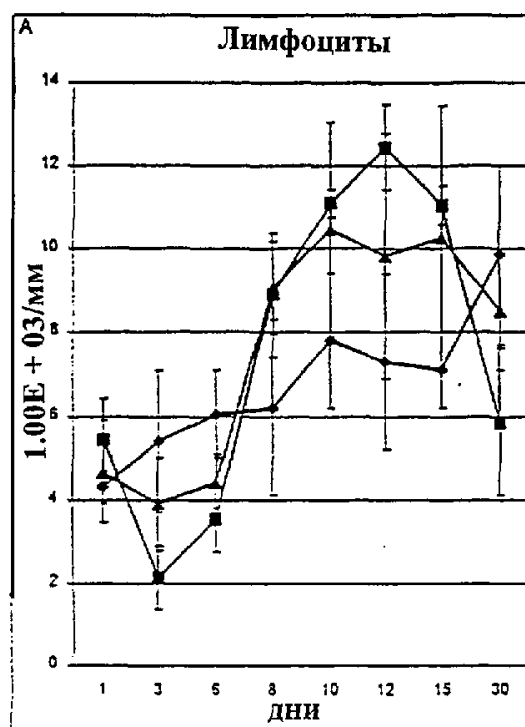
Фиг.8С



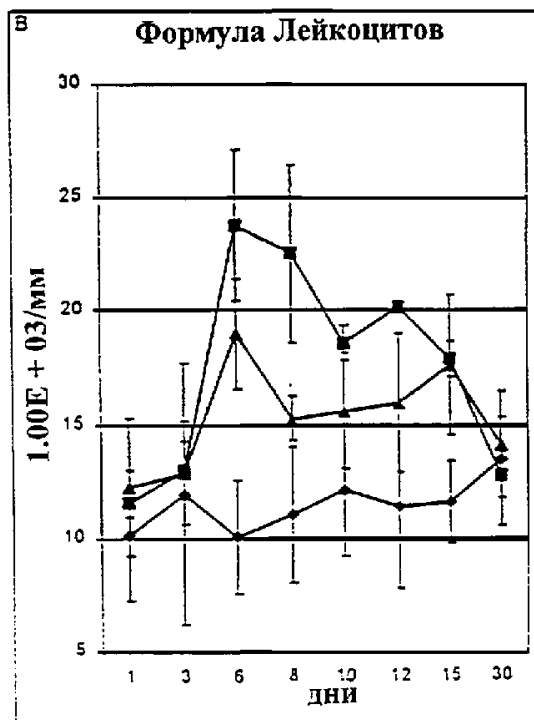
Фиг.8D



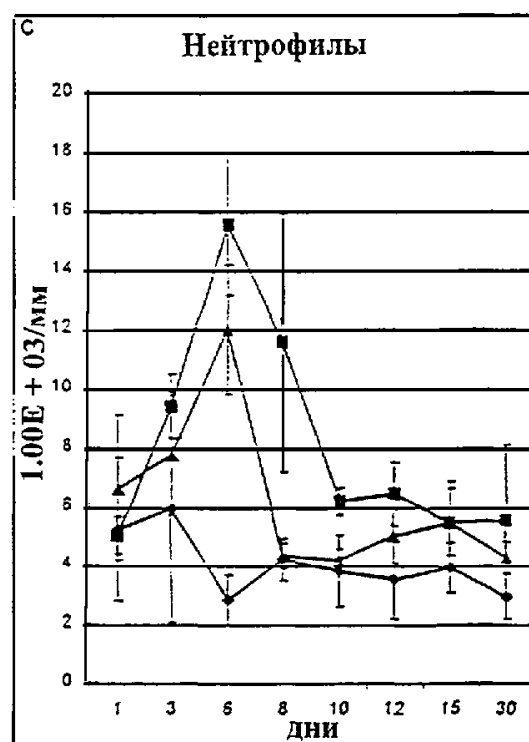
Фиг. 9



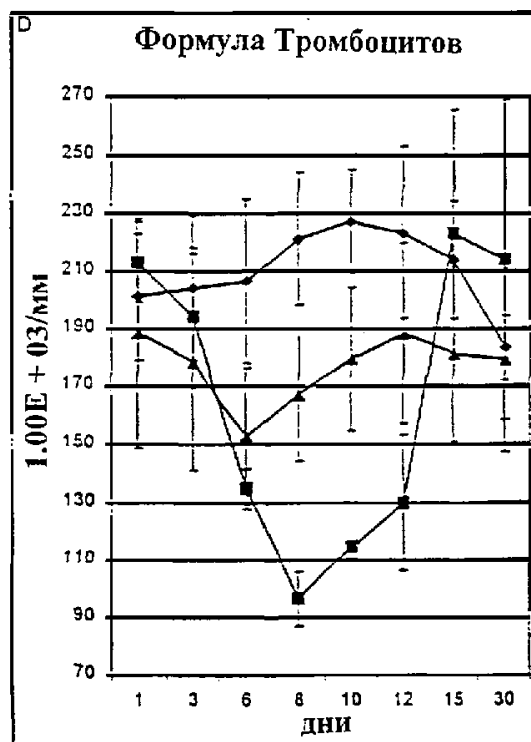
Фиг.10А



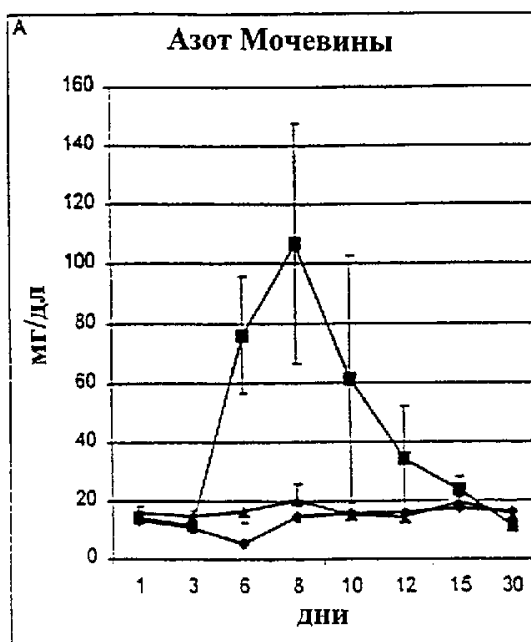
Фиг.10В



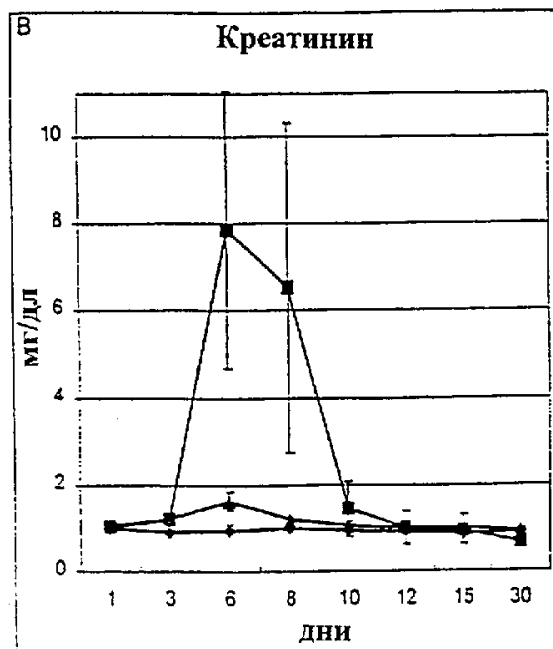
Фиг.10С



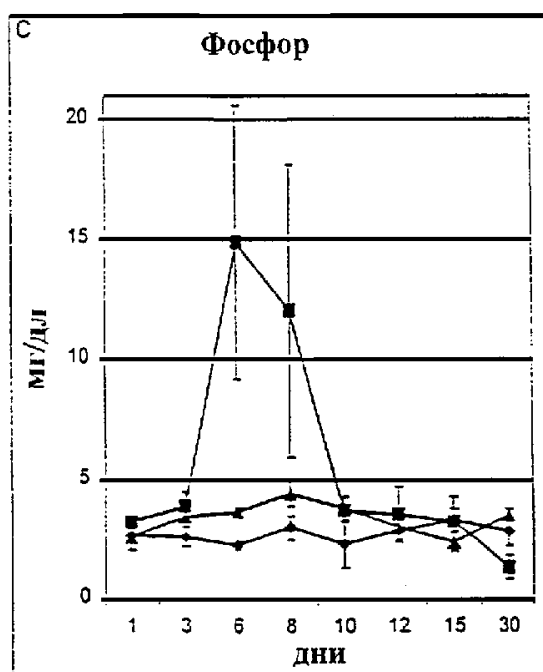
Фиг.10D



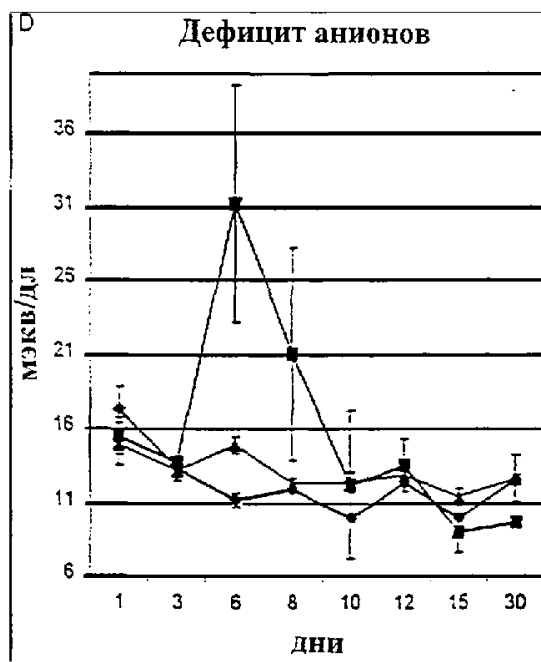
Фиг.11А



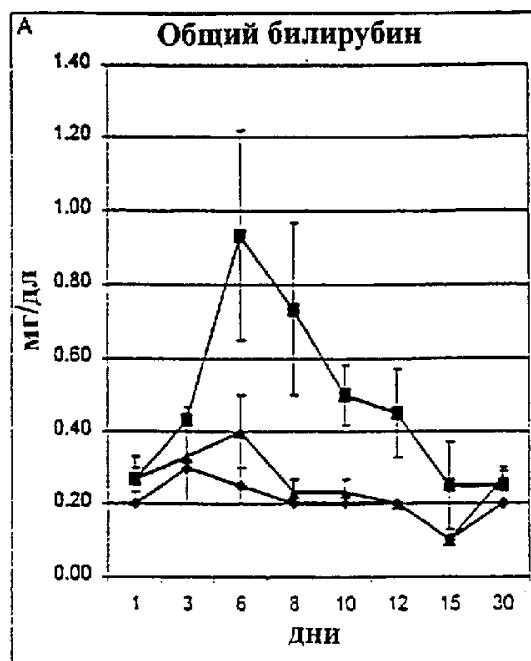
Фиг.11В



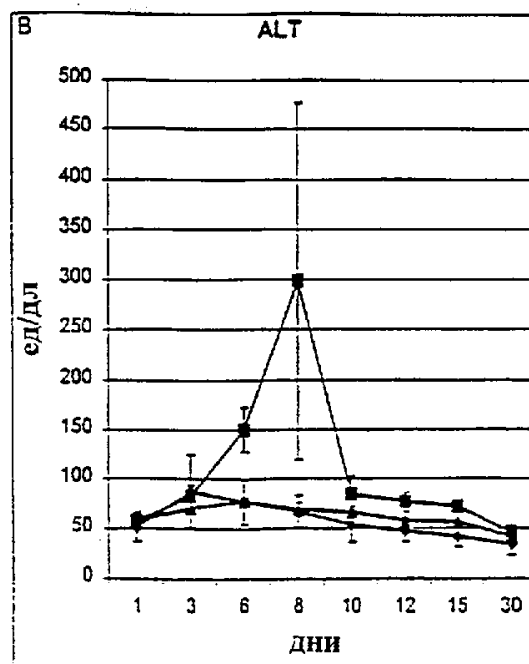
Фиг.11С



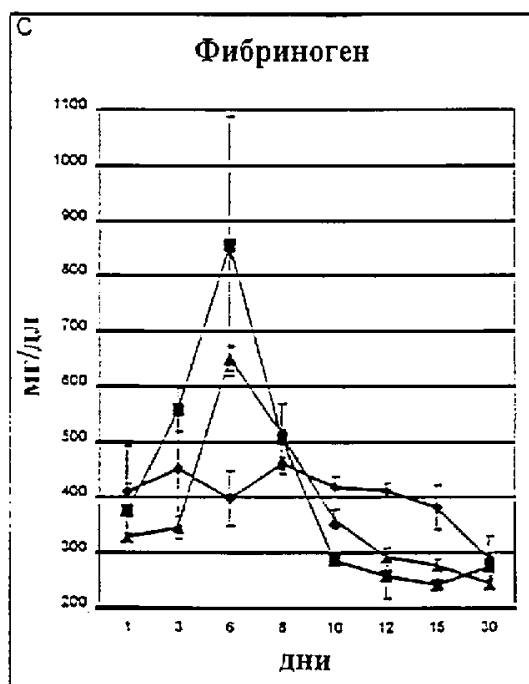
Фиг.11D



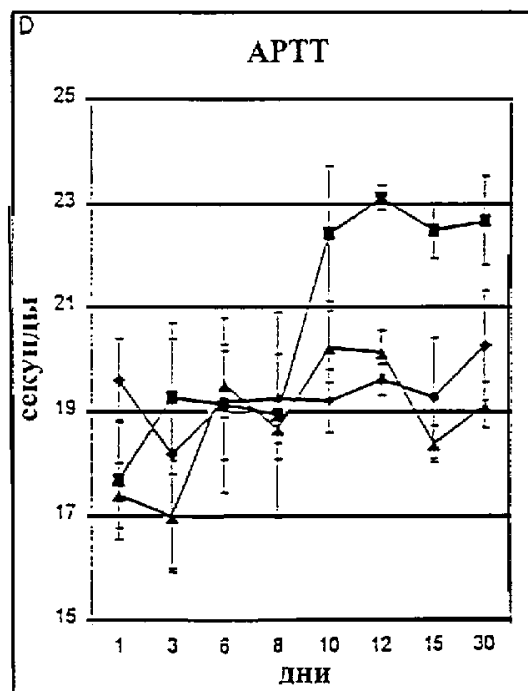
Фиг.12А



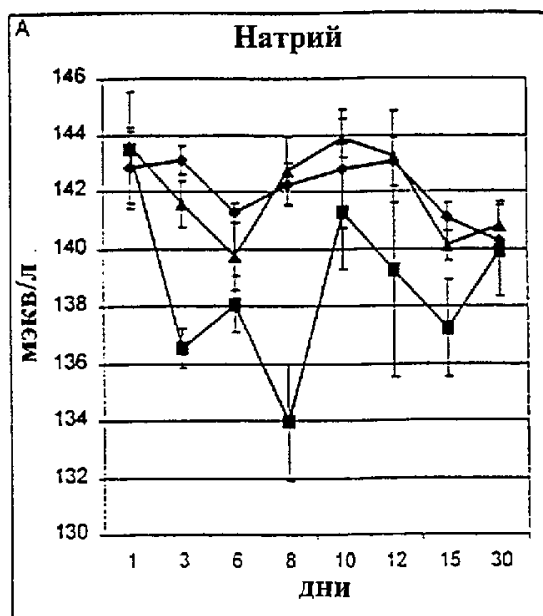
Фиг.12В



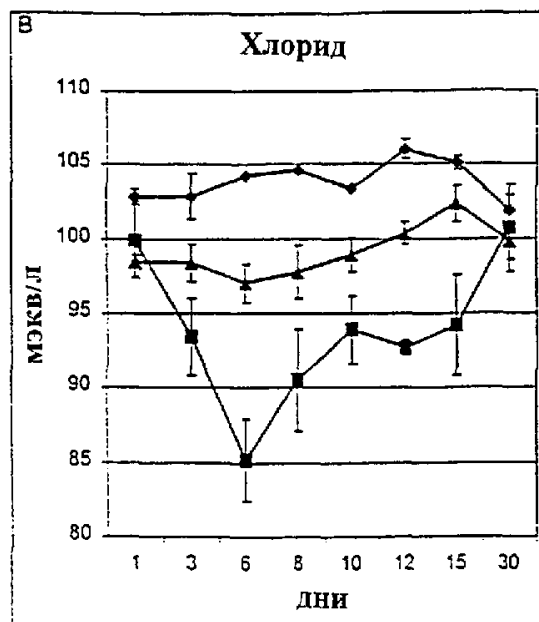
Фиг.12С



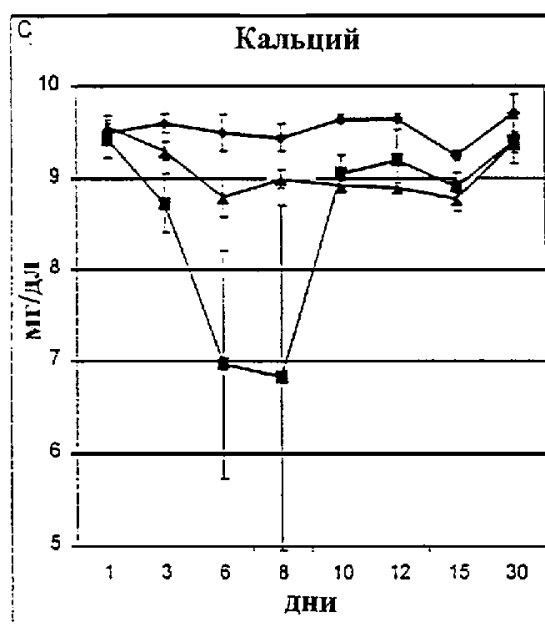
Фиг.12D



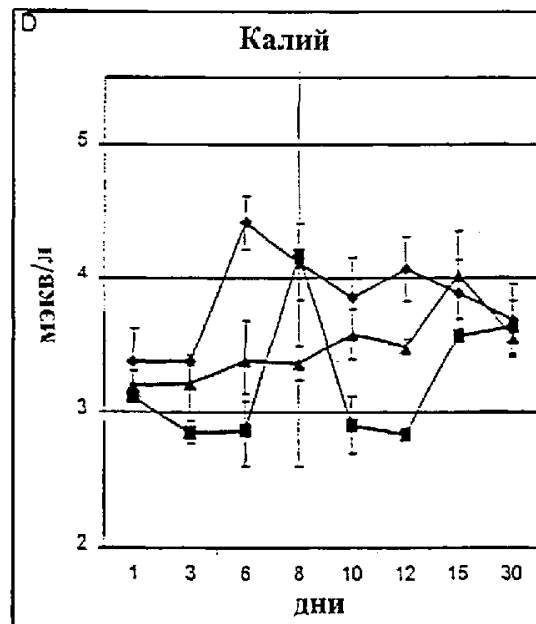
Фиг.13А



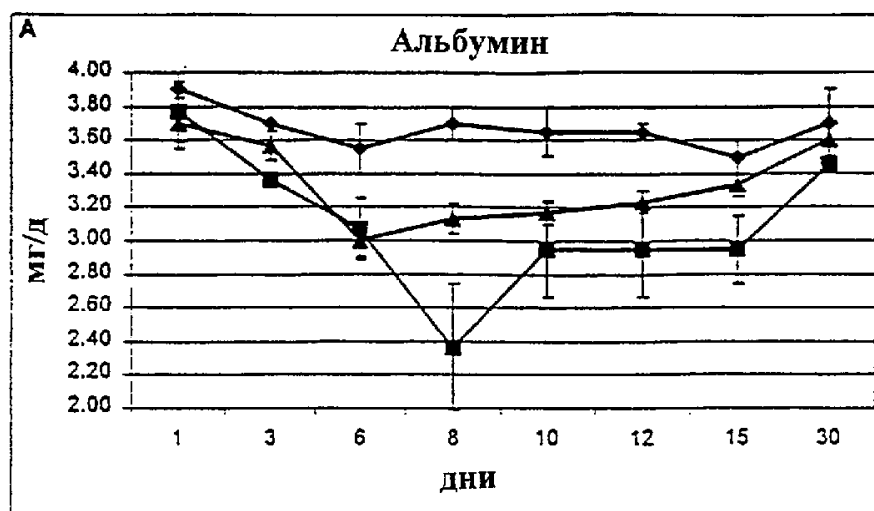
Фиг.13В



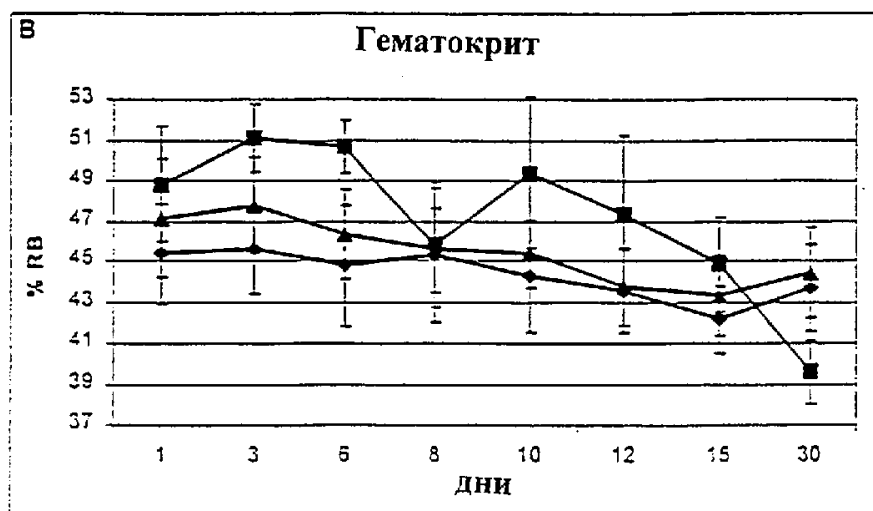
Фиг.13С



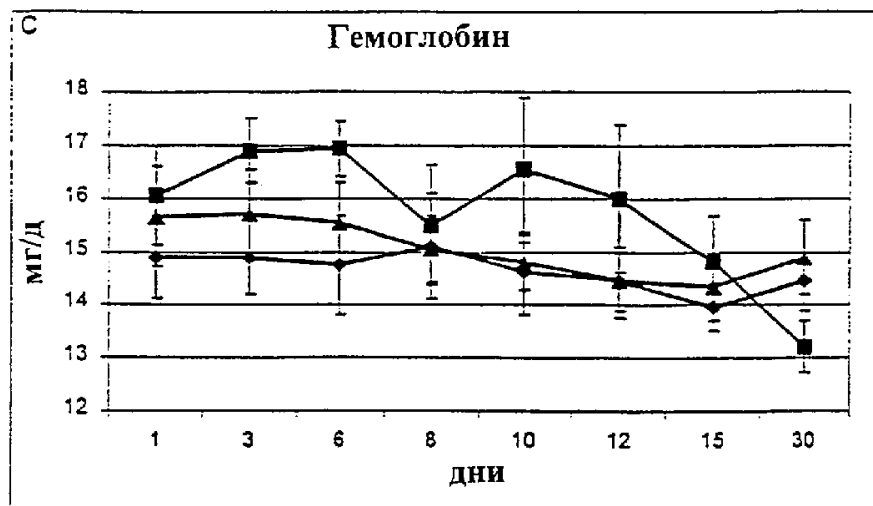
Фиг.13D



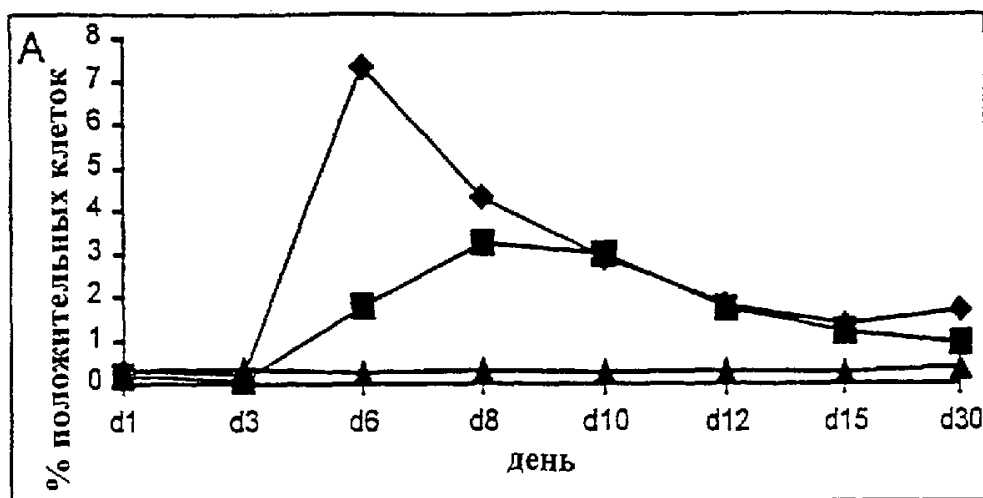
Фиг.14А



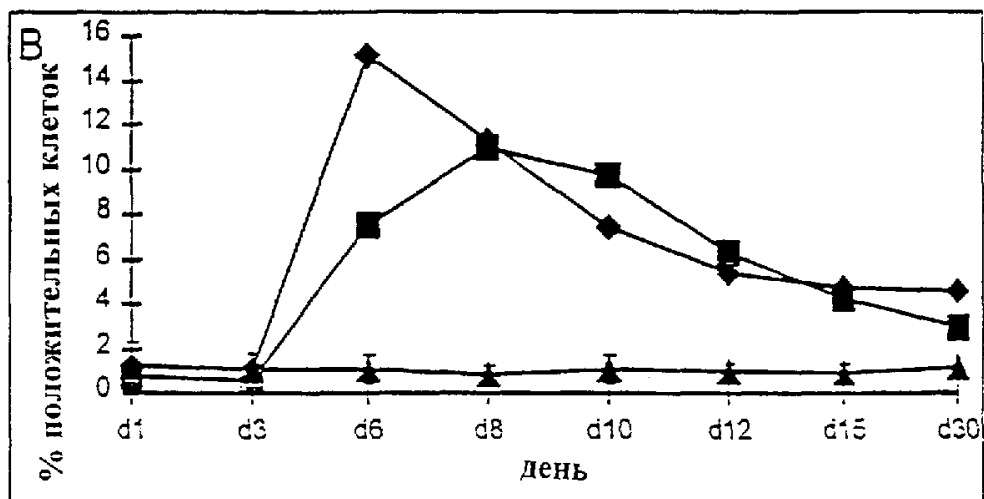
Фиг.14В



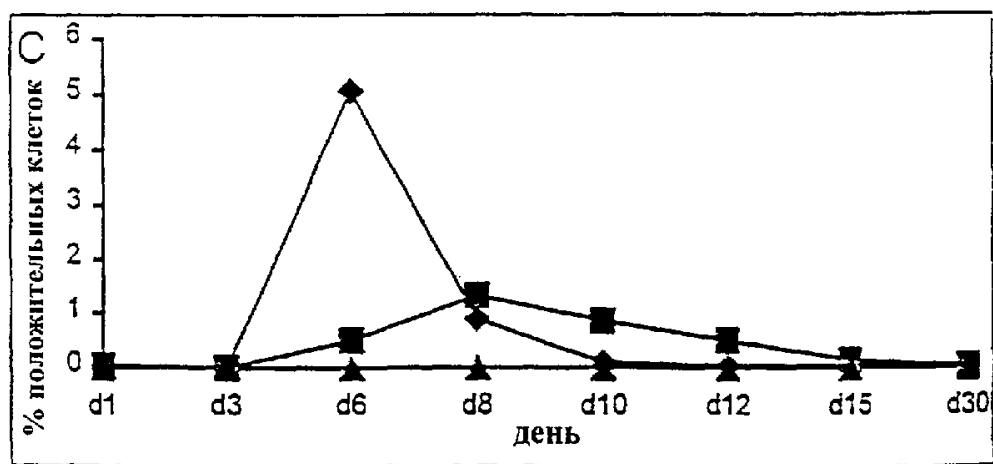
Фиг.14С



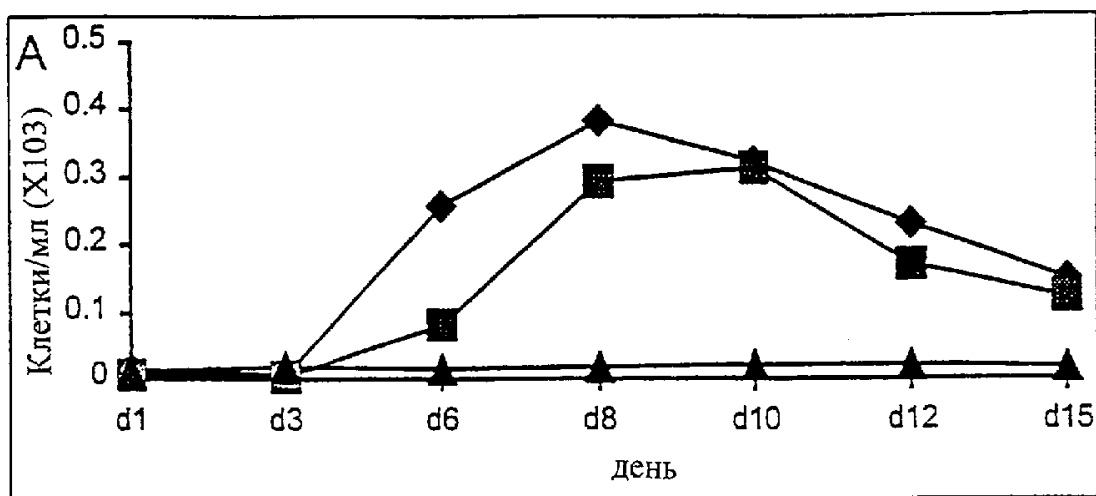
Фиг.15А



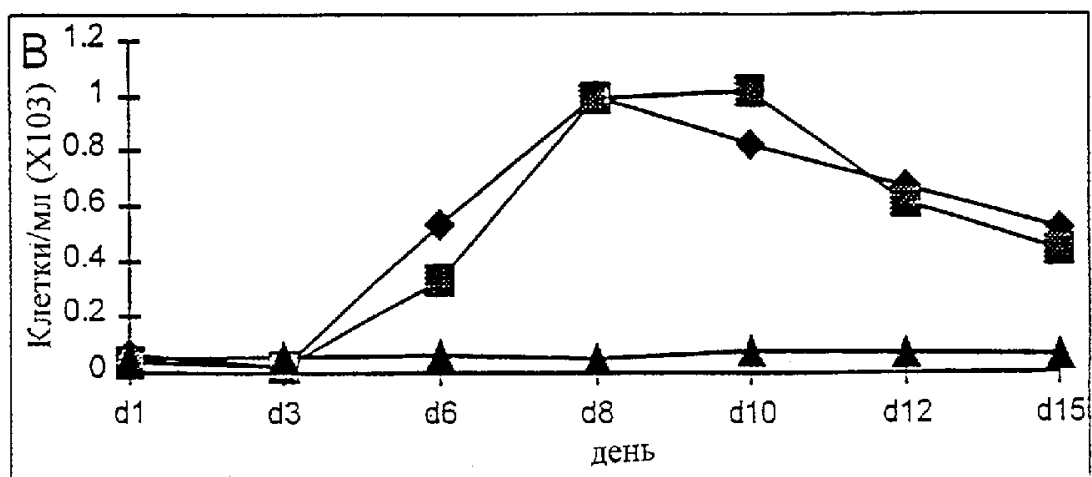
Фиг.15В



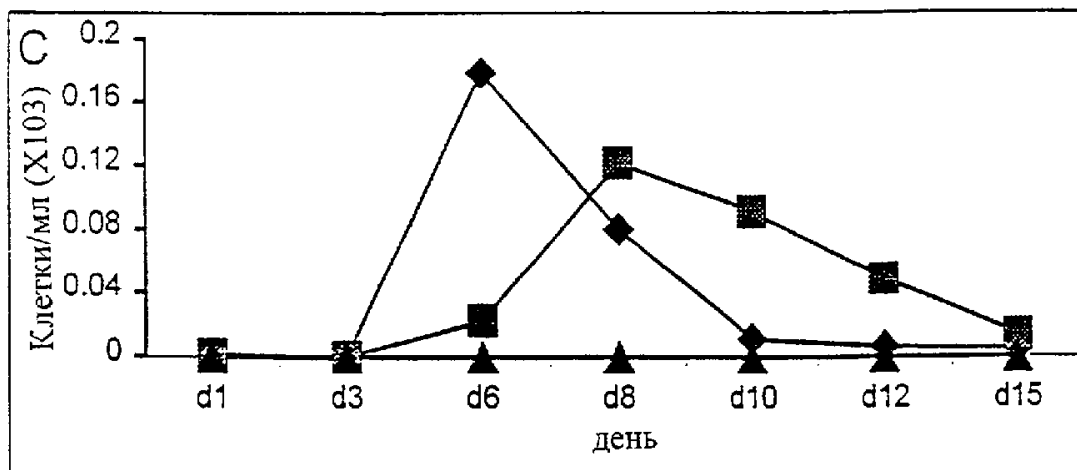
Фиг.15С



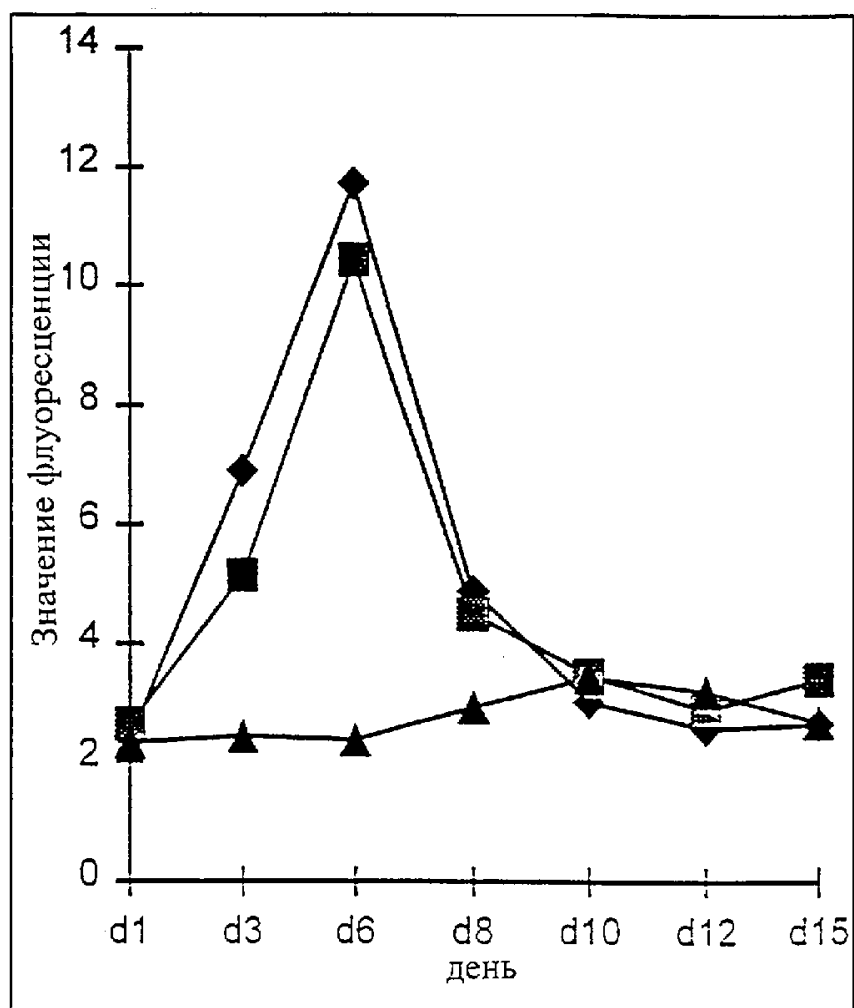
Фиг.16А



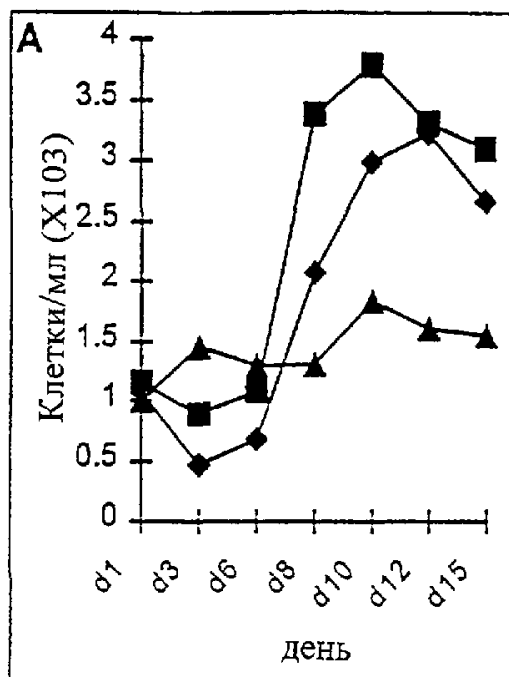
Фиг.16В



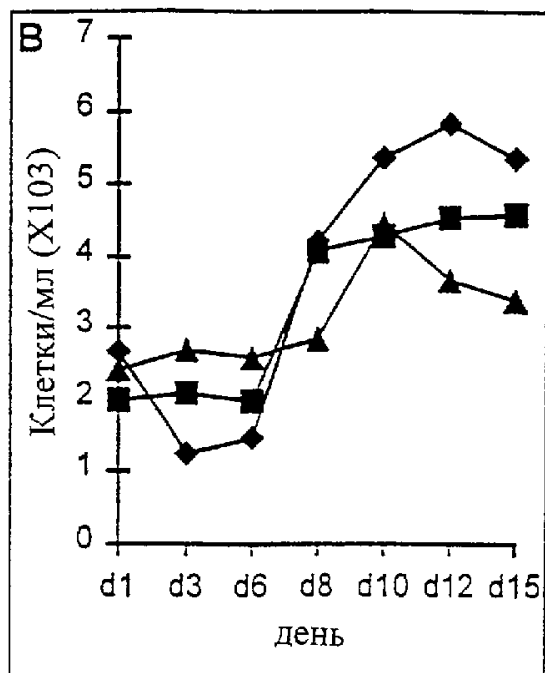
Фиг.16С



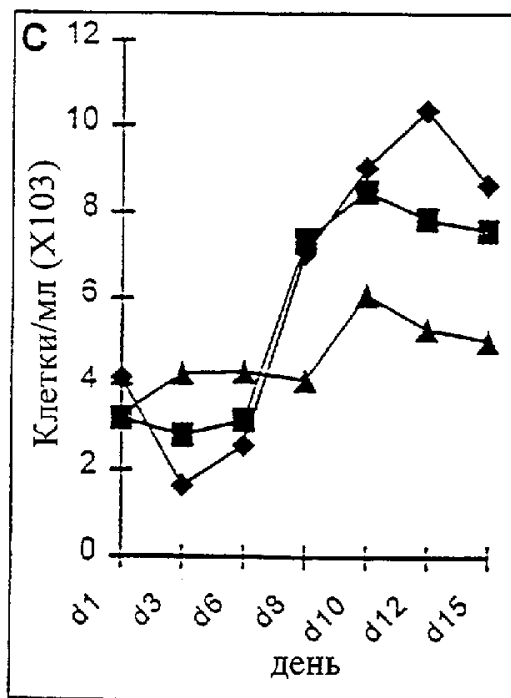
Фиг. 17



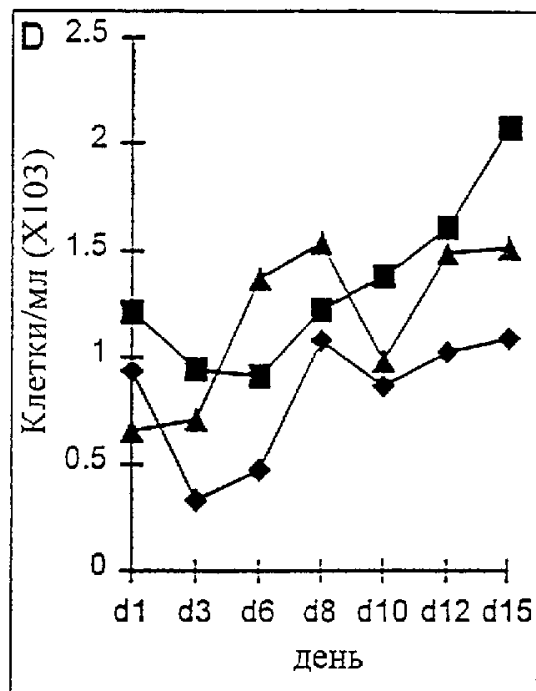
Фиг.18А



Фиг.18В

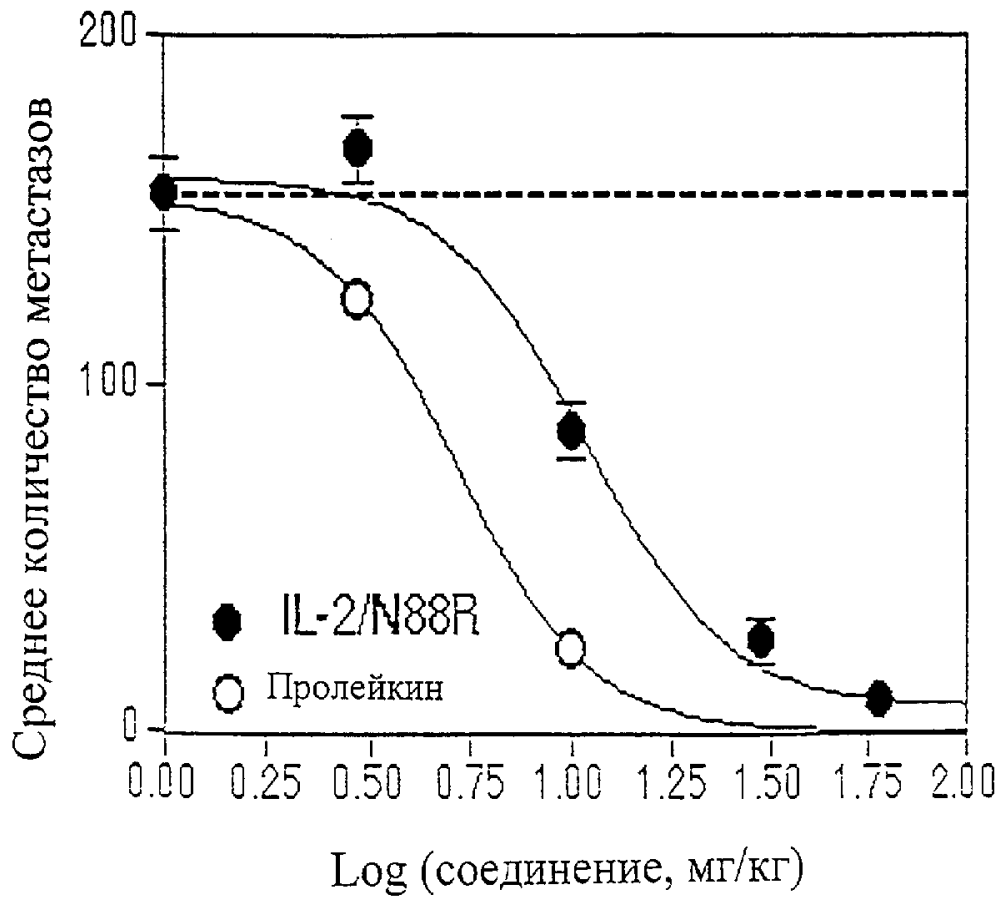


Фиг.18C

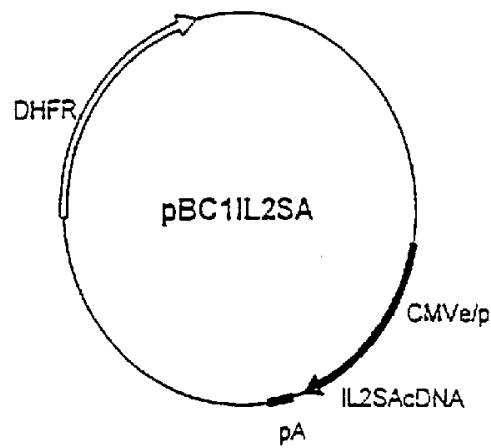


Фиг.18D

Модель опухоли мышцы СТ-26



Фиг. 19



Фиг. 20