

RO 122150 B1

1 Invenția se referă, în general, la domeniul ale farmacologiei și imunologiei. În mod mai
specific, invenția se referă la compoziții noi de substanțe pentru activarea selectivă a celu-
3 lilor T (blaști PHA) și care au activare redusă a celulelor Natural Killer ("NK"). Compozițiile
noi includ variante ale familiei de citokină și, în special, interleukina-2 umană ("IL-2").

5 Este cunoscut faptul că, interleukina-2 ("IL-2") este un stimulator imun puternic, care
activează diferite celule ale sistemului imun, incluzând celule T, celule B și monocite. IL-2
7 este, de asemenea, un factor de creștere critic și puternic al celulelor T. Grație acestor activi-
tăți, IL-2 a fost testată pentru abilitatea sa de a trata cancerul. IL-2 umană este un medi-
9 cament aprobat de FDA pentru tratamentul carcinomului renal metastatic și al melanomului
metastatic. Utilizarea de IL-2 în pacienți aleși este restrânsă, datorită toxicității severe
11 asociată terapiei cu IL-2; se estimează că în cel mai bun caz, numai 20% din pacienții aleși
urmează, în mod real, terapia. Toxicitățile asociate terapiei cu IL-2 includ febră severă,
13 greață, vomă, exsudare vasculară și hipotensiune serioasă. În ciuda acestor toxicități, totuși,
IL-2 este eficientă pentru indicațiile sale aprobate (rata de răspuns obiectiv ~17%).

15 Cu toate că analiza structură/funcție a IL-2 de șoarece a fost extensivă (S.M.
Zurawski și G. Zurawski (1989) *Embo J* 8: 2583-90; S. M. Zurawski și alții, (1990) *Embo J*
17 9: 3899-905; G. Zurawski (1991) *Trends Biotechnol.*, 9: 250-7; S. M. Zurawski și G. Zurawski
(1992) *Embo J* 11: 3905-10; Zurawski și alții, *Embo J* 12: 5113-5119 (1993)), a fost făcută
19 numai o analiză limitată a IL-2 umane. Cele mai multe studii cu muteine de IL-2 umană au
fost realizate pe celule de rozătoare; cu toate acestea, există studii limitate care folosesc
21 blaști PHA umani, care exprimă receptorul IL-2 de afinitate ridicată IL-2R $\alpha\beta\gamma$. Studiile care
folosesc blaști PHA au confirmat importanța reziduurilor Asp-20 și a helixului D ale IL-2
23 umane. S-a arătat că pozițiile Asp-20 și Gln-126 ale IL-2 umane sunt reziduurile primare res-
ponsabile de interacțiunea cu subunitățile β și respectiv γ ale receptorului de IL-2 (recenzat
25 în Theze și alții, *Immunol. Today*, 17, 481-486 (1996). Cu toate că s-a arătat că reziduurile
helixului C al IL-2 de șoarece sunt implicate în interacția cu IL-2R β de șoarece (Zurawski și
27 alții, *Embo.J* 12: 5113-5119 (1993)), reziduurile echivalente în IL-2 umană nu au arătat a
avea aceleași proprietăți (aceste reziduuri în IL-2 umană ar fi Asp-84 și Asn-88). Deoarece
29 este arătată o specificitate a speciilor semnificative între IL-2 umană și IL-2 de șoarece (IL-2
umană arată o activitate redusă de ~100 de ori în sistemele de rozătoare), este dificil de a
31 prezice dacă același tip de interacțiuni are loc în interiorul granițelor speciilor. Nu sunt cunos-
cute studii care folosesc celule care exprimă numai receptorul de afinitate intermediară uman
33 IL-2R $\beta\gamma$.

35 Unele muteine de IL-2 umană au fost examinate pentru activitatea lor la nivelul
blaștilor PHA umani (Xu și alții, *Eur. Cytokine Netw.*, 6, 237-244 (1995). S-a arătat că
37 muteinele care conțin substituții de Asp-20 cu leucină (D20L), precum și arginină, asparagină
și lizină, au defecte severe în abilitatea lor de a induce proliferarea de blaști PHA. Astfel,
această tehnică indică faptul că substituția lui Asp-20 va avea ca rezultat muteine cu activi-
39 tate compromisă. În plus, Xu și alții declară faptul că la acea dată (1995) nu au fost identifi-
cate muteine de IL-2 folositoare nici pentru aplicații clinice nici pentru aplicații de cercetare.

41 Muteina Q126D de IL-2 umană obținută de Buchli și Ciardelli, *Arch. Biochem.*
Biophys., 307(2): 411-415, (1993) a arătat activitate compromisă, în mod semnificativ, atât
43 în potentă, cât și în agonisiri; în testele de celule T umane, ea a arătat activitate mai mică de
~1.000 de ori decât IL-2 și s-a comportat ca un agonist parțial. În testele de celule T de roză-
45 toare, muteina a fost aproape inactivă. Ambele linii celulare testate au exprimat forma de
afinitate ridicată a receptorului de IL-2. Pe ambele tipuri de celule, Q126D a dat dovadă de
47 abilitatea de a antagoniza activitatea mediată de IL-2, cu toate că, numai în mod parțial, în
testul de celule T umane.

RO 122150 B1

- W. Zhi-yong și alții, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 25(5): 558-560 (Sept., 1993) 1
a realizat experimente de substituție pe 11-2 la pozițiile 62, 69, 99 și 126, demonstrând o 3
reducere de 20 de ori și de 30 de ori în activitate atunci când a comparat IL-2 tip sălbatic, cu 3
62-Leu-IL-2 și respectiv cu 126-Asp-IL-2, într-un test de celule T de șoarece (CTLL-2). Cu 5
toate acestea, nu există nici o indicație sau sugestie că substituțiile la poziția 126 pot conferi 5
activitate selectivă pentru celulele T față de celulele NK sau indică dacă astfel de schimbări 7
vor avea un efect similar asupra celulelor T umane. 7
- L. Collins și alții, *PNAS, USA* 85: 7709-7713, (1988), a raportat că substituția lui Asp 9
la poziția 20 fie cu Asn (D20N), fie cu Lys (D20K), a avut drept rezultat o pierdere a legării 9
de ~100 până la 1.000 de ori relativ la IL-2 umane atât pentru receptorul de afinitate ridicată 11
(IL-2R $\alpha\beta\gamma$, denumit "p55/p70" în Collins și alții), cât și pentru receptorul de afinitate interme- 11
diară (IL-2R $\beta\gamma$, denumit wp70" în Collins și alții). Legarea la IL-2R α a apărut neafectată 13
pentru ambele proteine mutante. Această lucrare indică faptul că dezlegarea de receptorul IL- 13
2 de afinitate intermediară (IL-2R $\alpha\gamma$) va conduce, de asemenea, la dezlegarea de receptorul 15
IL-2 de afinitate ridicată (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), sugerând că legarea sau activarea diferențiată între IL- 15
2R $\beta\gamma$ sau IL-2R $\alpha\beta\gamma$ nu este realizabilă prin substituția lui Asp la poziția 20.
- W. G. Berndt și alții, *Biochemistry* 33(21): 6571-6577 (1994), a folosit mutageneza 17
cu casetă combinatorie, pentru a schimba, în mod simultan, pozițiile 17-21 în IL-2 nativă, 17
care sunt suspectate de a interacționa cu receptorul IL-2 de afinitate intermediară. Din 2610 19
de clone triate, numai 42 au fost active. Ei au găsit că pozițiile 20 și 21 au fost de importanță 19
primară pentru activitatea biologică. Nu există nici o sugestie sau indicație de substituții 21
individuale excepție pentru L21V. 21
- Brevetul **US 5229109** (Grimm și alții), fără dovezi, expune analogi de IL-2 cu toxicitate 23
scăzută, pentru utilizare în imunoterapie și tratamentul cancerului. Proprietățile celor doi 23
analogi de IL-2 cu substituții la pozițiile Arg 38 (cu alanină) și Phe42 (cu lizină) au fost anali- 25
zate și comparate cu acelea ale IL-2 native. Analogii au fost găsiți de a fi capabili să mențină 25
abilitatea lor de a se lega la receptorul IL-2 de afinitate intermediară, deși legându-se numai, 27
în mod minimal, la așa numitul receptor de "afinitate ridicată". La această dată, receptorul 27
de afinitate intermediară a fost gândit să conștie numai din p75 (IL-2R β) și receptorul de 29
afinitate ridicată a fost gândit să conștie numai din complexul de receptori p55 + p75 (IL- 29
2R $\alpha\beta$). Analogii au menținut, de asemenea, abilitatea lor de a stimula celulele mononucleare 31
din sânge periferic, pentru a genera omorârea activată prin limfokină (LAK). De notat, 33
secreția de IL-1 β și TNF α a fost semnificativ redusă, în răspuns la analogii respectivi, când 33
s-a comparat cu molecula IL-2 nativă. Reziduurile de aminoacid, descrise în acest brevet, 35
sunt acelea care vor interacționa, în mod specific, cu IL-2R α (p55); eliminarea interacțiunilor 35
cu IL-2R α va avea drept rezultat activitatea redusă asupra celulelor cu receptor IL-2 de afini- 37
tate ridicată și nu va afecta activitatea la celulele cu receptor IL-2 de afinitate intermediară. 37
Astfel, generarea de celule LAK (care sunt gândite a fi derivate din celule NK) ar fi menținută. 39
Muteinele descrise aici se referă la pozițiile 20, 88 și 126 de reziduu de aminoacid; aceste 39
poziții sunt gândite a interacționa, în mod specific, cu IL-2R β (p75; pozițiile 20 și 88) și IL-2R γ 41
(necunoscut în momentul depunerii brevetului lui Grimm și alții; pozițiile 126). Ca o conse- 41
cință, interacțiunile cu IL-2R α rămân neschimbate. Mecanicist, muteinele descrise de Grimm 43
și alții vor avea interacțiuni scăzute cu receptorul IL-2 de afinitate ridicată, însă nu vor avea 43
nici un efect asupra receptorului IL-2 de afinitate intermediară; muteinele descrise aici au 45
caracteristica opusă, posedând un defect pronunțat în abilitatea lor de a interacționa cu 45
receptorul IL-2 de afinitate intermediară, IL-2R $\beta\gamma$ și arată un mic defect sau deloc în inter- 47
acțiunile funcționale cu receptorul IL-2 de afinitate ridicată, IL-2R $\alpha\beta\gamma$. 47

RO 122150 B1

1 Brevetul **US 5206344** (Goodson și alții) arată muteine de IL-2, în care unul dintre
aminoacizii secvenței native mature de IL-2 este înlocuit cu un reziduu de cisteină, care sunt
3 apoi preparate și conjugate prin reziduu de cisteină înlocuit cu un polimer selectat dintre
homopolimerii polietilenglicolului sau polioliilor polioxietați, în care homopolimerii sunt nesub-
5 stituiți sau substituiți la un capăt cu o grupare alchil. Aceste muteine sunt făcute *via* expresia
la gazdă a genelor mutante care codifică muteinele care au fost schimbate din genele pentru
7 proteinele precursorare prin mutagenază orientată la situs. În plus, altă specie de IL-2 poate
fi conjugată *via* reziduu de cisteină la poziția 125 a proteinei IL-2 mature, care nu este, în
9 mod necesar, pentru activitatea biologică a IL-2. Nu există nici o expunere de mutații care
conferă toxicitate redusă.

11 Brevetul **US 4359314** (Lin și alții) arată muteine de proteine active biologic, cum ar
fi IFN- β și IL-2, în care reziduurile de cisteină care nu sunt esențiale pentru activitatea bio-
13 logică au fost eliminate sau înlocuite cu alți aminoacizi, pentru a elimina pozițiile pentru reti-
culare intermoleculară sau formarea de punți de disulfură intramoleculare incorecte. Aceste
15 muteine sunt făcute *via* expresia bacteriană a genelor mutante care codifică muteinele care
au fost sintetizate din genele pentru proteinele precursorare prin mutagenază orientată la
17 oligonucleotide. Nu există nici o înștiințare de mutații care conferă toxicitate redusă.

19 Brevetul **US 5116943** (Halenbeck și alții) arată că o proteină terapeutică de referință,
biologic activă, este protejată împotriva oxidării printr-o metodă care implică substituirea unui
aminoacid conservativ pentru fiecare reziduu metionil susceptibil la oxidare cu peroxid sau
21 cloramină T, în care reziduurile metionil nesusceptibile, suplimentare nu sunt astfel substi-
tuite. Muteina rezistentă la oxidare astfel produsă este, de preferință, o muteină umană de
23 interleukină-2 sau interferon- β , și aminoacidul conservativ este cel mai preferabil alanină. Nu
există nici o înștiințare de mutații care conferă toxicitate redusă.

25 Brevetul **US 4853332** (Mark și alții) se referă la muteine IFN- γ și IL-2, în care
reziduurile de cisteină care nu sunt esențiale la activitatea biologică au fost eliminate sau
27 înlocuite, cu alți aminoacizi, pentru a elimina pozițiile pentru reticulare intermoleculară sau
formarea de punți de disulfură intramoleculare incorecte. Brevetul dezvăluie că o substituție
29 în IL-2 la cisteină 125 cu serină are drept rezultat o muteină cu activitate comparabilă cu IL-2
nativă.

31 Brevetul **US 5696234** (Zurawski și alții) se referă la muteine de citokine de mamifere
și la metode de triere pentru agoniști și antagoniști de citokine de mamifere. În special,
33 muteina dublă de IL-2 umană, P82A/Q12 6D, este demonstrat că are activitate de antagonist
la nivelul celulelor Baf3 de rozătoare cotransfectate cu subunități IL-2R α și β umane. Este
35 arătată activitate agonistă mică. De asemenea, se arată că muteinele IL-2 de rozătoare prezintă
activitate agonistă și antagonistă parțială la nivelul celulelor HT2, în special Q141D,
37 Q141K, Q141V și Q141L. Nu este descrisă nici o activitate de muteină care să arate sau să
sugereze un efect agonist selectiv pentru mutații la pozițiile 20, 88 și 126.

39 Zurawski și alții, descriu muteine IL-2 de rozătoare care au proprietăți de a fi active
la nivelul celulelor care exprimă IL-2R $\alpha\beta\gamma$, însă inactive la nivelul celulelor care exprimă IL-
41 2R $\beta\gamma$ (G. Zurawski, *Trends Biotechnol.*, 9: 250-257 (1991); S. M. Zurawski și G. Zurawski
Embo J 11: 3905-3910 (1992)). Muteinele IL-2 de rozătoare care prezintă aceste proprietăți
43 au avut substituții Asp-34 cu Ser sau Thr și Gln-141 cu Lys. Asp-34 și Gln-141 a IL-2 de
șoarece apar echivalente cu Asp-20 și respectiv Gln-141 a IL-2 umane. Cu toate că aceste
45 referințe se referă la muteine IL-2 "agoniști selectivi", aceste referințe nu descriu potențialul
lor de a fi mai puțin toxice, ci mai degrabă de a fi antagoniști potențiali ai IL-2 endogene.

RO 122150 B1

EP 0267795 A2 (Zurawski și alții) dezvăluie o varietate de muteine IL-2 de șoarece în tot cuprinsul secvenței, incluzând unele care conțin eliminări și/sau substituții în interiorul primei treimi a reziduurilor de aminoacid N-terminale care sunt competente biologic, însă acest brevet nu include, nu discută sau sugerează substituții de aminoacid dezvăluite aici la reziduuri IL-2 de șoarece echivalente. Există o necesitate pentru o moleculă IL-2 îmbunătățită care are toxicitate redusă și este, în general, mai tolerată. 1
3
5

Taniguchi și alții, brevetul **US 4738927** se referă la un ADN recombinant care conține un ADN recombinant care codifică o polipeptidă care posedă o activitate biologică de IL-2, în care numita activitate este stimularea creșterii unei linii celulare de limfocite T citotoxice și un ADN vector capabil de propagare într-o celulă procariotă sau eucariotă, secvența care codifică a numitei gene fiind localizată la o poziție în aval de o secvență de promotor, în care numita polipeptidă are 132 până la 134 aminoacizi în total în secvența de aminoacizi a polipeptidei. Brevetul descrie, de asemenea, o genă, vectori ADN recombinant, celule gazdă și metode pentru producerea, în mod recombinant, de IL-2 nativ. Taniguchi și alții nu descriu nici un variant sau muteine și nu indică care poziții în proteină sunt responsabile pentru activitatea de semnalizare sau de legare. 7
9
11
13
15

Este clar că muteinele IL-2 care nu prezintă toxicitatea care limitează doza muteinelor de IL-2 recombinantă din stadiul tehnicii sunt cerute pentru a folosi avantajul terapeutic al potențialului acestei citokine. 17
19

Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unei polipeptide care cuprinde o muteină de interleukină-2 (IL-2) umană, a unei celule procariote, a unui vector de exprimare și a unei metode pentru selectarea muteinelor de IL-2 care activează în mod preferențial celulele T în locul celulelor Natural Killer. 21
23

Polipeptida conform invenției cuprinde o muteină de interleukină-2 (IL-2) umană, numerotată în conformitate cu IL-2 de tip sălbatic, în care respectiva muteină IL-2 umană este substituită față de tipul sălbatic la cel puțin o poziție 20, 88 sau 126, în care o substituție la poziția 20 este selectată dintre izoleucină sau histidină și în care substituția la poziția 88 este selectată dintre arginină sau izoleucină sau glicină și în care o substituție la poziția 126 este leucină, în care respectiva muteină activează în mod preferat celulele T în locul celulelor Natural Killer. 25
27
29

Celula procariotă, conform invenției, cuprinde polinucleotida definită în revendicarea 2. 31

Vectorul de exprimare, conform invenției, cuprinde polinucleotida definită în revendicarea 2. 33

Metoda pentru selectarea muteinelor de IL-2, conform invenției, activează în mod preferențial celulele T în locul celulelor Natural Killer, prin evaluare în teste care utilizează IL-2R $\alpha\beta\gamma$ în comparație cu IL-2R $\beta\gamma$, în care activitatea unei muteine de IL-2 este crescută față de IL-2 de tip sălbatic într-un test preferențial față de celălalt, metoda cuprinzând următoarele etape: 35
37
39

- procurarea unui tip de celule care poartă IL-2 $\alpha\beta\gamma$ și a unui tip de celule care poartă IL-2R $\beta\gamma$, 41

- contactarea tipului de celule menționat care poartă IL-2R $\alpha\beta\gamma$ cu o muteină IL-2 și măsurarea activității muteinei IL2 menționate comparativ cu cea a IL2 de tip sălbatic, într-un prim test, 43

- contactarea tipului de celule menționat care poartă IL-2R $\alpha\beta\gamma$ cu o muteină IL-2 menționată și măsurarea activității acestei muteine IL2 comparativ cu cea a IL2 de tip sălbatic, într-un al doilea test, 45
47

- compararea activității rezultate din primul test cu activitatea rezultată în al doilea test, și 49

- selectarea muteinei IL-2 menționate, dacă activitatea rezultată în primul test este mai mare ca activitatea rezultată într-un al doilea test. 51

RO 122150 B1

1 Prin aplicarea invenției, se obține avantajul folosirii potențialului terapeutic al familiei
de citokine.

3 Invenția se referă la o polipeptidă care conține o muteină IL-2 umană, numerotată în
acord cu IL 2 de tip sălbatic, în care numita IL-2 umană este substituită la cel puțin una dintre
5 pozițiile 20, 88 sau 126, prin care numita muteină activează, în mod preferențial, celulele T
față de celulele NK. Această invenție realizează o muteină IL-2, mai puțin utilizarea terapeu-
7 tică mai mare a acestei interleukine.

În plus, invenția se referă la muteine IL-2 care au mutații singulare la pozițiile Aspartat
9 20, Asparagină 88 și Glutamină 126. Muteinele specifice sunt reprezentate prin denumirile
D20X, H86X și Q126X, unde "X" este un aminoacid specific, care atunci când este substituit
11 în IL-2 umană, conferă activitate selectivă pentru celulele care exprimă receptorul IL-2R $\alpha\beta\gamma$
(de exemplu, celule T, față de celulele care exprimă receptorul IL-2R $\beta\gamma$ (de exemplu, celule
13 NK). Muteine care prezintă selectivitate mai mare decât 1000 de ori includ D20H, D20I,
N88G, N88I, N88R și Q126L. În special, aceste muteine prezintă, de asemenea, în mod
15 esențial activitatea IL-2 tip sălbatic la nivelul celulelor T. Alte mutații au fost, de asemenea,
identificate că dau selectivitate de mai puțin decât 1000 de ori, însă mai mare decât 10 ori.
17 Invenția include, de asemenea, polinucleotide care codifică pentru muteinele invenției,
vectori care conțin polinucleotidele, celule gazdă transformate, compoziții farmaceutice care
19 conțin muteinele, metode terapeutice de tratament care utilizează muteinele.

Invenția se referă, de asemenea, la o metodă de selectare a muteinelor IL-2 prin eva-
21 luarea în teste care utilizează IL-2R $\alpha\beta\gamma$ în comparație cu IL-2R $\beta\gamma$, în care activitatea unei
muteine IL-2 este crescută relativ la IL-2 tip sălbatic (wt IL-2) într-un test, în mod preferențial
23 cu celălalt. IL-2R $\alpha\beta\gamma$ și IL-2R $\beta\gamma$ sunt ectodomenii de subunități de receptor individual în com-
binație corespunzătoare și sunt utilizate pentru a măsura direct legarea muteinelor IL-2 la
25 fiecare complex de receptor. Testul IL-2 $\alpha\beta\gamma$ utilizează un răspuns de la un tip de celulă cu
IL-2 $\alpha\beta\gamma$ și testul IL-2 $\beta\gamma$ utilizează un răspuns de la un tip de celulă cu IL-2 $\beta\gamma$. Celula cu IL-
27 2 $\alpha\beta\gamma$ este un blast PHA și celula cu IL-2 $\beta\gamma$ este o celulă NK. Testul este proliferarea atât
pentru tipul de celulă cu IL-2 $\alpha\beta\gamma$, cât și pentru tipul de celulă cu IL-2 $\beta\gamma$.

29 Invenția se referă, de asemenea, la un vector care conține polinucleotida care codi-
fică o muteină a acestei invenții, vectorul direcționând expresia unei muteine de IL-2 umane
care are activitate de activare a celulelor blaști PHA, însă care are activitate redusă de
31 activare a celulelor NK, vectorul fiind capabil să permită transfecția unui organism țintă și
subsecvent expresia *in vivo* a numitei muteine de IL-2 umane codificată de numita poli-
33 nucleotidă.

35 Invenția se referă, de asemenea, la o metodă de tratare a unui pacient afectat de o
boală tratabilă cu IL-2, prin administrarea unei cantități eficiente terapeutic dintr-o muteină
37 de IL-2 umană, numerotată în acord cu IL-2 tip sălbatic, care are activitate de activare a
blaștilor PHA, însă care are activitate redusă de activare a celulelor NK. Această metodă
39 este aplicabilă când boala tratabilă cu IL-2 este HIV, cancer, boală autoimună, boală infecți-
oasă, adjuvant de vaccin în vaccin pentru cancer și terapie vaccinală convențională, pentru
41 stimularea imună la bătrâni sau la cei imuno compromiși în alt fel, precum și la pacienții cu
SCID uman sau altă aplicație terapeutică care necesită stimularea sistemului imun.

43 Acțiunea IL-2 la nivelul celulelor T este mediată prin legarea la proteinele de receptor
IL-2. Proteinele distincte de suprafață ale celulelor T leagă IL-2. Prima identificată este o poli-
45 peptidă singulară, numită IL-2R α , care este o polipeptidă de 55 kD (p55) care apare la acti-
varea celulelor T și a fost inițial numită antigen Tac (pentru activare T). IL-2R α leagă IL-2 cu
47 o un Kd de aproximativ 10^{-8} M, și este, de asemenea, cunoscut ca receptorul IL-2 "de afini-
tate redusă". Legarea IL-2 la celulele care exprimă numai IL-2R α nu conduce la nici un
49 răspuns biologic detectabil.

RO 122150 B1

Al doilea receptor de IL-2 este un complex de legare compus din IL-2Rb și IL-2Rg; 1
IL-2Rg, o polipeptidă de 64 kD, este de asemenea cunoscut ca lanț γ comun (γ_c), deoarece 3
el este participant la un număr de receptori de citokină. IL-2Rb este de aproximativ 70 până 3
la 75 kD (numit în mod variat p70 sau p75) și este un membru al familiei de receptori de cito- 5
kine tip I, caracterizate prin motivul 2 cisteină/WSXWS. IL-2R β este exprimat, în mod coordonat, cu γ_c . Afinitatea de legare a IL-2 la IL-2R $\beta\gamma_c$ este mai mare decât cea la IL-2R α , cu 7
o K_d de aproximativ 10^{-9} M; el este, de asemenea, cunoscut ca receptorul IL-2 "de afinitate 9
intermediară". IL-2 cauzează creșterea celulelor care exprimă IL-2R $\beta\gamma_c$, cu stimularea de 9
creștere semimaximală care are loc la aceeași concentrație de IL-2 care produce legarea 11
semimaximală (cu alte cuvinte 1×10^{-9} M). IL-2R $\beta\gamma_c$ este același complex receptor de semna- 11
lizare care se poate lega la IL-15.

Al treilea complex receptor de IL-2 cunoscut este complexul IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$. Celulele care 13
exprimă atât IL-2R α , cât și IL-2R $\beta\gamma_c$ pot lega IL-2 mult mai ermetic, cu o K_d de aproximativ 13
 10^{-11} M, și astfel el este, de asemenea, cunoscut drept complexul "de afinitate ridicată". 15
Stimularea creșterii unor astfel de celule are loc la o concentrație de IL-2 similar scăzută. 15
Atât legarea de IL-2, cât și stimularea creșterii pot fi blocate prin anticorpi față de IL-2R α , IL- 17
2R β sau γ_c , și cel mai eficient printr-o combinație de anticorpi față de subunități de receptor 17
multiple. Aceste observații sugerează că IL-2R α formează un complex cu IL-2R $\beta\gamma_c$, crescând 19
afinitatea receptorului de semnalizare pentru IL-2, și prin aceasta permițând să fie eliberat 19
un semnal de creștere la concentrații de IL-2, în mod semnificativ inferioare. Se crede că 21
inițial IL-2 se leagă rapid la IL-2R α și aceasta facilitează asocierea cu IL-2R $\beta\gamma_c$. Celulele T 21
în repaus exprimă IL-2R $\beta\gamma_c$ însă numai cantități mici de IL-2R α ; creșterea de IL-2R α expri- 23
mat pe suprafață poate fi stimulată de IL-2. La activarea celulelor T mediată prin receptor 23
pentru antigen, IL-2Rcc este rapid exprimat, prin aceasta reducând concentrația de IL-2 25
necesară pentru stimularea creșterii. Legarea IL-2 la complexul IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ are drept rezultat 25
un semnal de transducție printr-o cale de semnalizare Jak/STAT.

Noi am descoperit muteine de IL-2 umană care, în mod preferențial, activează celule 27
T (blaști PHA; celule care exprimă receptorul IL-2 de afinitate ridicată IL-2R $\alpha\beta\gamma$) în raport cu 29
celule Natural Killer (NK) (celule care exprimă receptorul IL-2 de afinitate intermediară IL- 29
2R $\beta\gamma$). Muteinele care substituie Asp-20 cu Histidină (D20H) sau Izoleucină (D20I), Asn-88 31
cu Arginină (N88R), Glicină (N88G) sau Izoleucină (N88I) sau Gln-126 cu Leucină (Q126L), 31
sau Glutamat (Q126E) arată, în mod neașteptat, activitate de IL-2 totală la nivelul blaștilor 33
PHA și activitate (în caz că există mică) la nivelul celulelor NK. Studiile anterioare ale 33
muteinelor de IL-2 umană au fost bazate pe sisteme celulare de rozătoare, de analiză și 35
când au fost utilizate celule umane, nu au fost utilizate celule care exprimă numai IL-2R $\beta\gamma$ 35
(cum ar fi celule NK). În plus, acele studii care utilizează blaști PHA umani au arătat că sub- 37
stituția lui Asp-20 (cu Leu, Arg, Asp sau Lys; Xu și alții, *Eur. Cytokine Netw.*, 6: 237-244 37
(1995)) sau Gln-126 (cu Asp; Buchli și Ciardelli, *Arch. Biochem. Biophys.*, 307(2): 411-415 39
(1993)) are drept rezultat muteine de IL-2 umană care au activitate, în mod sever, compro- 39
misă. Studiile anterioare utilizând IL-2 de rozătoare au identificat muteine IL-2 de șoarece 41
cu activități care diferă (Zurawski și alții, *Embo J.*, 12: 5113-5119 (1993)), însă nici una dintre 41
mutațiile care au dat aceste rezultate nu au fost sugestive aceloră identificate în lucrarea 43
descrișă aici. Muteinele de IL-2 umană, care conțin mutații identice la poziții sinonime cu 43
muteinele IL-2 de rozătoare, nu prezintă activități similare și prin urmare sugerează că exem- 45
plele de rozătoare nu sunt predictive pentru funcționalitatea umană. Nu sunt cunoscute 45
inventatorilor studii despre muteine de IL-2 umană care compară activități relative la nivelul 47
celulelor umane care exprimă receptorul de IL-2, IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (de exemplu blaști PHA) față de 47
celule umane care exprimă receptorul IL-2R $\beta\gamma$ de IL-2, (de exemplu, celule NK). Este de 49
așteptat că analiza *in vivo* va confirma că muteinele descrise vor avea un indice terapeutic 49
îmbunătățit față de IL-2 umană de tip sălbatic, prin reducerea toxicității, astfel furnizând com- 51
puși folositori terapeutic pentru tratamentul bolilor care necesită stimularea sistemului imun. 51

RO 122150 B1

1 Interleukina 2 (IL-2) este, în mod curent, în utilizare clinică pentru tratamentul
cancerului renal metastatic. Cu toate acestea, toxicitatea sa severă a limitat utilizarea sa
3 numai la un subset de pacienți dintre cei mai sănătoși și toxicitatea sa care limitează doza
este presupusă a compromite eficiența sa globală. Toxicitatea acută a IL-2 s-a propus să
5 fie mediată prin activarea celulelor NK, în timp ce eficiența este mediată prin activarea
directă a celulelor T (Jacobson și alții, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (United States)*, Sep. 17
7 1996, 93(19), p. 10405-10; Smith KA, *Blood*, 1993, 81(6), p.1414-23/ Kaplan și alții,
Biotechnology, 10(2), p.157-62). Celulele T exprimă un receptor diferit pentru IL-2 decât o
9 fac celulele NK (celule T: IL-2R $\alpha\beta\gamma$, receptor IL-2 de afinitate ridicată; celule NK: IL-2R $\alpha\beta\gamma$
receptor IL-2 de afinitate intermediară). Muteinele de IL-2 umană descrise aici activează, în
11 mod selectiv, receptorul IL-2 al celulelor T și nu receptorul IL-2 al celulelor NK.

12 Terapie cu IL-2 cu doze mici a fost utilizată pentru a evita activarea, în mod direct,
13 a celulelor NK, cu ceva succes. (Jacobson și alții, (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:
10405-10). Această strategie încorporează conceptul că la doze mici de IL-2, va fi activat
15 numai receptorul IL-2 de afinitate ridicată, fără activarea receptorului IL-2 de afinitate inter-
mediară. Forma de afinitate intermediară a receptorului IL-2, IL-2R $\beta\gamma$, este exprimată la
17 nivelul celulelor NK, în timp ce celulele T exprimă forma de afinitate ridicată, IL-2R $\alpha\beta\gamma$.

18 Cu toate acestea, inventatorii au abordat problema toxicității dintr-un unghi diferit.
19 Întreruperea interacțiunilor lui IL-2 cu IL-2R β și/sau IL-2R γ prin modificarea corespunzătoare
a reziduurilor de legare specifice la nivelul suprafeței de legare a IL-2 a fost presupusă a
21 împiedica legarea eficace (și astfel activarea) la celulele care exprimă numai IL-2R $\beta\gamma$. Cu
toate acestea, la nivelul celulelor care exprimă IL-2R $\alpha\beta\gamma$, legarea inițială la IL-2R α și astfel
23 legarea la celulă încă va avea loc și astfel, terapia cu doză mică sugerată de Jacobs și alții
poate încă manifesta efecte secundare toxice. Grație legării la IL-2R α , recrutarea eficientă
25 a IL-2R β și IL-2R γ poate avea loc la nivelul suprafeței celulei în ciuda interacțiunilor defec-
tuoase ale IL-2 modificate cu IL-2R β și/sau IL-2R γ . Un complex IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ competent de
27 semnalizare poate fi astfel format. Un variant IL-2- capabil să activeze, în mod selectiv,
receptorii IL-2 de afinitate ridicată la nivelul celulelor T preferențial față de receptorii IL-2 de
29 afinitate intermediară la nivelul celulelor NK, noi credem că poate avea un indice terapeutic
crescut față de IL-2 de tip sălbatic, datorită unui profil de toxicitate redusă. Un variant IL-2
31 cu un indice terapeutic crescut va avea un domeniu de utilizare extins, în mod semnificativ,
atât în tratamentul cancerului (ca o terapie directă și/sau terapie auxiliară), cât și în imuno-
33 deficiență (de exemplu, HIV și tuberculoză). Alte utilizări potențiale ale IL-2 sunt derivate din
activitatea sa imunostimulatoare și includ pe lângă tratamentul direct al cancerului, imuno-
35 deficienței, cum ar fi HIV sau pacienți cu SCID uman; boli infecțioase, cum ar fi tuberculoza;
ca un adjuvant în strategiile de "vaccin pentru cancer"; și pentru indicațiile de stimulare a
37 sistemului imun, cum ar fi lărgirea protocoalelor de vaccinare standard sau pentru trata-
mentul bătrânilor.

38 Substituția corespunzătoare la Asp-20, Asn-88 sau Gln-126 a redus interacțiunile de
legare fie pentru IL-2R β (Asp-20 și Asn-88), fie pentru IL-2R γ (Gln-126). Efectul net al unor
41 astfel de substituții a avut drept rezultat muteine de IL-2 care păstrează activitatea la nivelul
celulelor T umane și au activitate redusă la nivelul celulelor NK umane.

42 Deoarece nu a fost posibil de a prezice rezultatul unei substituții date înaintea
43 evaluării în testele de celule T și NK, au fost făcute toate substituțiile posibile de aminoacizi
44 naturali (excepție Cys) la pozițiile Asp-20, Asn-88 și Gln-126 și a fost făcut un set limitat, dar
divers de muteine la poziția Asp-84, pentru a testa dacă ele interacționează într-adevăr cu
47 IL-2R β . Mutații suplimentare vor fi testate la poziția Asp-84, dacă sunt observate efecte
asupra interacțiunilor IL-2R β evidente. Datele pentru patruzeci și șase de substituții separate
49 la acele poziții sunt prezentate în tabelul 1, de mai jos.

RO 122150 B1

Mutațiile au fost introduse utilizând mutageneza orientată la situs pe ADNc de IL-2 umană tip sălbatic. Clonele corecte au fost subclonate la un vector de expresie adecvat pentru expresia într-un sistem heterolog (de exemplu, *E. coli*, baculovirus, drojdie sau celule de mamifer, cum ar fi, de exemplu, celule de ovar de hamster chinezesc (CHO)). Proteinele purificate au fost testate în testele de proliferare a celulelor T (blaști PHA) și de proliferare a celulelor NK. Răspunsurile diferite generate de muteine individuale în cadrul acestor teste, cu alte cuvinte CE_{50} , indică mutațiile care influențează aceste activități. În mod specific, muteinele care stimulează un răspuns relativ mai puternic în testul blast PHA (celulă T) (în comparație cu IL-2 tip sălbatic) comparativ cu răspunsul la testul pe celule NK (în comparație cu IL-2 tip sălbatic) vor sugera substituțiile care dau specificitate celulară bazată pe abilitatea muteinelor specifice de a se lega la și de a activa IL-2 $R\alpha\beta\gamma$ exprimat la nivelul acestor celule, însă incapabile de a se lega la și astfel de a activa celulele care exprimă numai IL-2 $R\beta\gamma$. Muteinele IL-2 care prezintă această proprietate vor poseda astfel *in vivo* proprietățile de imunostimulare ale IL-2 cu redusă toxicitate asociată terapiei IL-2, exsudare vasculară și hipotensiune.

Depozit al unei linii de celule CHO, utilizate pentru a produce proteina recombinantă descrisă aici, a fost făcut la ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, SUA pe 5 mai 1999. Deoarece tulpina la care se face referire este menținută în condițiile Tratatului de la Budapesta, ea va fi făcută accesibilă unui semnatar al oficiului de brevete la Tratatul de la Budapesta.

Așa cum este utilizată aici, "IL-2 tip sălbatic" înseamnă IL-2 fie nativă sau recombinantă, care are secvența de 133 aminoacizi care apar în mod normal, a IL-2 umane native (mai puțin peptidul semnal consistând într-un adaos de 20 aminoacizi la capătul N-terminal) a cărei secvență de aminoacizi este descrisă în Fujita și alții, *PNAS USA*, 80, 7437-7441, (1983), cu sau fără un N-terminal suplimentar de metionină care este, în mod necesar, inclus când proteina este exprimată ca o fracție intracelulară în *E. coli*.

Așa cum este utilizată aici, "muteină de IL-2" înseamnă o polipeptidă în care au fost făcute substituții specifice la proteina interleukină-2 matură umană. Tabelul 1 de mai jos prezintă patruzeci și șase de muteine IL-2, făcute prin substituții individuale și datele despre activitatea lor relativă corespunzătoare. Realizările preferate includ acele muteine care au cel puțin activitate relativă de 100 de ori. Realizările preferate în mod special includ ceea ce urmează, care arată activitate relativă mai mare decât 1000 de ori: reziduu (D) de aspartat (Asp) la poziția 20 ("D20"), numărată în acord cu IL-2 tip sălbatic, este substituit cu Izoleucină, ("D20I") sau Histidină ("D20H"); reziduu de asparagină (Asp) la poziția 88 (N88) a fost substituit cu izoleucină (N88I), glicină (N88G), sau arginină (N88R; și reziduu de glutamină (Gin) la poziția 126 (Q126) a fost substituit cu leucină (Q126L) sau glutamat (Q126E) sau aspartat (Q126D). Muteinele IL-2 preferate au o secvență de aminoacizi identică cu IL-2 tip sălbatic la celelalte reziduuri nesubstituite. Cu toate acestea, muteinele IL-2 ale prezentei invenții pot fi, de asemenea, caracterizate prin inserții, eliminări, substituții și modificări de aminoacizi la una sau mai multe poziții în sau la celelalte reziduuri ale lanțului polipeptidic de IL-2 nativă. În conformitate cu prezenta invenție, oricare dintre astfel de inserții, eliminări, substituții și modificări poate avea drept rezultat o muteină IL-2, care păstrează o activitate selectivă pe blast PHA, în timp ce are o abilitate redusă de a activa celule NK și intră în sfera acestui brevet.

Combinarea substituțiilor preferate sau preferate în mod special, descrise mai sus, într-o singură moleculă IL-2 recombinantă, poate avea drept rezultat mutanți de combinație care au activitate similară cu cea arătată aici de mutanții singulari. De exemplu, poate fi de așteptat ca o moleculă IL-2 care are o combinație de două sau mai multe mutații selectate din tabelul 1, poate avea drept rezultat un agonist IL-2 selectiv al celulelor T cu activitate relativă similară cu activitatea relativă a substituțiilor singulare arătate aici. Mutanții de combinație intră în spiritul și sfera prezentei invenții.

RO 122150 B1

1 Noi preferăm modificările și substituțiile conservative la celelalte poziții ale IL-2 (cu
alte cuvinte, acelea care au un efect minimal asupra structurii secundare sau terțiare a
3 muteinei). Astfel de substituții conservative includ pe cele descrise de Dayhoff în *The Atlas
of Protein Sequence and Structure, Atlasul de secvență și structură a propeinelor* 5 (1978)
5 și de Argos în *Embo J.*, 8: 779-785 (1989). De exemplu, aminoacizii aparținând unuia dintre
grupurile care urmează reprezintă modificări conservative:

7 - ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr;

- cys, ser, tyr, thr;

9 - val, ile, leu, met, ala, phe;

- lys, arg, his;

11 - phe, tyr, trp, his; și

- asp, glu.

13 Noi preferăm, de asemenea, modificările sau substituțiile care nu introduc poziții
pentru reticulare intermoleculară suplimentară sau pentru formare de legătură de disulfură
15 incorectă. De exemplu, IL-2 este cunoscută a avea trei reziduuri cys, la pozițiile tip sălbatic
58, 105 și 125 ale secvenței mature.

17 Prin "numărat în concordanță cu IL-2 tip sălbatic", noi înțelegem identificarea unui
aminoacid ales cu referire la poziția la care acel aminoacid apare în mod normal în secvența
19 matură a IL-2 tip sălbatic". Dacă inserțiile și eliminările sunt făcute la muteină IL-2, o per-
soană calificată în domeniu va aprecia că Asp care apare în mod normal la poziția 20 poate
21 fi deplasat în muteină. Cu toate acestea, localizarea pentru Asp deplasat poate fi prompt
determinată prin inspectarea și corelarea aminoacizilor adiacenți cu aceia care sunt adiacenți
23 pentru Asp în IL-2 tip sălbatic.

Termenul "tipuri de celulă care au receptorul IL-2R $\alpha\beta\gamma$ " înseamnă celulele cunoscute
25 a avea acest tip de receptor, cu alte cuvinte, celule T, celule T activate, celule B, monocite
activate și celule NK activate. Termenul "tipuri de celulă care au receptorul IL-2R $\beta\gamma$ "
27 înseamnă celulele cunoscute a avea acest tip de receptor, cu alte cuvinte, celule B, monocite
în repaus și celule NK în repaus.

29 Muteinele IL-2 ale prezentei invenții pot fi produse prin oricare dintre metodele adec-
vate cunoscute în domeniu. Astfel de metode includ construirea unei secvențe ADN care
31 codifică muteinele IL-2 ale acestei invenții și exprimarea acestor secvențe într-o gazdă trans-
formată în mod adecvat. Această metodă va produce muteine recombinante ale acestei
33 invenții. Cu toate acestea, muteinele acestei invenții pot fi, de asemenea, produse, chiar
dacă mai puțin preferabil, prin sinteză chimică sau o combinație a sintezei chimice și tehnolo-
35 giei de ADN recombinat. Metodele de producție în șarje sau metodele de producție tip per-
fuzie sunt, în general, în calificarea din stadiul tehnicii. Vezi R. I. Freshey (ed), "*Animal Cell
37 Culture: A Practical Approach*", "*Culturi de celule animale: Un mod practic de abordare*",
ediția a doua 1992, IRL Press, Oxford, England; J. P. Mather "Laboratory Scaleup of Cell
39 Cultures (0,5-50 liters)" "Scala de laborator a culturilor celulare (0,5-50 l)", *Methods Cell
Biology* 57: 219-527 (1998); W.S. Hu și J. G. Aunins "*Large-scale Mammalian Cell Culture*",
41 "Culturi celulare de mamifere la scară mare", *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8: 148-153 (1997); K.
B. Konstantinov, Y. Tsai, D. Moles, R. Matanguihan, "*Control of long-term perfusion Chinese
43 hamster ovary cell culture by glucose auxostat*", "Controlul culturii de celule de ovar de
hamster chinezesc cu perfuzie pe termen lung prin auxostat de glucoza", *Biotechnol. Prog.*,
45 12: 100-109 (1996).

Într-o realizare a unei metode recombinante pentru producerea unei muteine a
47 acestei invenții, o secvență de ADN este construită prin izolarea sau sintetizarea unei
secvențe ADN care codifică IL-2 tip sălbatic și apoi schimbarea codonului pentru Asp20 cu
49 un codon pentru izoleucină (I) prin mutageneză situs specifică. Această tehnică este

RO 122150 B1

binecunoscută. Vezi de exemplu, Mark și alții, "Site-specific Mutagenesis of the Human Fibroblast Interferon Gene", "Mutageneză situs specifică a genei pentru interferon fibroblastic uman", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 81, p.5662-66 (1984); și brevet **US 4588585**, date aici ca referințe. 1
3

Altă metodă de construire a unei secvențe ADN care codifică muteine IL-2 ale acestei invenții va fi sinteza chimică. Aceasta, de exemplu, include sinteza directă a unei peptide prin mijloace chimice, a secvenței de proteină care codifică pentru o muteină IL-2 care prezintă proprietățile descrise în invenție. Această metodă poate încorpora atât aminoacizi naturali, cât și nenaturali, la pozițiile care influențează interacțiunile IL-2 cu IL-2R β sau IL-2R γ . În mod alternativ, o genă care codifică muteina IL-2 dorită poate fi sintetizată prin mijloace chimice, utilizând un sintetizator de oligonucleotidă. Astfel de oligonucleotide sunt proiectate pe baza secvenței de aminoacizi a muteinei IL-2 dorite și, de preferință, selectând acei codoni care sunt favorizați în celula gazdă în care muteina recombinantă va fi produsă. În această privință, este bine recunoscută degenerarea codului genetic - adică un aminoacid poate fi codificat prin mai mult decât un codon. De exemplu, Phe (F) este codificat prin doi codoni, TTC sau TTT, Tyr (Y) este codificat prin TAC sau TAT și His (H) este codificat prin CAC sau CAT. Trp (W) este codificat printr-un singur codon TGG. În consecință, va fi apreciat că pentru o secvență ADN dată, care codifică o anumită muteină IL-2, vor exista multe secvențe degenerate de ADN care vor codifica acea muteină IL-2. De exemplu, va fi apreciat că în plus la secvența ADN preferată pentru muteina D20I arătată în SECV ID NR:1, vor exista multe secvențe ADN degenerate care codifică muteina IL-2 arătată. Aceste secvențe ADN degenerate sunt considerate în sfera acestei invenții. Prin urmare, "varianți degenerați ai acestora"- în contextul acestei invenții înseamnă toate secvențele ADN care codifică și prin aceasta permite expresia unei anumite muteine. 5
7
9
11
13
15
17
19
21
23

Secvența ADN care codifică muteina IL-2 a acestei invenții, fie că a fost preparată prin mutageneză orientată la situs, sinteză chimică sau alte metode, poate sau nu poate, de asemenea, să includă secvențe ADN care codifică o secvență semnal. Astfel de secvențe semnal, dacă este prezentă, trebuie să fie una recunoscută de către celula aleasă pentru expresia muteinei IL-2. Ea poate fi procariotă, eucariotă sau o combinație a celor două. Ea poate fi, de asemenea, secvența semnal a IL-2 native. Incluziunea unei secvențe semnal depinde dacă este de dorit de a secreta muteina IL-2 din celulele recombinante în care este făcută. Dacă celulele alese sunt procariote, în general, este de preferat ca secvența ADN să nu codifice o secvență semnal. Dacă celulele alese sunt eucariote, în general, este de preferat, ca o secvență semnal să fie codificată și cel mai preferabil ca să fie utilizată secvența semnal IL-2 tip sălbatic. 25
27
29
31
33
35

Metode standard pot fi aplicate pentru a sintetiza o genă care codifică o muteina IL-2 conform acestei invenții. De exemplu, secvența de aminoacizi completă poate fi utilizată pentru a construi o genă invers tradusă. Poate fi sintetizat un oligomer ADN care conține o secvență nucleotidică care codifică muteina IL-2. De exemplu, mai multe oligonucleotide mici care codifică porțiuni ale polipeptidei dorite pot fi sintetizate și apoi legate. Oligonucleotidele individuale, în mod tipic, conțin prelungiri 5' sau 3' pentru ansamblare complementară. 37
39
41

Odată asamblate (prin sinteză, mutageneză orientată la situs sau altă metodă), secvențele ADN care codifică o muteină IL-2 a acestei invenții vor fi inserate într-un vector de expresie și, în mod eficace, legate la o secvență de control al expresiei corespunzătoare pentru expresia muteinei IL-2 în gazda transformată dorită. Ansamblarea potrivită poate fi confirmată prin secvențializare nucleotidică, cartografiere de restricție și expresia unei polipeptide active biologic într-o gazdă adecvată. După cum este binecunoscut în domeniu, în scopul de a obține niveluri de expresie ridicate ale unei gene transfectate într-o gazdă, gena trebuie să fie, în mod eficace, legată la secvențele de control pentru expresia prin transcriere și traducere care sunt funcționale în gazda de expresie aleasă. 43
45
47
49

RO 122150 B1

1 Alegerea secvenței de control al expresiei și a vectorului de expresie va depinde de
alegerea gazdei. Poate fi folosită o varietate largă de combinații gazdă/vector de expresie.
3 Vectori de expresie folositori pentru gazde eucariote includ, de exemplu, vectori care conțin
secvențe de control al expresiei din SV40, virus papiloma bovin, adenovirus și citomegalo-
5 virus. Vectori de expresie folositori pentru gazde bacteriene includ plasmide bacteriene
cunoscute, cum ar fi plasmide din *E. coli*, incluzând col E1, pCR1, pER32z, pMB9 și derivații
7 lor, plasmide cu domeniu mai larg de gazdă, cum ar fi RP4, ADN-uri fagice, de exemplu,
derivații numeroși ai lambda fagului, de exemplu, NM989 și alți fagi ADN, cum ar fi M13 și
9 fagi cu ADN monocatenar filamentos. Vectori de expresie folositori pentru celule de drojdie
includ plasmida 2 μ și derivații acesteia. Vectori folositori pentru celule de insecte includ pVL
11 941. Noi preferăm pFastBac™ 1 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD). Cate și alții, "Isolation of
the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the
13 Human Gene in Animal Cells" "Izolarea genelor umane și bovine pentru substanța inhibitoare
mulleriană și expresia genei umane în celulele animale" *Cell*, 45, p. 685-98 (1986).

15 În plus, oricare dintr-o varietate largă de secvențe de control al expresiei poate fi folo-
sită în acești vectori. Astfel de secvențe de control al expresiei includ secvențe de control al
17 expresiei asociate cu gene structurale ale vectorilor de expresie precedenți. Exemple de sec-
vențe de control al expresiei folositoare includ, de exemplu, promotorii precoce și tardivi ai
19 SV40 sau adenovirusului, sistemul lac, sistemul trp, sistemul TAC sau TRC, regiunile majore
promotor și operator ale fagului lambda, de exemplu PL, regiunile de control ale proteinei de
21 inveliș fd, promotorul pentru 3-fosfo-gliceratkinază sau al altor enzime glicolitice, promotorii
acidfosfatazei, de exemplu, PhoA, promotorii sistemului de cuplare α din drojdie, promotorul
23 poliedru al Baculovirusului și alte secvențe cunoscute a controla expresia genelor celulelor
procariote sau eucariote sau virusurile lor și combinații diferite ale acestora.

25 Poate fi folosită oricare gazdă adecvată pentru a produce muteinele IL-2 ale acestei
invenții, incluzând bacterii, fungi (incluzând drojdii), celule de plante, insecte, mamifere sau
27 celule de alte animale corespunzătoare sau linii celulare, precum și animale sau plante trans-
genice. În mod mai special, aceste gazde pot include gazde eucariote și procariote bine-
29 cunoscute, cum ar fi tulpini de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, fungi, drojdie,
celule de insecte cum ar fi *Spodoptera frugiperda* (Sf9), celule de animale cum ar fi celule
31 de ovar de hamster chinezesc (CHO) și celule de șoarece cum ar fi NS/O, celule de maimuță
verde africană cum ar fi COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 și BNT 10 și celule umane, precum
33 și celule de plante în culturi tisulare. Pentru expresia celulei de animal, noi preferăm celule
CHO și celule COS 7 în culturi și în mod special, linia celulară CHO, CHO(DHFR-) sau linia
35 HKB.

37 Desigur, trebuie să fie înțeles că nu toți vectorii și secvențele de control al expresiei
vor funcționa, în mod egal, bine, pentru a exprima secvențele ADN descrise aici. Nici toate
39 gazdele nu vor funcționa, în mod egal, bine, cu aceleași sisteme de expresie. Cu toate
acestea, persoana calificată în domeniu poate face o selecție între acești vectori, secvențe
de control al expresiei și gazde, fără experimentare excesivă. De exemplu, în selectarea unui
41 vector, gazda trebuie considerată, deoarece vectorul trebuie să se replice în ea. Trebuie, de
asemenea, considerate numărul de copii ale vectorului, abilitatea de a controla acel număr
43 de copii și expresia oricărei alte proteine codificată de vector, cum ar fi markeri antibiotic. De
exemplu, vectorii preferați pentru utilizare în această invenție includ pe aceia care permit
45 ADN-ului care codifică muteinele IL-2 să fie amplificat într-un număr de copii. Acești vectori
capabili de amplificare sunt binecunoscuți în domeniu. Ei includ, de exemplu, vectorii capabili
47 de a fi amplificați prin amplificare DHFR (vezi, de exemplu, Kaufman, brevet **US 4470461**,

RO 122150 B1

Kaufman și Sharp, "Construction of A Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis of Signals Utilized for Efficient Expression", "Construcția unei gene ADNc modular pentru dihidrofolatreductază: Analiza semnalelor utilizate pentru expresie eficientă", <i>Mol. Cell. Biol.</i> , 2, p.1304-19 (1982)) sau amplificarea glutaminsintetază ("GS") (vezi, de exemplu, brevet US 5122464 și cererea de brevet european publicată 338841).	1 3 5
În selectarea unei secvențe de control al expresiei, o varietate de factori trebuie să fie, de asemenea, considerați. Aceștia includ, de exemplu, puterea relativă a secvenței, capacitatea ei de a fi controlată și compatibilitatea ei cu secvența ADN reală care codifică muteina IL-2 a acestei invenții, în mod special cu referire la structurile secundare potențiale. Gazdele trebuie să fie selectate prin considerarea compatibilității lor cu vectorul ales, toxicității produsului codificat de secvențele ADN ale acestei invenții, caracteristicilor lor de secreție, abilității lor de a plia, în mod corect, polipeptidele, fermentației lor sau cerințelor de cultură și ușurinței de purificare a produselor codificate de secvențele de ADN.	7 9 11 13
Între acești parametri, persoana calificată în domeniu poate selecta combinații diferite de vector/secvență de control al expresiei/gază care vor exprima secvențele dorite de ADN la fermentație sau în culturi animale pe scară largă, de exemplu, utilizând celule CHO sau celule COS 7.	15 17
Muteinele IL-2 obținute conform prezentei invenții pot fi glicozilate sau neglicozilate, depinzând de organismul gazdă utilizat pentru a produce muteina. Dacă sunt alese bacterii drept gazdă, atunci muteina IL-2 produsă va fi neglicozilată. Celulele eucariote, pe de altă parte, vor glicoliza muteinele IL-2, deși poate nu în același mod cum este glicolizată IL-2 nativă. Muteina IL-2 produsă de gazda transformată poate fi purificată conform cu oricare metodă adecvată. Diferite metode sunt cunoscute pentru purificarea IL-2. Vezi, de exemplu, <i>Current Protocols in Protein Science</i> , vol. 2, Editori: John E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploehg, David W. Speicher, Paul T. Wingfield, Unit. 6.5 (Drept de autor 1997, John Wiley & Sons Inc.). Noi preferăm replierea din corpi de incluziune generați în <i>E. coli</i> , sau din mediu condiționat fie din culturi de mamifere, fie din culturi de drojii care produc o muteină dată, folosind schimb cationic, filtrare pe gel și sau cromatografie lichidă cu fază inversă. Vezi exemplele 1 (<i>E. coli</i>) și 10 (perfuzie de celule CHO) de mai jos.	19 21 23 25 27 29
Activitatea biologică a muteinelor IL-2 conform acestei invenții poate fi testată prin oricare metodă adecvată cunoscută în domeniu. Astfel de teste includ proliferarea de blaști-PHA și proliferarea de celule NK. Muteinele de activitate corespunzătoare, cu alte cuvinte, total active pe IL-2R $\alpha\beta\gamma$, cu activitate redusă la nivelul celulelor care poartă IL-2R $\beta\gamma$, vor fi confirmate utilizând cele două teste. "Activitatea relativă" a unei muteine este măsurată cu referire la IL-2 tip sălbatic și așa cum este descris în continuare în exemple, este raportul dintre activitatea de proliferare a blaștilor-PHA și activitatea de proliferare a celulelor NK.	31 33 35
Muteina IL-2 conform acestei invenții va fi administrată la o doză aproximativ egală cu sau mai mare decât cea folosită în terapia cu IL-2 nativă tip sălbatic sau recombinantă. De preferință, este administrată o cantitate eficientă de muteină IL-2. O "cantitate eficientă" înseamnă o cantitate capabilă de prevenirea sau micșorarea severității sau răspândirii bolii sau indicației care este tratată. Va fi evident acelora calificați în domeniu că această cantitate eficientă de muteină IL-2 va depinde, între altele, de boală, doză, graficul de administrare a muteinei IL-2, dacă muteina IL-2 este administrată singură sau în combinație cu alți agenți terapeutici, timpul de înjumătățire al serului compoziției și starea de sănătate generală a pacientului.	37 39 41 43 45
Muteina IL-2 este, de preferință, administrată într-o compoziție care include un purtător acceptabil farmaceutic. "Purtător acceptabil farmaceutic" înseamnă un purtător care nu cauzează nici un efect nefavorabil în pacienții la care el este administrat. Astfel de purtători acceptabili farmaceutici sunt binecunoscuți în domeniu. Noi preferăm HAS/PBS 2% la pH 7,0.	47 49

1 Muteinele IL-2 conform prezentei invenții pot fi formulate în compoziții farmaceutice
prin metode binecunoscute. Vezi, de exemplu, *Remington's Pharmaceutical Science* de E.
3 W. Martin, în felul acesta, dată la referințe, care descrie formulări adecvate. Compoziția far-
maceutică a muteinei IL-2 poate fi formulată într-o varietate de forme, care includ forma
5 lichidă, gel, liofilizată sau oricare altă formă adecvată. Forma preferată va depinde de indi-
cația specială care este tratată și va fi evidentă celui calificat în domeniu.

7 Compoziția farmaceutică a muteinei IL-2 poate fi administrată oral, prin aerosol, intra-
venos, intramuscular, intraperitoneal, intradermal sau subcutanat, sau în oricare altă manieră
9 acceptabilă. Modul preferat de administrare va depinde de indicația specială care este tratată
și va fi evident celui calificat în domeniu. Compoziția farmaceutică a muteinei IL-2 poate fi
11 administrată în combinație cu alți agenți terapeutici. Acești agenți pot fi încorporați ca parte
a aceleași compoziții farmaceutice sau pot fi administrați separat de muteina IL-2, fie în mod
13 concurent, fie în concordanță cu oricare alt grafic de tratament acceptabil. În plus, compoziția
farmaceutică a muteinei IL-2 poate fi utilizată ca un auxiliar la alte terapii.

15 În consecință, această invenție se referă la compoziții și metode pentru tratamentul
HIV, cancer, boli autoimune, boli infecțioase, adjuvant de vaccin în vaccin pentru cancer și
17 terapie vaccinală convențională, pentru stimulare imună la bătrâni sau la cei imunocompro-
miși în alt fel, precum și la pacienți cu SCID uman sau altă aplicație terapeutică care necesită
19 stimulare generală a sistemului imun în oricare animal adecvat, preferabil un mamifer, cel
mai preferabil om. Așa cum s-a notat anterior, IL-2 are multe efecte. Unele dintre acestea
21 sunt stimularea blaștilor-PHA, celulelor T în repaus, celulelor B, monocitelor și celulelor NK
etc; muteinele descrise aici vor avea activități la nivelul tipurilor de celule care exprimă numai
23 receptorul IL-2 de afinitate ridicată, cum ar fi celulele T în repaus, însă nu receptorul IL-2 de
afinitate intermediară, cum ar fi celulele NK sau monocitele.

25 De asemenea propusă este utilizarea secvențelor ADN care codifică muteinele IL-2
conform acestei invenții în aplicații de terapie genică. Aplicațiile de terapie genică propuse
27 includ tratamentul acelor boli în care IL-2 este așteptată să furnizeze o terapie eficientă
datorită activității sale la nivelul celulelor T, de exemplu, HIV, cancer, boli autoimune, boli
29 infecțioase, adjuvant de vaccin în vaccin pentru cancer și terapie vaccinală convențională,
pentru stimulare imună la bătrâni sau la cei imunocompromiși în alt fel, precum și la pacienți
31 cu SCID uman și boli care răspund în alt mod la IL-2 sau agenți infecțioși sensibili la răspuns
imun mediat de IL-2.

33 Eliberarea locală de muteine IL-2, utilizând terapia genică, poate furniza agent tera-
peutic la aria țintă. Sunt propuse metodologiile terapiei genice atât *in vitro*, cât și *in vivo*. Sunt
35 cunoscute mai multe metode pentru transferarea genelor terapeutice în mod potențial la
populații de celule definite. Vezi, de exemplu, Mulligan, "The Basic Science of Gene
37 Therapy", "Știința de bază a terapiei genice", *Science*, 260: 926-31 (1993). Aceste metode
includ:

39 1) Transfer de genă direct. Vezi, de exemplu, Wolff și alții, "Direct Gene Transfer into
Mouse Muscle *in vivo*", "Transfer de genă direct în mușchi de șoarece *in vivo*", *Science*, 247:
41 1465-68 (1990);

43 2) Transfer de ADN mediat de lipozomi. Vezi, de exemplu, Caplen și alții, "Liposome-
mediated CFTR Gene Transfer to the Nasal Epithelium of Patients with Cystic Fibrosis", "
45 Transfer de genă CFTR mediat de lipozomi la nivelul epiteliului nazal al pacienților cu fibroză
chistică", *Nature Med.*, 3: 39-46 (1995); Crystal, "The Gene as a Drug", "Gena ca un
medicament", *Nature Med.*, 1: 15-17 (1995); Gao și Huang, "A Novel Cationic Liposome
47 Reagent for Efficient Transfection of Mammalian Cells", "Un nou reactiv lipozomic cationic
pentru transfecția eficientă a celulelor de mamifere",

RO 122150 B1

- 3) Transfer de ADN mediat de retrovirus. Vezi, de exemplu, Kay și alții, "In vivo Gene Therapy of Hemophilia B: Sustained Parțial Correction in Factor IX-Deficient Dogs", "Terapia genică a hemofiliei B *in vivo*: Corecție parțială susținută în câini cu deficit de factor IX", *Science*, 262: 117-19 (1993); Anderson, "Human Gene Therapy", "Terapia genică umană", *Science*, 256: 808-13 (1992);
- 4) Transfer de ADN mediat de virus ADN. Astfel de virusuri ADN includ adenovirusuri (de preferință, vectori pe bază de Ad-2 sau Ad-5), virusuri de herpes (de preferință, vectori pe bază de virus herpes simplex) și parvovirusuri (de preferință, vectori pe bază de parvovirus "defectiv" sau neautonom, mai preferabil vectori pe bază de virus adeno-asociat, cel mai preferabil, vectori pe bază de AAV-2). Vezi, de exemplu, Ali și alții, "The Use of DNA Viruses as Vectors for Gene Therapy", "Utilizarea virusurilor ADN ca vectori pentru terapia genică", *Gene Therapy*, 1: 367-84 (1994); brevet **US 4797368**, dat aici la referințe și brevet **US 5139941**, dat aici la referințe.
- Alegerea unui anumit sistem de vector pentru transferarea genei de interes va depinde de o varietate de factori. Un factor important este natura populației de celule țintă. Cu toate că vectorii retrovirali au fost studiați în mod extensiv, și utilizați într-un număr de aplicații de terapie genică, acești vectori sunt, în mod general, neadecvați pentru infectarea celulelor care nu se divid. În plus, retrovirusurile au potențial de oncogenicitate.
- Adenovirusurile au avantajul că au un domeniu de gazdă larg, pot infecta celule diferențiate terminal sau liniștite, cum ar fi neuroni sau hepatocite și se arată în mod esențial neoncogenici. Vezi, de exemplu, Ali și alții, trimiterea de mai sus, p.367. Adenovirusurile nu se arată a se integra într-un genom de gazdă. Deoarece ei există extracromozomial, riscul mutagenezei inserționale este foarte redus. Ali și alții, trimiterea de mai sus, p.373.
- Virusurile adeno-asociate prezintă avantaje similare cu vectorii pe bază de adeno-virusuri. Cu toate acestea, virusurile adeno-asociate prezintă integrare situs specifică pe cromozomul uman 19. Ali și alții, trimiterea de mai sus, p.377.
- Într-o realizare preferată, ADN-ul care codifică muteina IL-2 conform acestei invenții este utilizat în terapia genică pentru boli cu imunodeficiență, cum ar fi HIV; boli infecțioase cum ar fi tuberculoza; și cancere, cum ar fi carcinoma renală.
- Conform cu această realizare, terapia genică cu ADN care codifică muteinele IL-2 ale acestei invenții, este aplicată unui pacient care necesită aceasta, concurent cu sau imediat după diagnostic.
- Această abordare ține cont de avantajul activității selective a muteinelor IL-2 ale acestei invenții, de a evita toxicitatea nedorită și reacții adverse. Persoana calificată în domeniu va aprecia că oricare vector de terapie genică adecvat, care conține ADN pentru muteina IL-2, poate fi utilizat în conformitate cu această realizare. Tehnicile pentru construirea unui astfel de vector sunt cunoscute. Vezi, de exemplu, W. F. Anderson, "Human Gene Therapy", "Terapia genică umană", *Nature*, 392: 25-30 (1998); I. M. Verma și N. Somia, "Gene Therapy-Promises, Problems and Prospects", "Terapia genică-Premize, probleme și perspective", *Nature*, 389: 239-242 (1998). Introducerea vectorului care conține ADN pentru muteina IL-2 în poziția țintă poate fi realizată utilizând tehnici cunoscute.
- În scopul ca această invenție să poată fi mai bine înțeleasă, sunt prezentate următoarele exemple. Aceste exemple sunt numai pentru scopul ilustrării și nu sunt interpretate ca limitând domeniul invenției în nici o manieră. Toate publicațiile menționate aici sunt date la referințe în totalitatea lor.
- Se prezintă, în continuare, 11 exemple de realizare a invenției, în legătură cu figurile care reprezintă:
- fig. 1 până la 7 arată curbele doză-răspuns a wt IL-2 umane (IL-2) și D20H (fig.1), IL-2 și D20I (fig.2), IL-2 și N88G (fig.3), IL-2 și N88I (fig.4), IL-2 și N88R (fig.5), IL-2 și Q126E (fig.6) și IL-2 și Q126L (fig.7). A: răspuns-doză individual pentru IL-2 (cercuri negre) și pentru

RO 122150 B1

1 muteină (cercuri albe) în testul primar de proliferare a celulelor T umane (blaști PHA). B:
3 răspuns-doză individual pentru IL-2 (triunghiuri negre) și pentru muteină (triunghiuri albe) în
testul primar de proliferare a celulelor NK umane;

- fig. 8A...D, toxicitatea pentru PROLEUKIN™ în cimpanzeu a fost evaluată în două
5 animale (X-159, triunghiuri și X-124, pătrate), comparativ cu controlul vehicul (X-126,
romburi). Toxicitatea a fost evaluată prin parametri renali (Azot ureic din sânge (BUN), A;
7 Creatinină, B) și funcție hepatică (Bilirubină totală, C; ALT, D);

- fig. 9, reprezentarea grafică a modificării în procente a greutatei corporale, timp de
9 30 de zile. Greutatea corporală pentru animalele tratate cu IL-2/N88R (triunghiuri),
PROLEUKIN (pătrate) sau vehicul (romburi) a fost măsurată în zilele indicate;

- fig. 10A...D, limfocitele (A), leucocitele totale (B), neutrofilele (C) și trombocitele (D)
11 pentru animalele tratate cu IL-2/N8 8R (triunghiuri), PROLEUKIN (pătrate) sau vehicul
13 (romburi) au fost evaluate în zilele indicate;

- fig. 11A...D, azot ureic din sânge (A, BUN), creatinină (B), fosfor (C) și hiatus anionic
15 (D) pentru animalele tratate cu 1L-2/N88R (triunghiuri), PROLEUKIN (pătrate) sau vehicul
(romburi) au fost evaluate în zilele indicate;

- fig. 12A...D, bilirubină totală (A), ALT (B), fibrinogen (C) și timp de protrombină
17 activată (TPTA)(D) pentru animalele tratate cu IL-2/N88R (triunghiuri), PROLEUKIN (pătrate)
19 sau vehicul (romburi) au fost evaluate în zilele indicate;

- fig. 13A...D, nivelurile sangvine de sodiu (A), clor (B), calciu (C) și potasiu (D) pentru
21 animalele tratate cu IL-2/N88R (triunghiuri), PROLEUKIN (pătrate) sau vehicul (romburi) au
fost evaluate în zilele indicate;

- fig. 14A...C, nivelurile de albumină în sânge (A), hematocritul (B) și hemoglobina (C)
23 pentru animalele tratate cu IL-2/N88R (triunghiuri), PROLEUKIN (pătrate) sau vehicul
25 (romburi) au fost evaluate în zilele indicate;

- fig. 15A...C, influența IL-2/N88R (pătrate), PROLEUKIN (romburi) sau a vehiculului
27 (triunghiuri) este indicată pentru populația totală de celule T (A, celule CD3+), populația de
celule T CD4+ (B) și populația de celule T CD8+ (C);

- fig. 16A...C, influența IL-2/N88R (pătrate), PROLEUKIN (romburi) sau a vehiculului
29 (triunghiuri) este indicată pentru populația totală de celule T (A, celule CD3+), populația de
31 celule T CD4+ (B) și populația de celule T CD8+ (C);

- fig. 17, influența IL-2/N88R și PROLEUKIN asupra activării celulelor T, ținând cont
33 de valoarea medie a fluorescenței celulelor pozitive CD25. Influența IL-2/N88R (pătrate),
PROLEUKIN (romburi) și a vehiculului (triunghiuri) este indicată pentru populația de celule
35 T CD3+CD4+. Numere insuficiente de celule CD3+/CD8+ au fost obținute pentru a evalua
valoarea medie a fluorescenței la nivelul acestei populații;

- fig. 18A...D, influența IL-2/N88R (pătrate), PROLEUKIN (romburi) sau a vehiculului
37 (triunghiuri) este indicată pentru populația de celule T CD4+ (A, celule CD3+/CD4+),
39 populația de celule T CD8+ (B, celule CD3+/CD8+), populația de celule T totală (C, celule
CD3+) și populația de celule NK (D, celule CD3-/CD16+);

- fig. 19, reprezentarea grafică a metastazelor pulmonare în funcție de doză, la
41 șoarece tratat cu PROLEUKIN (cercuri albe) sau IL-2/N88R (cercuri negre). Metastazele
43 pulmonare au fost numărate în paragraful de concluzii al studiului;

- fig. 20, harta plasmidică a vectorului pBCHL2SA pentru IL-2/N88R.

45 Exemple

47 Exemplit 1. Producția de muteine în *E. coli*

49 Muteinele au fost generate prin mutageneză orientată la situs, utilizând primeri care
conțin codoni corespunzând mutației dorite în mod esențial, așa cum a fost descrisă de T.
A. Kunkel, J. D. Roberts și R. A. Zakour, "Rapid and efficient site-specific mutagenesis
without phenotypic selection", "Mutageneză situs specifică, rapidă și eficientă fără selecție

RO 122150 B1

fenotipică", (1987), *Methods Enzymol.*, 154: 367-382. Pe scurt, ADNc de IL-2 umană care conține situsurile pentru enzime de restricție Bam HI și Xba I a fost subclonat în vectorul fag M13, M13 mpl9 (New England Biolabs, Beverly, MA), utilizând aceleași poziții. ADNc de IL-2 tip sălbatic a fost obținut utilizând reacția în lanț a polimerazei ("PCR") dintr-o mulțime de ADNc generată din ARNm izolat din limfocite umane din sânge periferic, induse 24 h, cu forbol 12-miristat 13-acetat (10 ng/ml). Primerii PCR utilizați au fost pentru capătul 5f al cadrului deschis de citire al IL-2,

5'-CCT CAA CTC CTG AAT TCA TGT ACA GGA TGC -3' (SECV ID NR: 3); și pentru capătul 3' al cadrului deschis de citire al IL-2,

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

Situsurile enzimei de restricție Eco RI (capătul-5') și Bam HI (capătul-3') au fost încorporate în fiecare oligonucleotidă și sunt indicate prin *italice*. Condițiile PCR utilizate au fost 1 min la 94°C, 1 min la 58,7°C, și 1 min la 72°C, pentru 25 de cicluri. Secvența ADNc IL-2 corectă, astfel obținută, a fost confirmată prin secvențializare, utilizând setul de secvențializare Sequenase® (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL), așa cum este descris de către furnizor. ADN monocatenar care conține uracil (U-DNA) a fost obținut prin transformarea tulpinei *E. coli* CJ236 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) cu M13 mpl9 care conține ADNc IL-2. Mutageneza orientată la situs a utilizat în general primeri care conțin 15 nucleotide omoloage matriței U-ADN 5' față de codonul(ii) țintiți pentru mutageneză, nucleotide care încorporează schimbarea dorită și 10 nucleotide adiționale omoloage matriței U-ADN 3' față de ultima nucleotidă alterată. Inițial, mutageneza orientată la situs a fost utilizată pentru a introduce o poziție de restricție Nco I la începutul secvenței mature de IL-2 umană. Utilizarea acestei poziții de restricție încorporează un reziduu N-terminal de metionină, care va direcționa expresia în spațiul citoplasmic al *E. coli*, utilizând de exemplu, vectorul de expresie pET3d. Primerul utilizat pentru acest scop a fost:

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

Primerii specifici utilizați pentru a încorpora mutații la pozițiile D20, N88 și Q126 au fost:

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

N88X: 5'-GGG ACT TAA TCA GCN NNA TCA ACG TAA TAG-3' (SECV ID NR:7)

Q126X: 5'-GGA TTA CCT TTT GTN NNA GCA TCA TCT C-3' (SECV ID NR:8)

unde NNN a fost înlocuit cu un codon potrivit pentru histidină (CAC) sau izoleucină (ATC) (la poziția D20), arginină (CGT), glicină (GGT), sau izoleucină (ATC) (la poziția N88), sau leucină (CTG) (la poziția Q126). Alte mutații au utilizat o strategie similară și un codon corespunzător pentru o mutație dată. Primerii au fost fosforilați utilizând kinaza pentru polinucleotidă T4 (New England Biolabs, Beverly, MA), folosind modul de lucru al furnizorului. După cuplarea primerului cu matrița U-ADN și extensia cu polimerază ADN T7 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), celulele tulpinei de *E. coli* DH5a™ (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) au fost transformate cu 5 μl de amestec de reacție și puse pe plăci într-un mediu LB care conține geloză 0,7%. După incubare la 37°C, plăcile au fost expandate prin adunarea unei singure plăci și transferarea în 2 ml de mediu LB și au fost crescute peste noapte la 37°C. ADN monocatenar a fost izolat utilizând un set de purificare. M13 (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA) conform modului de lucru al furnizorului și clonele care conțin mutația dorită au fost identificate prin secvențializarea ADN monocatenar, utilizând setul de secvențializare Sequenase® (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL) conform modului de lucru al furnizorului. ADNc de muteină IL-2 din ADN forma replicativă, care corespunde la plăcile care conțin secvența mutantă corectă, a fost izolat utilizând Nco I și Xba I și subclonat la vectorul plasmidic pET3a (Stratagene, San Diego, CA)(Strat). Tulpina de *E. coli* BL21 a fost transformată cu vectorul pET3a care conține muteină, și crescută la un ABS₂₈₀ cu valoarea între 0,60 și 1,0, în care timp au fost adăugați 0,4 mM IPTG pentru a amorsa producția de muteină IL-2.

RO 122150 B1

1 **Exemplul 2. Extracția și purificarea muteinelor din *E. coli***

3 Trei ore după amorsare celulele au fost recoltate prin centrifugare la 10.000 x g.
5 Muteinele IL-2 recombinante au fost renaturate și purificate inițial prin dispersarea celulelor
7 în 10 volume (vol/masă umedă) de tampon zaharoză/Tris/EDTA (0,375 M zaharoză, 10 mM
9 Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA). Celulele dispersate au fost sonicate de 3 ori la 300 W, cu
11 intervale de repaus de 30 s, într-o baie de gheață, utilizând un sonicator Missonix model
13 XL2020 echipat cu o sondă standard de 1 inch. Materialul sonicat a fost apoi centrifugat la
15 17.000 x g, timp de 20 min, la 4°C. Peletul, care va fi alb la culoare în acest moment, a fost
17 spălat prin resuspendare și centrifugare o dată în tampon zaharoză/Tris/EDTA, de două ori
19 cu tampon Tris/EDTA (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) și în final resuspendat în 10 vol
21 tampon 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 (mostra este luată la acest punct pentru analiză pe gel) și
23 centrifugat timp de 20 min la 17.000 x g.

25 Peletul a fost dizolvat prin adăugare de 3 volume de clorură de guanidiniu 8 M în
27 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0) și 2-mercaptoetanol 0,1 % (vol/vol). După incubare timp de 2 h la
29 temperatura camerei, mostra a fost centrifugată timp de 20 min la 17.000 x g. Soluția rezul-
31 tantă a fost dializată pentru aproximativ 20 h cu 20 de volume de 10 mM Tris/HCl, pH 8,0,
33 1 mM EDTA la 4°C. Soluția a fost centrifugată la 17.000 x g, timp de 20 min, ajustată cu acid
35 trifluoroacetic 0,1% și filtrată într-o unitate de filtru de 0,22 μ. Soluția a fost transferată
37 imediat într-o sticlă siliconizată și încărcată pe o coloană C8 (Vydac 208TP54). Muteinele
39 IL-2 au fost purificate, utilizând un gradient liniar de 20 min, folosind 45-85% acetonitril în
41 TFA 0,1%. Concentrația proteinei eluate a fost determinată prin analiză A280 și de amino-
43 acid. Proteina a fost apoi împărțită în părți aliquote (100 ml) în tuburi siliconizate și stocată
45 la -20°C. Muteina astfel purificată a migrat, în mod tipic, într-o singură bandă, așa cum a fost
47 observat prin SDS-PAGE (colorație argentică) și a fost măsurată cantitativ prin analiza de
49 aminoacid (tipic acuratețe >90%).

27 **Exemplul 3. Testul de proliferare a celulelor T**

29 Celule mononucleare din sânge periferic (PBMC) au fost izolate din aproximativ
31 100 ml de sânge uman normal (Irwin Memorial Blood Bank, San Francisco, CA) diluate 1:2
33 în ser fiziologic tamponat cu fosfat, Dulbecco, rece (fără Ca⁺² și Mg⁺²; DPBS). Ficoll-Paque
35 (Pharmacia) este introdusă dedesubt și mostra este centrifugată pentru a izola PBMC,
37 urmată de spălări extensive în DPBS rece. Blaștii PHA (celule T activate) au fost generați
39 prin resuspendarea celulelor în RPMI 1640 care conține ser bovin fetal 10% (Hyclone), la
41 care este adăugat 1% (g/v) din fiecare care urmează: L-glutamină; aminoacizi neesențiali;
43 piruvat de sodiu; și antibiotic-antimicotic (mediu RPMI) la o densitate de 1 x 10⁶ celule/ml.
45 Phytohemmaglutinin (PHA-P; Sigma) a fost adăugat la o concentrație finală de 10 μg/ml și
47 celulele au fost incubate la 37°C, 5% CO₂ timp de 3 zile. Celulele au fost recoltate și spălate
49 de două ori în DPBS, resuspendate în medii RPMI și puse pe plăci cu fund plat cu 96 de
godeuri, la o densitate de 1 x 10⁵ celule/godeu în 200 μl, cu varierea concentrațiilor de IL-2
sau muteină în mediile RPMI. Plăcile au fost incubate timp de 48 h la 37°C, la care s-a
adăugat ³H-timidină 1 μCi (DuPont NEN®, Boston, MA)/godeu timp de 6 h, recoltate și radio-
activitatea a fost măsurată după recoltarea celulelor pe filtre cu fibre de sticlă.

43 **Exemplul 4. Testul de proliferare a celulelor NK**

45 Celule mononucleare din sânge periferic (PBMC) au fost izolate din aproximativ
47 100 ml de sânge uman normal (Irwin Memorial Blood Bank, San Francisco, CA) diluate 1:2
49 în ser fiziologic tamponat cu fosfat, Dulbecco, rece (fără Ca⁺² și Mg⁺²; DPBS). Ficoll-Paque
(Pharmacia) este introdusă dedesubt și mostra este centrifugată pentru a izola PBMC,
urmată de spălări extensive în DPBS rece. Celulele NK au fost separate de celelalte celule.
Setul de izolare a celulelor NK de la Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany; Cat# 465-
01) este preferat pentru acest scop. Setul conține doi reactivi, coloane de separare și un

RO 122150 B1

suport de coloană magnetic foarte puternic. Primul reactiv este un cocteil de anticorpi CD3, CD4, CD19, CD33 monoclonali conjugați cu o haptenă de izotip IgG1 de șoarece. Acesta este pentru a epuiza PMBC de celulele T, celulele B și celulele mieloide. Este de presupus că oricare set adecvat de anticorpi care recunosc aceste tipuri de celule poate fi utilizat. Al doilea reactiv constă din microgranule MACs super-paramagnetice coloidale conjugate cu un anticorp anti-haptenă. Celulele sunt resuspendate în PBS cu albumină din ser bovin 0,5% și 2 mM EDTA (PBS/EDTA). Volumul suspensiei este dependent de numărul de celule utilizat și este dat într-o diagramă de Miltenyi Biotec. În mod tipic, cu un număr de celule de 2 până la 5×10^8 PBMC, celulele sunt resuspendate în 800 μ l de tampon și apoi 200 μ l din fiecare reactiv sunt utilizați. După incubare cu reactivi, celulele sunt adăugate la coloană (resuspendate în 2 ml de tampon). Celulele non-NK aderă la magnet (epuizate) și celulele NK sunt izolate și colectate în flux. Celulele sunt spălate, resuspendate în medii RPMI (conține: RPMI 1640, la care este adăugat 1% din fiecare care urmează: L-glutamină; aminoacizi neesențiali; piruvat de sodiu; antibiotic-antimicotic (toate de la Gibco/BRL, Gaithersburg, MD); ser bovin fetal 10% (Hyclone)) și puse pe plăci cu fund plat cu 96 de godeuri la o densitate de 1×10^5 celule/godeu în 200 μ l. Celulele au fost recoltate și spălate de două ori în DPBS, resuspendate în medii RPMI și puse pe plăci cu fund plat cu 96 de godeuri, la o densitate de 1×10^5 celule/godeu în 200 μ l, cu varierea concentrațiilor de IL-2 sau muteină în medii RPMI. Plăcile au fost incubate timp de 48 h la 37°C, la care s-a adăugat 3H-timidină 1 μ Ci (DuPont NEN®, Boston, MA)/godeu timp de 6 h, recoltate și radioactivitatea a fost măsurată după recoltarea celulelor pe filtre cu fibre de sticlă.

Exemplul 5. Muteine care în mod selectiv activează celulele T față de celulele NK

Muteine au fost generate utilizând mutageneza orientată la situs (Kunkel și alții (1987), *Methods Enzymol.*, 154: 367-382) la pozițiile Asp-20, Asp-84, Asn-88 și Gln-126, și au fost exprimate în *E. coli*, utilizând sistemul de expresie pET-3a, așa cum a fost descris de furnizor (Stratagene). Muteinele au fost purificate prin recuperarea corpurilor de incluziune în guanidină-HCl, repliere și cromatografiere, utilizând HPLC, așa cum a fost descris anterior. Proteina care rezultă este >95% pură determinată prin SDS-PAGE cu colorație argentică și a fost analizată pentru concentrație și puritate prin analiza de aminoacizi (precizii AAA în mod tipic >90%). Muteinele având activitate corespunzătoare au fost confirmate în secvență, utilizând analiza spectrometriei de masă. Muteinele astfel purificate au fost evaluate în testele de celule T și NK descrise anterior. Activitățile relative pentru muteinele IL-2 în testele de celule T și NK sunt indicate în tabelul 1.

Tabelul 1

Muteine evaluate pentru activitatea selectivă asupra celulelor T

Muteină	Activitate relativă		
	Celule T față de NK	Celule T	Celule NK
WtIL-2	1	1,00000	1,00000
Muteine D20			
D20A	5	0,00024	0,00005
D20H	3900	0,37081	0,00009
D20I	7600	4,59635	0,00061
D20K	330	0,06301	0,00019
D20L	100	0,00063	0,00001
D20M	490	0,05372	0,00011
D20N	160	0,03000	0,00019
D20Q	100	0,03180	0,00032
D20R	33	0,00018	0,00001
D20S	170	0,06640	0,00038

RO 122150 B1

Tabelul 1 (continuare)

Muteină	Activitate relativă		
	Celule T față de NK	Celule T	Celule NK
D20V	10	0,00093	0,00009
D20Y	1000	0,06587	0,00007
Muteine N88			
N88A	50	0,50000	0,01
N88E	10	0,01172	0,00115
N88F	22	0,02222	0,001
N88G	980	8,33333	0,00853
N88H	3	0,00100	0,001
N88I	9600	0,98074	0,00010
N88K	3	0,00010	0,00032
N88L	4	0,00400	0,001
N8 8M	250	0,25000	0,001
N88R	6200	0,89730	0,00015
N88S	80	0,00200	0,16000
N88T	395	0,50000	0,001266
N8 8V	67	0,06670	0,001
N88W	1	0,00100	0,001
N88Y	8	0,00800	0,001
Muteine Q126			
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
Q12 6M	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
Q12 6V	330	1,00556	0,00302
Q12 6W	1,0	0,20000	0,20000
Q126Y	10	0,88500	0,08850

Activitățile muteinelor sunt descrise în termeni de concentrație relativă a muteinei necesare, pentru a da 50% din răspunsul maxim (CE_{50}) în comparație cu CE_{50} a wtIL-2 în același test; în cazul testelor multiple cu aceeași muteină, este prezentată media geometrică a valorilor. Valorile CE_{50} pentru wt IL-2 sunt cuprinse în domeniul de la ~10 pM până la 150 pM în testul de celule T și de la ~50 pM până la ~200 pM în testul de celule NK. Raportul dintre activitatea muteinelor asupra celulelor T și activitatea asupra celulelor NK este exprimat ca activitatea relativă a muteinei la nivelul celulelor T, împărțită la activitatea relativă a muteinei la nivelul celulelor NK. Acest raport este determinat pentru fiecare muteină, folosind numai activitatea determinată din testele de celule T și NK date, utilizând celule de la un donator unic.

RO 122150 B1

Activitățile muteinei pot fi clasificate în 6 categorii mari:	1
1) selectivitate pentru celule T de 1000 de ori;	
2) selectivitate pentru celule T de 100 însă <1000 de ori;	3
3) selectivitate pentru celule T de 10 însă <100 de ori;	
4) activitate îmbunătățită comparativ cu IL-2 la nivelul celulelor T;	5
5) selectivitate pentru celulele NK;	
6) selectivitate de 10 ori fie pentru celulele T, fie pentru celulele NK.	7
Clasa 1: D20H, I și Y; N88G, I și R.	
Clasa 2: D20K, L, M, N, Q și S; N88M și T; Q126D, E, G, L și V.	9
Clasa 3: D20R; N88A, E, F, S și V; Q126F, I, N, R și S.	
Clasa 4: D20I; N88G; Q126E, L, M, N și R.	11
Clasa 5: Q126A, H.	
Clasa 6: D20A, T și V; N88H, K, L, W și Y; Q126K, P, T, W și Y.	13
În interiorul claselor 1-3, muteinele preferate sunt acelea care arată activitate aproape ca wt IL-2 sau mai bună la nivelul celulelor T. În clasa 1, aceasta va include D20H și I; N88G, I și R; în clasa 2, aceasta va include N88M și T, Q126D, E, G, L și V; în clasa 3, aceasta va include N88A, Q126F și G. Muteinele din clasa 4 sunt prezise a avea putere mai mare decât wtIL-2 <i>in vivo</i> .	15
Poate fi văzut din tabelul 1 că nici o singură mutație nu are drept rezultat o muteină IL-2 inactivă în ambele teste. Cu toate acestea, poate fi trasă concluzia că o combinație a mutațiilor care au drept rezultat activitate compromisă, în mod serios, de la două poziții diferite va da potențial, o activitate de antagonist IL-2 la nivelul celulelor T sau a altor tipuri de celule cu receptor IL-2 de afinitate ridicată. Un astfel de antagonist este prezis din aceste date când mutațiile au fost proiectate pentru a altera numai interacțiunile cu IL-2R β și IL-2R γ . Un astfel de exemplu va fi muteina dublă D20R/Q126T. Combinația muteinelor de activitate slabă într-o moleculă este prezisă a fi combinatorie în natură, adică D20R are activitate 0,00018 la nivelul celulelor T, Q126T are activitate 0,0001 la nivelul celulelor T, muteina dublă D20R/Q126T va fi de așteptat să aibă activitatea 0,000000018 din cea a wt IL-2 la nivelul celulelor T. Alte combinații pot fi derivate din datele furnizate.	17
Exemplul 6. Activitatea biologică a wtIL-2 și a muteinelor IL-2	19
Fig. 1 până la 7 arată curbele doză-răspuns a wt IL-2 umane (IL-2) și D20H (fig. 1), IL-2 și D20I (fig.2), IL-2 și N88G (fig.3), IL-2 și N88I (fig.4), IL-2 și N88R (fig.5), IL-2 și Q126E (fig.6) și IL-2 și Q126L (fig.7). A: răspuns-doză individual pentru IL-2 (cercuri negre) și pentru muteină (cercuri albe) în testul primar de proliferare a celulelor T umane (blaști PHA). B: răspuns-doză individual pentru IL-2 (triunghiuri negre) și pentru muteină (triunghiuri albe) în testul primar de proliferare a celulelor NK umane.	21
În mod special, cu referire la fig.1, pentru experimentul arătat, doza de wt IL-2 care dă 50% din proliferarea maximă (CE ₅₀) este - $1,5 \times 10^{-10}$ M pentru testul de celule T (A) și $\sim 1 \times 10^{-10}$ M pentru testul de celule NK (B). Valoarea CE ₅₀ pentru D20H a fost de $\sim 2 \times 10^{-10}$ M în acest test de celule T, însă estimat a fi $> 1 \times 10^{-5}$ M în acest test de celule NK. Îmbunătățirea netă în activitatea lui D20H asupra celulelor T față de activitatea asupra celulelor NK este astfel > de 50.000 de ori ca determinată pentru acest test. Rezultate similare au fost obținute cu sânge de la donori suplimentari (date nearătate).	23
În mod special, cu referire la fig.2, pentru experimentul arătat, doza de wt IL-2 care dă 50% din proliferarea maximă (CE ₅₀) este $\sim 1,5 \times 10^{-10}$ M pentru testul de celule T (A) și $\sim 3 \times 10^{-10}$ M pentru testul de celule NK (B). Valoarea CE ₅₀ pentru D20I a fost de asemenea, de $\sim 1,5 \times 10^{-10}$ M în acest test de celule T, însă estimat a fi de numai $\sim 5 \times 10^{-6}$ M în acest test de celule NK. Îmbunătățirea netă în activitatea lui D20I asupra celulelor T față de activitatea asupra celulelor NK este astfel \sim de 16.000 de ori ca determinată pentru acest test. Rezultate similare au fost obținute cu sânge de la donori suplimentari (date nearătate).	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47
	49

RO 122150 B1

1 În mod special, cu referire la fig.3, pentru experimentul arătat, doza de wt IL-2 care
dă 50% din proliferarea maximă (CE_{50}) este $\sim 4 \times 10^{-11}$ M pentru testul de celule T (A) și 2
3 $\times 10^{-10}$ M pentru testul de celule NK (B). Valoarea CE_{50} pentru N88G a fost de $\sim 5 \times 10^{-12}$ M
în acest test de celule T, însă estimat a fi de numai $\sim 3 \times 10^{-8}$ M în acest test de celule NK.
5 Îmbunătățirea netă în activitatea lui N88G asupra celulelor T față de activitatea asupra
celulelor NK este astfel \sim de 1.200 de ori ca determinată pentru acest test. Rezultate similare
7 au fost obținute cu sânge de la donori suplimentari (date nearătate).

9 În mod special, cu referire la fig.4, pentru experimentul arătat, doza de wt IL-2 care
dă 50% din proliferarea maximă (CE_{50}) este $\sim 1,5 \times 10^{-10}$ M pentru testul de celule T (A) și ~ 1
11 $\times 10^{-10}$ M pentru testul de celule NK (B). Valoarea CE_{50} pentru N88I a fost de $\sim 4 \times 10^{-10}$ M în
acest test de celule T, însă estimat a fi de numai $\sim 5 \times 10^{-6}$ M în acest test de celule NK.
13 Îmbunătățirea netă în activitatea lui N88I asupra celulelor T față de activitatea asupra
celulelor NK este astfel \sim de 18.000 de ori ca determinată pentru acest test. Rezultate simi-
lare au fost obținute cu sânge de la donori suplimentari (date nearătate).

15 În mod special, cu referire la fig.5, pentru experimentul arătat, doza de wt IL-2 care
dă 50% din proliferarea maximă (CE_{50}) este $\sim 1,5 \times 10^{-10}$ M pentru testul de celule T (A) și ~ 1
17 $\times 10^{-10}$ M pentru testul de celule NK (B). Valoarea CE_{50} pentru N88R a fost de $\sim 9 \times 10^{-11}$ M
în acest test de celule T, însă estimat a fi de numai $\sim 3 \times 10^{-7}$ M în acest test de celule NK.
19 Îmbunătățirea netă în activitatea lui N88R asupra celulelor T față de activitatea asupra
celulelor NK este astfel \sim de 5.000 de ori ca determinată pentru acest test. Rezultate similare
21 au fost obținute cu sânge de la donori suplimentari (date nearătate).

23 În mod special, cu referire la fig.6, pentru experimentul arătat, doza de wt IL-2 care
dă 50% din proliferarea maximă (CE_{50}) este $\sim 8 \times 10^{-12}$ M pentru testul de celule T (A) și ~ 5
25 $\times 10^{-11}$ M pentru testul de celule NK (B). Valoarea CE_{50} pentru Q126E a fost de $\sim 8 \times 10^{-13}$ M
în acest test de celule T, însă estimat a fi de numai $\sim 2 \times 10^{-9}$ M în acest test de celule NK.
27 Îmbunătățirea netă în activitatea lui Q126E asupra celulelor T față de activitatea asupra
celulelor NK este astfel \sim de 400 de ori ca determinată pentru acest test. Rezultate similare
au fost obținute cu sânge de la donori suplimentari (date nearătate).

29 În mod special, cu referire la fig.7, pentru experimentul arătat, doza de wt IL-2 care
dă 50% din proliferarea maximă (CE_{50}) este $\sim 5 \times 10^{-11}$ M pentru testul de celule T (A) și ~ 8
31 $\times 10^{-11}$ M pentru testul de celule NK (B). Valoarea CE_{50} pentru Q126L a fost de $\sim 2 \times 10^{-11}$ M
în acest test de celule T, însă estimat a fi de numai $\sim 2 \times 10^{-8}$ M în acest test de celule NK.
33 Îmbunătățirea netă în activitatea lui Q126L asupra celulelor T față de activitatea asupra
celulelor NK este astfel \sim de 625 de ori ca determinată pentru acest test. Rezultate similare
35 au fost obținute cu sânge de la donori suplimentari (date nearătate).

Exemplul 7. Studii de toxicitate la cimpanzeu

37 IL-2/N88R a fost selectată dintre proteinele mutante IL-2 din tabelul 1, datorită activi-
tății sale demonstrate de agonist selectiv de celule T în testele primare de celule T și NK
39 umane. Referitor la IL-2 tip sălbatic, ea este de ~ 6.000 de ori mai activă la nivelul celulelor
T decât la nivelul celulelor NK și prezintă activitate, în mod esențial, echivalentă cu wt IL-2
41 la nivelul celulelor T. IL-2/N88R a fost produsă în celule CHO, purificată și evaluată într-un
model de cimpanzeu pentru activitatea și toxicitatea IL-2. În acest model *in vivo*, ea a arătat
43 activitate la nivelul celulelor T, comparabilă cu a variantului recombinant de IL-2, accesibil
comercial (PROLEUKIN™ Chiron Corporation, Emeryville, CA), dar a indus în comparație,
45 numai efecte secundare moderate (atât în termeni de parametri obiectivi, cât și parametri
clinici).

RO 122150 B1

A. Plan experimental

1. Materiale și metode

Partea *in vivo* a studiului a avut loc la New Iberia Research Center (New Iberia, LA, Sponsor Bayer Corporation, Berkeley, CA) și a implicat două faze ale studiului și 11 cimpanzei masculi, adult tânăr până la adult, cu greutate corporale cuprinse în domeniul de la aproximativ 45 până la 75 kg.

Faza I a studiului a fost o fază de determinare a dozei și a implicat administrarea unei doze subcutanat, dintr-un vehicul sau a unei doze subcutanat de PROLEUKIN la 1,2 mg/m², de două ori pe zi (BID), timp de 5 zile. Faza II a studiului este o comparație a vehiculului, PROLEUKIN și a IL-2/N88R date subcutanat, la fiecare 12 h (q12h), timp de 5 zile. Doza de IL-2/N88R a fost selectată pentru a da o expunere comparabilă cu cea pentru PROLEUKIN bazat pe analiza farmacocinetică. Probe de sânge au fost luate pentru analiza chimiei sângelui, CBC, hematologie/coagulare și analiză FACS a populațiilor de celule T și NK așa cum este detaliat în secțiunile 5 și 6.

Tabelul 2A

Mod de lucru, faza I

Grup, numărul	Număr de animale	Produs de testat	Doză	Frecvență
1	1	Vehicul	NA	BID timp de 5 zile
2	2	PROLEUKIN	1,2 mg/m ²	BID timp de 5 zile

Tabelul 2B

Mod de lucru, faza II

Grup, numărul	Număr de animale	Produs de testat	Doză	Frecvență
1	2	Vehicul	2,4 ml/m ²	q12h timp de 5 zile
2	3	PROLEUKIN	1,2 mg/m ²	q12h timp de 5 zile
3	3	IL-2/N88R	1,2 mg/m ²	q12h timp de 5 zile

2. Procedura de dozare

În zilele de studiu în care s-a recoltat sânge, animalele au fost complet anesteziate, utilizând ketamină 1M la o doză de aproximativ 10 mg/kg înainte de administrarea produsului sau vehiculului de test. În zilele de studiu în care analiza de sânge nu a fost necesară, animalele au fost restricționate fizic, utilizând o cușcă cu spațiu limitat înainte de administrarea produsului sau vehiculului de testare. Doza a fost administrată prin injecție subcutanată la fiecare 12 h, timp de 5 zile și locul de injecție a fost tuns de păr în ziua 1 a studiului. Locul și timpul de dozare au fost înregistrate pentru fiecare doză.

3. Observații clinice

(a) *Observații zilnice și consum de hrană.* Fiecare animal a fost observat de două ori pe zi și oricare observație anormală a fost raportată conducătorului studiului. Animalele care par bolnave au fost aduse în atenția conducătorului studiului, veterinarului proiectului și reprezentantului sponsorului. Consumul de hrană a fost confirmat și înregistrat de două ori pe zi, prin observare vizuală.

(b) *Greutăți corporale.* Greutățile corporale au fost luate în prestudiu, înaintea dozării din ziua 1 și de fiecare dată animalele au fost sedate pentru recoltarea sângelui.

(c) *Observarea locurilor de injecție.* Locurile de injecție au fost observate zilnic. Orice aspect anormal, cum ar fi roșeață sau umflătură, a fost înregistrat.

Graficul pentru colectarea probelor fazei II

Timp	CBC	Chim.	Coag.	FACS	Test pentru sponsor
Prestudiu	X	X	X	X	X
Ziua 1, predoză	X	X	X	X	X
Ziua 1, 15 min					X
Ziua 3, pre doză	X	X	X	X	X
Ziua 3, 15 min					X
Ziua 6	X	X	X	X	X
Ziua 8	X	X	X	X	X
Ziua 10	X	X	X	X	X
Ziua 12	X	X	X	X	X
Ziua 15	X	X	X	X	X
Ziua 30	X	X	X	X	X

4. Manipularea probelor

(a) *Chimia serului.* Probe de sânge de aproximativ 2 ml au fost recoltate de la fiecare animal în tuburi fără anticoagulant, la perioadele de timp specificate mai sus. Timpii de recoltare a sângelui au fost înregistrați și sângele a fost lăsat să se coaguleze la temperatura camerei. Probele au fost apoi centrifugate, serul separat și expediat la NIRC Clinical Pathology Laboratory. Tabloul chimiei serului standard NIRC a fost inclus în tabelul 4.

Tabelul 4

Tabloul chimiei sângelui

Sodiu	Fosfor
Potasiu	Azot ureic
Clorură	Creatinină
Bilirubină totală	Proteine totale
Fosfatază alcalină	Albumină
Lactatdehidrogenază (LDH)	Raport albumină/globuline
Aspartataminotransferază (AST)	Glucoza
Alanintaminotransferază (ALT)	Calciu
Dioxid de carbon (CO ₂)	Gamma-glutamilttransferază (GGT)

(b) *Hematologie.* Probe de sânge de aproximativ 2 ml de au fost recoltate de la fiecare animal în tuburi cu EDTA, la perioadele de timp specificate mai sus și probele au fost expediate la NIRC Clinical Pathology Laboratory. Tabloul hematologic NIRC standard, incluzând hemoleucograma completă, diferențială și numărarea trombocitelor, a fost efectuat tuturor probelor.

(c) *Testele pentru sponsor.* O probă de sânge de aproximativ 6 ml a fost recoltată în tuburi cu EDTA ca anticoagulant, la perioadele de timp specificate mai sus. Timpii de recoltare a sângelui au fost înregistrați. Probele au fost centrifugate, plasma a fost separată și divizată în trei tuburi separate. Plasma a fost depozitată prin înghețare (-60°C sau sub) și transportată cu nava la Bayer Corporation, Berkeley, CA, de îndată ce studiul a fost terminat.

5. FACS

(a) *Procedură.* O probă de sânge de aproximativ 5 ml a fost recoltată în anticoagulant sodiu heparină, la timpii specificați pentru analiza FACS.

Proba de sânge total a fost obținută fie în EDTA, ACD, fie în heparină. Numerele de celule au fost ajustate pentru a fi în domeniul de la 2 până la 20 de mii per mm³.

RO 122150 B1

Tuburi de sticlă sau de plastic 12 x 75 au fost etichetate în mod corespunzător pentru a efectua tabloul de anticorpi. Anticorpul sau cocteilul de anticorpi a fost adăugat în tuburi, urmând volumele sugerate de furnizor.	1 3
100 µl de probă de sânge bine amestecată au fost adăugați per tub și amestecul a fost incubat timp de 30 min la temperatura camerei, protejat de lumină.	5
După incubare, 2 ml de soluție de liză (soluție de liză sort Becton Dickinson FACS, BD # 92-0002) au fost adăugați și amestecul a fost agitat turbionar, cu grijă, și lăsat să stea timp de 10 min la temperatura camerei. Tuburile au fost apoi centrifugate la temperatura camerei timp de 5 min, la 300 x g. Supernatanții au fost decantați, excesul de lichid a fost eliminat și a fost adăugat 1 ml de tampon PBS (GIBCO 14190-144) la fiecare pelet de celule. După o agitare turbionară, cu grijă, tuburile au fost centrifugate la temperatura camerei timp de 5 min, la 300 x g. Supernatanții au fost decantați și excesul de lichid a fost eliminat înaintea adăugării unui ml de soluție fixativă (soluție de formaldehidă 0,5%, preparată prin diluarea formaldehidei 10% (Polyscience, Inc., # 0418) 1:20 cu tampon PBS) la peletul de celule și a agitării turbionare, cu grijă, pentru resuspendare. Probele au fost apoi analizate cu un citometru de flux Coulter EPICS SL Flow Cytometer.	7 9 11 13 15
Anticorpi utilizați pentru studiu: control izotip MlgG1/MlgG1 (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 (Pharmingen, Cat.# 347617), CD3-PerCP (Becton Dickinson, Cat.# 347344).	17 19 21
<i>6. Profil de coagulare</i>	
O probă de sânge total de aproximativ 2 ml a fost recoltată în tuburi cu citrat de sodiu, adăugat ca anticoagulant la timpii specificați mai sus. Profilul de coagulare se compune din timp de protrombină (TP), timp de tromboplastină parțial activată (TTPA) și fibrinogen.	23 25
B. Rezultate și discuții	
1. Determinarea dozei de PROLEUKIN	27
Scopul primar al acestei faze a fost de a identifica o doză optimă de PROLEUKIN pentru compararea cu IL-2/N88R. Această doză optimă de PROLEUKIN a fost ținută a fi o doză tolerabilă (mai mică decât doza maxim tolerată) care va determina, în mod ideal, toxicitatea clinic semnificativă, dar moderată și reversibilă.	29 31
O doză de PROLEUKIN de 1,2 mg/m ² , BID, a fost determinată ca doza inițială, bazat pe regimurile de doză de PROLEUKIN date clinic cu extrapolare la specii încrucișate, toxicitățile lor corespunzătoare și rezultatele doză PROLEUKIN-răspuns la maimuță <i>cynomolgus</i> de casă.	33 35
Doi cimpanzei au fost tratați în această manieră cu PROLEUKIN. Aceste animale au devenit în mod progresiv, mai puțin active, epuizate și deshidratate pe parcursul dozării.	37
Ambele animale au dezvoltat simptome severe gastrointestinale, începând cu zilele 3 sau 4, incluzând apetit redus, diaree, vomă. Dozarea la un animal (numărul X-159) a fost făcută discontinuu după 3 zile de dozare, datorită unei disfuncții renale severe (fig. 8A&B) și unei disfuncții hepatice moderate (fig. 8 C&D), reflectate în caracteristicile chimiei sângelui. Acestea includ creșteri ale azotului ureic din sânge (BUN), creatininei și bilirubinei totale, ALT (SGPT).	39 41 43
A fost administrată i.v. soluție Ringers lactat la ambele animale tratate cu PROLEUKIN, în ziua 3 și 4 (animal X-159) și numai ziua 4 (animal X-124) ca resuscitare sau pentru a preveni deshidratarea suplimentară. Animalul număr X-159 a fost scos din studiu în ziua 8, datorită disfuncției renale și trombusului posibil la nivelul membrului inferior drept, așa cum a fost indicat de pulsul foarte scăzut (femural) și întreaga gambă a fost rece și cu volum mărit. Cu toate că a fost observată toxicitate semnificativă într-un animal, celălalt animal a experimentat mai puține evenimente severe și profilul evenimentelor nefavorabile pentru ambele animale a fost reversibil.	45 47 49 51

1 Bazat pe aceasta, 1,2 mg/m² de PROLEUKIN și doza echivalentă (bazat pe expu-
nere) de IL-2/N88R, q12h, au fost determinate a fi regimul de doză corespunzător pentru
3 compararea acestor doi compuși.

2. Compararea IL-2/N88R cu PROLEUKIN

5 *Observații clinice.* Tabelul 5 prezintă observațiile clinice făcute în timpul studiului.
Valorile sunt raportate pe o scară de la 0 la 5, unde 5 este sever. Toate animalele tratate cu
7 PROLEUKIN au fost sever bolnave; a existat un deces asociat cu tratamentul cu
PROLEUKIN. Valorile raportate după ziua 6 pentru grupul de PROLEUKIN reflectă datele
9 de la cele două animale care au rămas.

11 Cel mai evident efect secundar al tratamentului cu IL-2/N88R pare a fi perturbarea
moderată gastrointestinală (GI) (emeza), cu toate că tratamentul nu induce toxicitate nomi-
nală în termenii parametrilor indicați în tabelul 4.

13 Greutatea corporală a grupului de PROLEUKIN a scăzut 6% din ziua 6 și a scăzut
la 10% în ziua 10 și a recuperat încet după aceea (vezi fig. 9). În contrast, grupurile de IL-
15 2/N88R și vehicul au avut doar 1-3% pierdere în greutate, cel mult.

Tabelul 5

Observații clinice*

Tratament	Stare generală	Pierderea apetitului	Letargie	GI	Stare de rău
IL-2/N88R	bună	1	1	2	1
PROLEUKIN	Grav bolnav	5	4/5	5	4/5
Vehicul	Normală	0	0	0	0

*Scală de la 0 la 5, unde 5 este cel mai sever

23 (a) *Hematologie.* IL-2/N88R a indus efecte celulare consecvente, cu activarea
25 PROLEUKIN, în special limfocitoză (fig. 10A), creșterea în leucocite (fig. 10B) și neutrofile
(fig. 10C) a fost observată, de asemenea. IL-2/N88R a indus numai o trombocitopenie margi-
27 nală (nadir de ~15%) comparativ cu PROLEUKIN (nadir de ~50%) pe durata perioadei de
tratament a studiului (fig. 10D).

29 (b) *Funcția renală.* Nivelurile BUN au fost, în mod marcant, mai mari în toate
animalele tratate cu PROLEUKIN în zilele 6 și 8 (fig. 11A). Nivelurile BUN au fost peste
31 130 mg/dL în două din aceste animale; nivelurile de creatinină au fost crescute, de aseme-
nea, în mod dramatic, în cele două animale atât în ziua 6, cât și în ziua 8 (fig. 11B), indicând
33 o încetare completă a funcției renale. În plus, atât fosforul seric, cât și hiatusul anionic au fost
crescuți, de asemenea, în grupul tratat cu PROLEUKIN, în zilele 6 și 8. În contrast, în toate
35 animalele tratate cu IL-2/N88R, acești parametri renali au rămas bazic normali pe tot
parcursul studiului (fig. 11 C&D).

37 (c) *Funcția hepatică.* Bilirubina totală a fost mai mult decât triplă în grupul de
PROLEUKIN în ziua 6 și a rămas ridicată până la ziua 10 (fig. 12A). În contrast, numai un
39 animal în grupul IL-2/N88R a avut o creștere minoră, vremelnică, în zilele 3 și 6. Nivelul
SGPT seric a crescut, în mod dramatic, și a atins valoarea de peste 100 U/L în toate anima-
41 lele PROLEUKIN în ziua 6 (fig. 12B). Nivelul SGPT în animalul numărul A199 a atins valoarea
de 651 U/L și SGOT valoarea de 2789 U/L (Lab. Note Book: NIRC # 8754-9852-Phase
43 II, Table 1 Individual and Group Mean Chemistry Values, page 17 of 21 of the table), indi-
când o insuficiență hepatică severă.

45 (d) *Coagulare.* Nivelul de fibrinogen a fost mai mult decât dublat atât în grupul
PROLEUKIN, cât și în grupul IL-2/N88R și a avut un peak în ziua 6 (fig. 12C). Creșterea pare
47 a se fi întâmplat mai devreme în grupul PROLEUKIN decât la animalele IL-2/N88R. Aceasta
este reflectată printr-o creștere de 51% față de 5% în ziua 3. Schimbările în fibrinogen pot
49 fi un rezultat al răspunsului de proteină acut, mai degrabă decât defecte de coagulare,

deoarece nu au existat schimbări semnificative în TTPA sau, în mod corespunzător în TP, pe durata aceleași perioade de timp. (fig. 12D). Cu toate acestea, începând din ziua 10, nivelul TTPA în animalele PROLEUKIN a arătat o evidentă tendință de creștere, deși valoarea absolută a rămas în interiorul domeniului normal. Aceeași tendință, deși la o extindere mai mică, a fost, de asemenea, observată în grupul IL-2/N88R. În mod interesant, totuși, nivelul de fibrinogen pare să fi avut o tendință de scădere în aceeași perioadă de timp, în mod corespunzător, în ambele grupuri.

(e) *Homeostaza*. Nivelurile de sodiu din ser au scăzut sub 135 MEQ/L în două din cele trei animale PROLEUKIN în ziua 8, însă a rămas normal la restul animalelor (fig. 13A). Nivelurile de clor în grupul PROLEUKIN au fost, de asemenea, reduse la sub 95 MEQ/L, începând cu ziua 3 și au rămas scăzute până în ziua 15 (fig. 13B). Nivelul de calciu a fost inferior în două din cele trei animale PROLEUKIN în zilele 6 și 8 și a coborât până la 4,9 și 3,1 mg/dL în animalul A 199 (fig. 13C). Nivelul de potasiu a scăzut la sub 3 MEQ/L din zilele 3 până la 12, în toate animalele tratate cu PROLEUKIN, cu excepția animalului A199, al cărui nivel de potasiu a crescut la un nivel toxic de 7,2 MEQ/L, înainte de a fi scos din studiu (fig. 13D).

(f) *Semne de exudare vasculară*. Nivelul de albumină din ser a scăzut atât în grupul PROLEUKIN (37%), cât și în grupul IL-2/N88R (19%) (fig. 14A). O creștere în nivelul hematocritului a fost observată în grupul PROLEUKIN în zilele 3 și 6 (fig. 14B). În contrast, nivelurile hematocritului atât în grupul de control vehicul, cât și în grupul IL-2/N8 8R au scăzut în timpul aceleași perioade de timp și au rămas mici, indicând o anemie moderată, care era de așteptat datorită recoltărilor multiple de probe de sânge (fig. 14 B&C). Creșterea hematocritului în grupul PROLEUKIN când este cuplată cu o descreștere în albumină este consecventă cu dezvoltarea unui sindrom de exsudare capilară.

3. Activare celulară

Eficacitatea pentru PROLEUKIN și IL-2/N88R a fost urmărită prin variația procentajului de limfocite pozitive CD25 (trafic + proliferare) și a valorii medii a fluorescenței pentru CD25 sau a numărului de antigeni CD25 exprimați la suprafața unei celule T date (CD25 = IL-2R de afinitate mică). Expresia CD25 a fost urmărită la nivelul populației totale de celule T (celule CD3+), precum și la nivelul populațiilor CD3+CD4+ și CD3+CD8+.

Activitatea IL-2 la nivelul celulelor Natural Killer (NK) a fost urmărită printr-o analiză a traficului celulelor NK CD3-CD16+ și al celulelor NK CD3-CD25+CD16+. Numerele absolute de celule CD3+, CD4+, CD8+, NK au fost determinate prin multiplicarea procentului de celule prin numărul de limfocite per mm³, date obținute în timpul analizei de hematologie.

(a) *Reglarea expresia lui CD25 la nivelul suprafeței celulelor T*. Procentul de celule T activate, așa cum a fost indicat de celulele pozitive CD25, a fost reglat în sus în funcțiune în ziua 6 a studiului, mai cu seamă la nivelul subpopulației de celule T CD3+CD4+. PROLEUKIN pare a induce expresia CD25 la nivelul unui procentaj mai mare de celule T CD3+ totale, și de subpopulații de celule T CD3+CD4+ și CD3+CD8+, în ziua 6. Cu toate acestea, din ziua 8, procentul de celule care exprimă antigenul CD25 a fost identic la nivelul limfocitelor de cimpanzei tratați cu PROLEUKIN și de cimpanzei tratați cu IL-2/N88R (fig. 15A, B și C). Nici o evidență pentru CD25 de suprafață în populația de celule Natural Killer (NK) nu a fost observată nici în cimpanzeii tratați cu PROLEUKIN nici în cimpanzeii tratați cu IL-2/N88R. Lipsa expresiei lui IL-2Ra (antigen țintit pentru colorarea suprafeței celulare prin CD25) la suprafața populației de celule NK selectate (CD3-/CD16+) este suspectată a fi responsabilă pentru aceste rezultate. Numărul absolut de celule T CD3+CD25+ a urmat un model similar ca procentajul de celule T CD3+CD25+, cu PROLEUKIN care apare mai activă decât IL-2/N88R (fig. 16A). IL-2/N88R a arătat un potențial de activare a celulelor T similar cu cel al PROLEUKIN la nivelul populației de celule T CD3+CD4+, deoarece reglarea de amplificare a numărului absolut de limfocite CD3+CD4+CD25+ indus

RO 122150 B1

1 de IL-2/N88R a fost identică cu reglarea de amplificare văzută cu PROLEUKIN (fig. 16B).
3 PROLEUKIN pare a crește numărul de celule T CD3+CD8+CD25+ la o extindere mai mare
5 decât IL-2/N88R (fig. 15C). Numărul de molecule CD25 (valoarea medie a fluorescenței)
7 exprimate la nivelul subpopulației de celule T CD3+CD4+ a urmat o cinetică identică fie cu
9 tratamentul cu PROLEUKIN, fie cu IL-2/N88R (fig. 17).

11 (b) *Trafic de limfocite: efectul tratamentului cu PROLEUKIN și cu IL-2/N88R.*
13 Activitățile pentru PROLEUKIN și IL-2/N88R la nivelul populațiilor de celule T și NK au fost
15 determinate prin analiza variației numărului absolut de limfocite care circulă înainte, în timpul
17 și după tratament (fig. 18). IL-2/N88R a apărut a avea o activitate mai mare decât
19 PROLEUKIN pentru creșterea numărului absolut de limfocite care circulă CD3+CD8+
21 (fig. 18B). Ambii compuși au avut un efect comparabil, cu toate că modest, de creștere a
23 numărului total de limfocite CD3+ (fig. 18C). Nici PROLEUKIN, nici IL-2/N88R nu au afectat
25 traficul celulelor NK (fig. 18 D).

C. Concluzii

27 IL-2/N88R a fost obținută printr-o triere a proteinelor IL-2 mutante în testele primare
29 de celule T și NK, umane. Ea arată *in vitro* selectivitate pentru celulele T față de celulele NK
31 de ~6.000 de ori. Bazat pe acest profil celular, a fost postulat că ea va induce numai efecte
33 secundare moderate când este administrată la o doză care ar provoca semnificativ activarea
35 celulelor T.

37 Experimentele în cimpanzei, comparând PROLEUKIN, cu IL-2/N88R, au confirmat
39 că IL-2/N88R are un profil de siguranță în mod semnificativ mai bun decât PROLEUKIN,
41 menținând în timp abilitatea comparabilă de a induce activarea celulelor T.

43 **Exemplul 8. Eficiența agonistului selectiv N88R de IL-2, în modelul tumoral de
45 metastaze pulmonare CT-2 6 la rozătoare**

47 *Mod de lucru:* Șoareci (Balb/c, femele de 6-8 săptămâni) au fost injectate intravenos
49 (IV) cu 1×10^5 de celule CT-26 (carcinoma de colon de rozătoare) în 0,2 ml PBS în vena
laterală a cozii în ziua 0. Tratamentul a fost cu PROLEUKIN sau IL-2/N88R la doze diferite
(diluante: dextroză 5% în apă (D5W)), sau D5W, administrate IV, o dată pe zi, timp de 8 zile
(QD x 8), începând cu ziua 1 după implantare. IL-2/N88R a fost preparată la temperatura
camerei prin diluare în D5W, utilizând fiole siliconizate, folosind o seringă de tuberculină și
dozată la animale în decursul a 2 h de la preparare. PROLEUKIN a fost preparată prin adău-
garea 0,7 ml apă sterilă pentru injecție (SWFI) la fiecare fiolă (concentrația finală,
1,86 mg/ml). Diluțiile au fost făcute așa cum au fost descrise pentru IL-2/N88R în D5W
(tabelul 6).

Animalele au fost sacrificate în ziua 11. Plămânii au fost scoși și cântăriți, clătiți în
PBS și țesutul transferat în soluție Bouin. 24 h mai târziu, țesutul a fost transferat în formalină
10%. Numărul de colonii metastatice pulmonare a fost numărat sub un microscop de
disecție.

Tabelul 6

Doză și grupuri în studiul de model tumoral CT-2 6 la rozătoare

Grupuri	N	Tratament	Doză, mg/kg
1	14	D5W	NA
2	11	PROLEUKIN	3 mg/kg
3	11	PROLEUKIN	10 mg/kg
4	11	IL-2/N88R	1 mg/kg
5	12	IL-2/N88R	3 mg/kg
6	12	IL-2/N88R	10 mg/kg
7	12	IL-2/N88R	30 mg/kg
8	11	IL-2/N88R	60 mg/kg

RO 122150 B1

Tabelul 7 arată numărul de metastaze numărate în șoareci, individual. Eficiență comparabilă a fost observată atât pentru IL-2/N88R, cât și pentru PROLEUKIN. La doza ridicată de IL-2/N88R (grup 8, 60 mg/kg), toți, cu excepția unui șoarece, au avut 12 metastaze sau mai puțin; 3 dintre șoareci nu au arătat nici o metastază. Aceasta este în contrast cu cea mai ridicată doză de PROLEUKIN testată, unde toți șoarecii care au supraviețuit au avut 12 metastaze sau mai mult.

Tabelul 7

Numărări de metastaze individuale și valori medii

Grup	Metastaze în plămân (sunt prezentate numărări pentru șoareci, individual)	Medie	SEM	Valoare P (2-cozi)
1	0 129 183 179 155 165 200 152 148 158 200 194 165 125	154	13,4 2	
2	118 126 107 111 118 110 137 114 135 158 132	124	4,61	0,07278
3	12 36 16 19 30	23	4,66	0,00003
4	169 173 189 200 120 117 136 122 200 163 110	154	10,4 1	0,97029
5	171 176 186 159 192 139 117 200 195 116 192	168	9,31	0,43401
6	92 111 112 114 109 84 68 47 58 49 112	87	8,16	0,00060
7	15 13 59 62 23 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

Reducerea semnificativă ($P < 0,05$) în metastaze a fost văzută la șoareci tratați cu IL-2/N88R la doze de 10, 30 și 60 mg/kg (grupurile 6, 7 și respectiv 8) și în grupul tratat cu 10 mg/kg PROLEUKIN (grupul 3). Aceste rezultate sunt arătate grafic în fig. 19. Datele sunt reprezentate folosind logaritmul dozei: pentru PROLEUKIN dozele au fost de 3 și 10 mg/kg; pentru IL-2/N88R dozele au fost de 1, 3, 10, 30 și 60 mg/kg.

Fitarea curbelor utilizând o ecuație neliniară (fitare de 4 parametri) a dat valorile CI_{50} de 5,2 mg/kg pentru PROLEUKIN și 10,9 mg/kg pentru IL-2/N88R.

Din datele acestui experiment, valoarea CI_{50} cu referire la reducerea numărului de metastaze pentru IL-2/N88R a fost calculată ca fiind 10,9 mg/kg (8,6-13,9 mg/kg la 95% nivel de încredere) și pentru PROLEUKIN ca fiind 5,2 mg/kg (3,5-7,7 mg/kg la 95% nivel de încredere).

Supraviețuirea șoarecilor este arătată în tabelul 8. În grupul PROLEUKIN 10 mg/kg, un (1) șoarece a murit în ziua 7 și încă 5 (5) în ziua 8. Un (1) șoarece a murit în ziua 8, în fiecare dintre grupurile tratate cu 3 sau 10 mg/kg IL-2/N88R și niciun deces nu a fost observat fie la 1, 30, fie la 60 mg/kg IL-2/N88R.

În plus, cei mai mulți șoareci tratați cu 3 mg/kg PROLEUKIN și toți șoarecii tratați cu 10 mg/kg PROLEUKIN au fost muribunzi; nici o morbiditate nu a fost observată la șoareci tratați cu IL-2/N88R.

Tabelul 8

Supraviețuirea șoarecilor tratați cu IL-2/N88R sau PROLEUKIN

Grup	Ziua			
	0	7 ⁴	8	11
D5W ¹	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Pro: 3 mg/kg ²	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Pro: 10 mg/kg ²	100,0%	90,9%	45,5%	45,5%
IL-2/N88R: 1 mg/kg ²	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabelul 8 (continuare)

Grup	Ziua			
	0	7 ⁴	8	11
IL-2/N88R: 10 mg/kg ³	100,0%	100,0%	91,7%	91,7%
IL-2/N88R: 30 mg/kg ³	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
IL-2/N88R: 60 mg/kg ²	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

¹n = 14 șoareci/grup

²n = 11 șoareci/grup

³n = 12 șoareci/grup

⁴Niciun deces nu a fost observat înainte de ziua 7.

Animalele tratate cu PROLEUKIN din ambele grupuri au fost muribunde. Nici o morbiditate nu a fost observată la nici unul dintre animalele tratate cu IL-2/N88R.

În rezumat, aceste studii indică faptul că IL-2/N88R este tot atât de eficientă ca și PROLEUKIN la reducerea greutatei tumorii (ca măsurată prin numărarea metastazelor pulmonare în modelul CT26). În plus, IL-2/N88R a fost arătat a fi în mod substanțial mai puțin toxică decât PROLEUKIN.

Exemplul 9. Dezvoltarea liniilor celulare CHO stabile, de mare productivitate, care exprimă IL-2/N88R

Linii celulare de producție stabilă, care secretă cantități mari de muteină IL-2/N88R, au fost dezvoltate prin transfecția celulelor CHO(dhfr-) cu vectorul de expresie arătat în fig. 20. Elementele individuale ale vectorului de expresie IL-2/N88R sunt arătate în harta plasmidică (fig. 20). Reprezentarea indică CMV-e/p = promotor precoce de citomegalovirus; PA = secvență semnal de poliadenilare a SV40; și DHFR = casetă de expresie a dihidrofolatreductază.

Vectorul a fost construit utilizând tehnicile de ADN recombinant standard. Vezi, în general, Sambrook și alții, *Molecular Cloning* 2d ed., 1989, Cold Spring Harbor Press; *Short Protocols in Molecular Biology*, 2d ed., 1992, John Wiley & Son; *Methods in Enzymology* vol.185, Ed. Goeddel et al., Academic Press, Inc., London, 1991. Vectorul de expresie conține casetele de expresie discretă pentru gena IL-2/N88R și gena DHFR (dihidrofolatreductaza) selectabilă și amplificabilă.

Aproximativ 1×10^6 celule CHO (ovar de hamster chinezesc) au fost transfectate cu 10 μ g de pBCHL2SA, utilizând reactivi Lipofectin (Life Technology Inc. Bethesda, Maryland), conform instrucțiunilor furnizorului. Celulele au fost apoi selectate în prezență de metotrexat 50 nM și crescute în medii DME/F12 (Life Technology Inc.) deficiente în timidină și hipoxantină plus 5% de ser bovin fetal dializat. Populațiile de celule au fost triate pentru producția de IL-2/N88R cu un set ELISA comercial (R & D Systems). Populațiile de mare productivitate au fost selectate suplimentar în medii care conțin concentrații crescătoare de metotrexat (100 până la 400 nM metotrexat) și triate pentru producția de IL-2/N88R. A fost aplicată apoi clonarea cu diluție limitantă, pentru a obține clonele cu productivitate stabilă și mare. Clonarea a fost făcută în absență de metotrexat, utilizând tehnicile de cultură tisulară standard.

Exemplul 10. Producția fără ser a IL-2/N88R într-un bioreactor cu perfuzie

Producția continuă a IL-2/N88R a fost făcută prin fermentație cu perfuzie continuă. Un fermentator Wheaton de 19 l a fost inoculat cu linia celulară CHO stabilă din exemplul 9, la 2×10^6 celule/ml și perfuzat la o viteză de schimb a mediului de 5 l/zi. Mediul de producție a fost un mediu pe bază de DME/F12 (Life Technologies, Inc., Rockville, MD) suplimentat cu insulină umană recombinantă (10 μ g/ml) (HUMULIN™, Eli Lilly, Inc., Indianapolis, IN) și FeSO₄@DTA (50 μ M). Densitatea de celule a fost menținută la 4×10^6 celule/ml. Randamentul zilnic mediu al fermentatorului a fost ~200 mg/zi. Producția de IL-2/N88R a fost menținută în mod stabil timp de 30 de zile.

RO 122150 B1

Exemplul 11. Purificarea IL-2/N88R produsă în celule CHO	1
Procedura care urmează a fost aplicată la eluatul de perfuzie descris mai sus. Mediul de perfuzie a fost recoltat și aplicat pe o coloană cu S-Sepharose. Coloana a fost echilibrată cu tampon fosfat 20 milimolar cu NaCl 5 milimolar la pH 7,0. Alimentarea ("TCF") este ajustată la conductivitatea de 4 milisiemens, prin adăugare de apă și ajustată la același pH, cu acid fosforic.	3
După ce TCF este încărcată, coloana este spălată cu același tampon de echilibrare. Eluția este însoțită de o deplasare de pH. Muteinele au fost eluate cu etanolamină 20 mM, pH 10,5, pentru a spăla muteinele din coloană, pentru a produce eluatul S.	5
Schimbul anionic a fost realizat prin trecerea eluatului S printr-o coloană QAE Fast Flow™ (Pharmacia) echilibrată cu tampon bicarbonat 10 mM la pH 10,5. Viteza de curgere a fost menținută la 250 cm/h. După spălare la linia de bază, IL-2SA a fost eluată cu fosfat 20 mM, pH 4,0.	7
Cromatografia cu hidroxiapatit (HAP) a fost realizată prin trecerea eluatului QAE diluat (1:1 cu WFI) peste o coloană umplută cu hidroxiapatit ceramic (Type II, Bio-Rad, Hercules, CA) echilibrată cu fosfat 0,10 mM la pH 7,0. Viteza de curgere a fost menținută la 250 cm/h. După spălare la linia de bază, IL-2SA a fost eluată cu fosfat 100 mM, la pH 7,0.	9
Eluatul de la hidroxiapatit a fost ultrafiltrat la un volum de 300 ml, cu o unitate Millipore Pelicon-2 echipată cu trei cartușe PES 5K (Millipore Corporation, Bedford, MA).	11
Eluatul HAP ultrafiltrat a fost purificat suplimentar prin trecerea peste o coloană de excluziune dimesională S100HR (Pharmacia) la 35 cm/h. Coloana a fost echilibrată cu fosfat 10 mM și NaCl 150 mM, pH 7,0.	13
Rezultatul filtrării pe gel a fost diluat cu WFI, pentru a atinge o conductivitate de 4,0 mMhos/cm, și a fost reîncărcat pe coloana cu S-Sepharose, în condițiile descrise anterior. IL-2SA a fost eluat cu tampon fosfat 10 mM cu NaCl 1 M, la pH 7,0.	15
Rezultatul după schimbul cationic final a fost dializat cu ser fiziologic tamponat cu fosfat (PBS) peste noapte și diluat cu PBS steril, la o concentrație de 6 mg/ml. Lichidul diluat final a fost apoi filtrat steril, divizat și apoi înghețat la -70°C. Recuperarea totală a fost de 65%.	17
Alte realizări ale invenției vor deveni evidente persoanelor calificate în domeniu. Această invenție dă indicații cum să se obțină muteine, care nu sunt, în mod specific, descrise aici, dar care determină activarea celulelor T evidențiată prin proliferarea blastilor-PHA și prin proliferarea redusă a celulelor NK și prin aceasta acele muteine intră în spiritul și sfera invenției. Conceptul și abordarea experimentală descrise aici vor fi aplicabile la alte citokine, folosind sisteme de receptori multimerici heterologi, în special citokine înrudite IL-7, IL-9 și IL-15, IL-10, interferon α și interferon γ .	19
	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
SECVENȚE	
Secvențele care urmează sunt conținute în această cerere de brevet:	39
SECV ID NR: 1: hIL-2 (aminoacid)	
SECV ID NR: 2: hIL-2 (ADNc)	41
SECV ID NR: 3: Primer PCR 5', IL-2	
SECV ID NR: 4: Primer PCR 3', IL-2	43
SECV ID NR: 5: Primer de mutagenază pentru vector de expresie IL-2	
SECV ID NR: 6: Primer de mutagenază pentru mutații D20X	45
SECV ID NR: 7: Primer de mutagenază pentru mutații N88X	
SECV ID NR: 8: Primer de mutagenază pentru mutații Q126X	47

RO 122150 B1

LISTĂ DE SECVENȚE

1	
3	<110> Shanafelt, Armen B. Greve, Jeffrey M.
5	Jesmok, Gary Lembach, Kenneth J.
7	Wetzel, Gayle D.
	<120> Agoniști și antagoniști selectivi de IL
9	<130> Indexuri' 1-8 de secvențe de IL-2
	<140>
11	<141>
	<150> 09/080.080
13	<151> 1998-05-15
	<160> 8
15	
	<170> PatentIn Ver. 2.0
17	
	<210> 1
19	<211> 133
	<212> PRT
21	<213> Homo sapiens
	<400> 1
23	

RO 122150 B1

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	1
1				5				10						15		3
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	5
			20					25					30			7
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	9
		35					40					45				11
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	13
	50					55					60					15
Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	17
65					70					75					80	17
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	19
				85					90					95		21
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	23
			100					105					110			23
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	25
		115					120					125				27
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr												29
	130															31
<210> 2																33
<211> 465																35
<212> ADN																37
<213> Homo sapiens																39
<400> 2																39
atgtacagga tgcaactcct gtcttgcat gactaagtc ttgcactgt cacaaca																41
gt 60																41
gcacctact caagttctac aaagaaaca cagctacaac tggagcattt actgctgg																41

RO 122150 B1

1 at 120
ttacagatga tttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgc
3 te 180
acatttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca ggtctag
5 aa 240
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttact
7 ta 300
agaccagggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctg
9 aa 360
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaaca
11 ga 420
tggattacct tttgcaaag catcatctca aactgactt gataa
13 465

15 <210> 3
<211> 30
17 <212> ADN
<213> Homo sapiens

19
21 <400> 3
cctcaactcc tgaattcatg tacaggatgc
30

23
25 <210> 4
<211> 31
<212> ADN
27 <213> Homo sapiens

29 <400> 4
ggaagcggat ccttatcaag tcagtgttga g
31 31

33 <210> 5
<211> 36
35 <212> ADN
<213> Homo sapiens

37
39 <400> 5
gcactgtca caaacacat ggcacctact tcaagt
36

41
43 <210> 6
<211> 28
<212> ADN
45 <213> Homo sapiens

47 <400> 6
ggagcattta ctgctgnnt tacagatg
49 28

RO 122150 B1

<210> 7	1
<211> 30	
<212> ADN	3
<213> Homo sapiens	
	5
<400> 7	
gggacttaat cagcnnnatc aacgtaat.	7
30	
	9
<210> 8	
<211> 28	11
<212> ADN	
<213> Homo sapiens	13
<400> 8	15
ggattacctt ttgtnhnagc atcatctc	
28	17
(2) INFORMAȚII PENTRU SECV ID NR: 1:	19
(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:	
(A) LUNGIME: 133	21
(B) TIP: aminoacid	
(C) NUMĂR DE CATENE: una	23
(D) TOPOLOGIE: liniară	
(ii) TIP DE MOLECULĂ : proteină	25
(A) DESCRIERE: proteină Interleukină-2 umană, secvență matură	
(iii) IPOTETIC: nu	27
(iv) ANTI-SENS: nu	
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV ID NR: 1:	29

RO 122150 B1

1 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
3 1 5 10 15
5 His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn
7 20 25 30
9 Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr
11 35 40 45
13 Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Ieu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
15 50 55 60
17 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser
19 65 70 75
21 Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn
23 80 85 90
25 Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
27 95 100 105
29 Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg
31 110 115 120
33 Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
35 125 130
37

(2) INFORMAȚII PENTRU SECV ID NR: 2:

39 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 465

41 (B) TIP: nucleotidă

(C) NUMĂR DE CATENE: două

43 (D) TOPOLOGIE: liniară

(ii) TIP DE MOLECULĂ: nucleotidă

45 (A) DESCRIERE: ADNc de interleukină-2 umană, incluzând peptidă semnal și doi codoni stop terminali

47 (iii) IPOTETIC: nu

(iv) ANTI-SENS: nu

RO 122150 B1

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV ID NR: 2:	1
ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT TGC ATT GCA CTA AGT CTT GCA CTT 48	3
Met Tyr Arg Met Gin Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu	5
GTC ACA AAC AGT GCA CCT ACT TCA AGT TCT ACA AAG AAA ACA CAG CTA 96	7
Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gin Leu	9
CAA CTG GAG CAT TTA CTG CTG GAT TTA CAG ATG ATT TTG AAT GGA ATT 144	11
Gin Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gin Met Ile Leu Asn Gly Ile	13
AAT AAT TAC AAG AAT CCC AAA CTC ACC AGG ATG CTC ACA TTT AAG TTT 192	15
Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe	17
TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACA GAA CTG AAA CAT CTT CAG TGT CTA GAA 240	19
Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gin Cys Leu Glu	21
GAA GAA CTC AAA CCT CTG GAG GAA GTG CTA AAT TTA GCT CAA AGC AAA 288	23
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gin Ser Lys	25
AAC TTT CAC TTA AGA CCC AGG GAC TTA ATC AGC AAT ATC AAC GTA ATA 336	27
Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile	29
GTT CTG GAA CTA AAG GGA TCT GAA ACA ACA TTC ATG TGT GAA TAT GCT 384	31
Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala	33
GAT GAG ACA GCA ACC ATT GTA GAA TTT CTG AAC AGA TGG ATT ACC TTT 432	35
Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe	37
TGT CAA AGC ATC ATC TCA ACA CTG ACT TGA TAA 465	39
Cys Gin Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr STP STP	41
(2) INFORMAȚII PENTRU SECV ID NR: 3:	
(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:	43
(A) LUNGIME: 30	
(B) TIP: nucleotidă	45
(C) NUMĂR DE CATENE: una	
(D) TOPOLOGIE: liniară	47
(ii) TIP DE MOLECULĂ: nucleotidă	

RO 122150 B1

- 1 (A) DESCRIERE: Primer PCR 5', IL-2
(iii) IPOTETIC: nu
3 (iv) ANTI-SENS: nu
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV ID NR: 3:

5 CCTCAACTCC TGAATTCATG TACAGGATGC

7 (2) INFORMAȚII PENTRU SECV ID NR: 4:

9 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 31
11 (B) TIP: nucleotidă
(C) NUMĂR DE CATENE: una
13 (D) TOPOLOGIE: liniară

(ii) TIP DE MOLECULĂ: nucleotidă

- 15 (A) DESCRIERE: Primer PCR 3', IL-2
(iii) IPOTETIC: nu
17 (iv) ANTI-SENS: nu
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV ID NR: 4:

19 GGAAGCGGAT CCTTATCAAG TCAGTGTTGA G

21 (2) INFORMAȚII PENTRU SECV ID NR: 5:

23 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 36
25 (B) TIP: nucleotidă
(C) NUMĂR DE CATENE: una
27 (D) TOPOLOGIE: liniară

(ii) TIP DE MOLECULĂ: nucleotidă

- 29 (A) DESCRIERE: Primer de mutageneză pentru vector de expresie IL-2
(iii) IPOTETIC: nu
31 (iv) ANTI-SENS: nu
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV ID NR: 5:

33 GCACTTGTCA CAAACACCAT GGCACCTACT TCAAGT 36

35 (2) INFORMAȚII PENTRU SECV ID NR: 6:

37 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

- (A) LUNGIME: 28
39 (B) TIP: nucleotidă
(C) NUMĂR DE CATENE: una
41 (D) TOPOLOGIE: liniară

(ii) TIP DE MOLECULĂ: nucleotidă

- 43 (A) DESCRIERE: Primer de mutageneză pentru mutații D20X
(iii) IPOTETIC: nu
45 (iv) ANTI-SENS: nu
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV ID NR: 6:

47 GGAGCATTTA CTGCTGNNNT TACAGATG

28

RO 122150 B1

(2) INFORMAȚII PENTRU SECV ID NR: 7:	1
(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:	
(A) LUNGIME: 30	3
(B) TIP: nucleotidă	
(C) NUMĂR DE CATENE: una	5
(D) TOPOLOGIE: liniară	
(ii) TIP DE MOLECULĂ: nucleotidă	7
(A) DESCRIERE: Primer de mutageneză pentru mutații N88X	
(iii) IPOTETIC: nu	9
(iv) ANTI-SENS: nu	
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV ID NR: 7:	11
 GGGACTTAAT CAGCNNNATC AACGTAATAG 30	13
 (2) INFORMAȚII PENTRU SECV ID NR: 8:	15
(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:	
(A) LUNGIME: 28	17
(B) TIP: nucleotidă	
(C) NUMĂR DE CATENE: una	19
(D) TOPOLOGIE: liniară	
(ii) TIP DE MOLECULĂ: nucleotidă	21
(A) DESCRIERE: Primer de mutageneză pentru mutații Q126X	
(iii) IPOTETIC: nu	23
(iv) ANTI-SENS: nu	
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI SECV ID NR: 8:	25
 GGATTACCTT TTGTNNNAGC ATCATCTC 28	

RO 122150 B1

1
seq 1. t x t
3
5
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
7 1 5 10 15
9
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn
11 20 25 30
13
Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr
15 35 40 45
17
Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
19 50 55 60
21
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser
23 65 70 75
25
Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn
27 80 85 90
29
Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
31 95 100 105
33
Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg
35 110 115 120
37
Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
39 125 130

RO 122150 B1

seq 2. txt 1

ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT TGC ATT GCA CTA AGT CTT GCA CTT 3
48

GTC ACA AAC AGT GCA CCT ACT TCA AGT TCT ACA AAG AAA ACA CAG CTA 5
96

CAA CTG GAG CAT TTA CTG CTG GAT TTA CAG ATG ATT TTG AAT GGA ATT 7
144

AAT AAT TAC AAG AAT CCC AAA CTC ACC AGG ATG CTC. ACA TTT AAG TTT 9
192

TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACA GAA CTG AAA CAT CTT CAG TGT CTA GAA 240 11
GAA GAA CTC AAA CCT CTG GAG GAA GTG CTA AAT TTA GCT CAA AGC AAA 288

AAC TTT CAC TTA AGA CCC AGG GAC TTA ATC AGC AAT ATC AAC GTA ATA 13
336

GTT CTG GAA CTA AAG GGA TCT GAA ACA ACA TTC ATG TGT GAA TAT GCT 15
384

GAT GAG ACA GCA ACC ATT GTA GAA TTT CTG AAC AGA TGG ATT ACC TTT 17
432

TGT CAA AGC ATC ATC TCA ACA CTG ACT TGA TAA 19
465

seq 3.txt 21

CCTCAACTCC TGAATTCATG TACAGGATGC 30 23

seq 4.txt 25

GGAAGCGGAT CCTTATCAAG TCAGTGTTGA G 31 27

seq 5. t x t 29

GCACTTGTCA CAAACACCAT GGCACCTACT TCAAGT 36

seq 6. t x t 31

GGAGCATTTA CTGCTGNNNT TACAGATG 28 33

seq 7.txt 35

GGACTTAAT CAGCNNNATC AACGTAATAG 30

seq 8.txt 37

GGATTACCTT TTGTNNNAGC ATCATCTC 28 39

Revendicări

1. Polipeptidă care cuprinde o muteină de interleukină-2 (IL-2) umană numerotată în conformitate cu IL-2 de tip sălbatic, în care respectiva muteină IL-2 umană este substituită față de tipul sălbatic la cel puțin o poziție 20, 88 sau 126, în care o substituție la poziția 20 este selectată dintre izoleucină sau histidină și în care substituția la poziția 88 este selectată dintre arginină sau izoleucină sau glicină și în care o substituție la poziția 126 este leucină, în care respectiva muteină activează în mod preferat celulele T în locul celulelor Natural Killer. 41 43 45 47

RO 122150 B1

1 2. Polinucleotidă care cuprinde o secvență ADN care codifică o polipeptidă din
revendicarea 1 și variante degenerative ale acestora.

3 3. Celulă gazdă procariotă transformată cu polinucleotida definită în revendicarea 2.

4. Vector de exprimare care cuprinde polinucleotida definită în revendicarea 2.

5 5. Utilizare a polipeptidei definite în revendicarea 1, pentru prepararea unei compoziții
farmaceutice care poate fi administrată unui mamifer care suferă de o afecțiune care poate
7 fi tratată cu IL-2.

6. Utilizare conform revendicării 5, în care respectiva afecțiune care poate fi tratată
9 cu IL-2 este selectată dintr-un grup care constă din HIV, cancer care include carcinom renal
și melanom malign, boală autoimună, boală infecțioasă, deficiență imună care include SCID
11 sau alte aplicații terapeutice care necesită stimularea generală a sistemului imun.

7. Metodă pentru selectarea muteinelor de IL-2 care activează în mod preferențial
13 celulele T în locul celulelor Natural Killer, prin evaluare în teste care utilizează IL-2R $\alpha\beta\gamma$ în
comparație cu IL-2R $\beta\gamma$, în care activitatea unei muteine de IL-2 este crescută față de IL-2 de
15 tip sălbatic într-un test preferențial față de celălalt, metoda cuprinzând următoarele etape:

17 - procurarea unui tip de celule care poartă IL-2 $\alpha\beta\gamma$ și a unui tip de celule care poartă
IL-2R $\beta\gamma$,

19 - contactarea tipului de celule menționat care poartă IL-2R $\alpha\beta\gamma$ cu o muteină IL-2 și
măsurarea activității muteinei IL-2 menționate comparativ cu cea a IL-2 de tip sălbatic, într-un
prim test,

21 - contactarea tipului de celule menționat care poartă IL-2R $\alpha\beta\gamma$ cu o muteină IL-2
menționată și măsurarea activității acestei muteine IL-2 comparativ cu cea a IL-2 de tip
23 sălbatic, într-un al doilea test,

25 - compararea activității rezultate din primul test cu activitatea rezultată în al doilea
test, și

27 - selectarea muteinei IL-2 menționate, dacă activitatea rezultată în primul test este
mai mare ca activitatea rezultată într-un al doilea test.

8. Metodă în conformitate cu revendicarea 7, în care IL-2R $\alpha\beta\gamma$ și IL-2R $\beta\gamma$ sunt
29 ectodomenii de subunitate de receptor individuale, în combinație adecvată și sunt utilizate
pentru a măsura direct legarea muteinelor IL-2 la fiecare complex receptor.

9. Metodă în conformitate cu revendicarea 7, în care primul test utilizează un răspuns
31 de la un tip de celulă care poartă IL-2 $\alpha\beta\gamma$, iar al doilea test utilizează un răspuns de la un tip
de celulă care poartă IL-2 $\beta\gamma$.

10. Metodă în conformitate cu revendicarea 9, în care celula care poartă IL-2 $\alpha\beta\gamma$ este
35 o celulă blastică PHA, iar celula care poartă IL-2 $\beta\gamma$ este o celulă NK.

11. Metodă în conformitate cu revendicarea 10, în care activitatea este reprezentată
37 de proliferarea atât pentru tipul de celule care poartă IL-2 $\alpha\beta\gamma$, cât și pentru tipul de celule
care poartă IL-2 $\beta\gamma$.

RO 122150 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

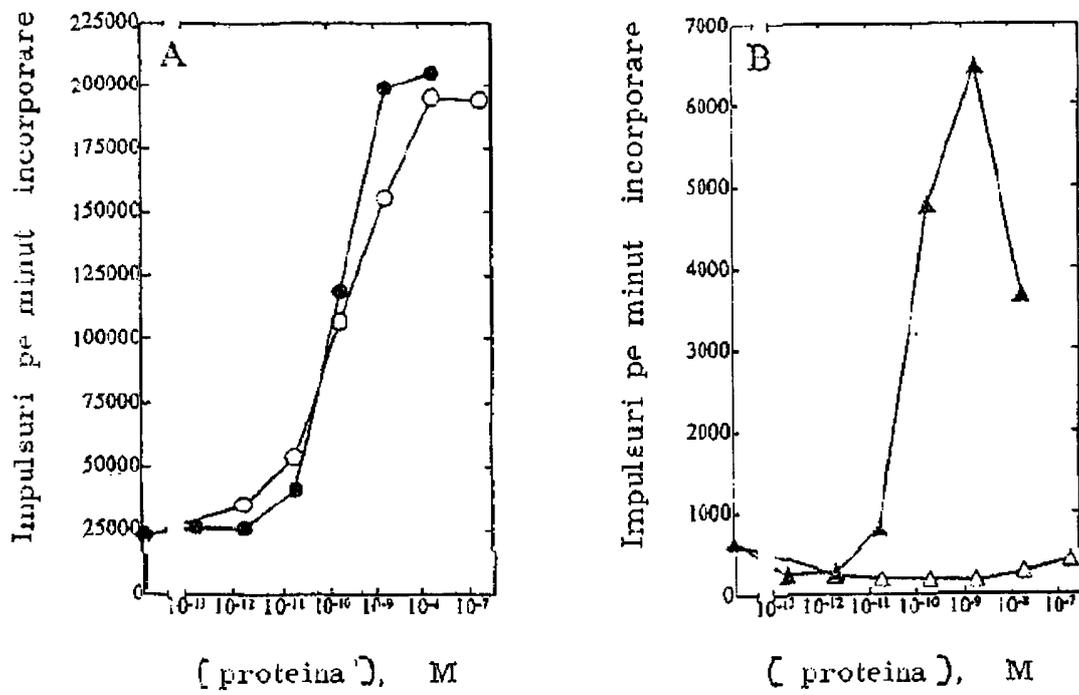


Fig. 1

(51) Int.Cl.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

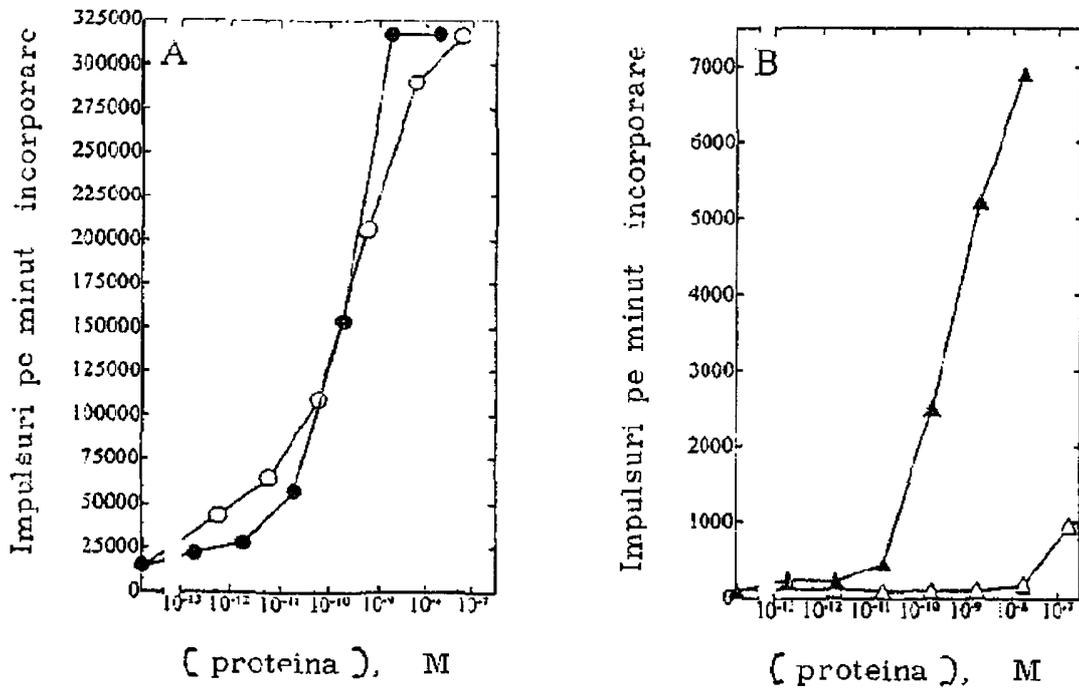


Fig. 2

RO 122150 B1

(51) Int.CI.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

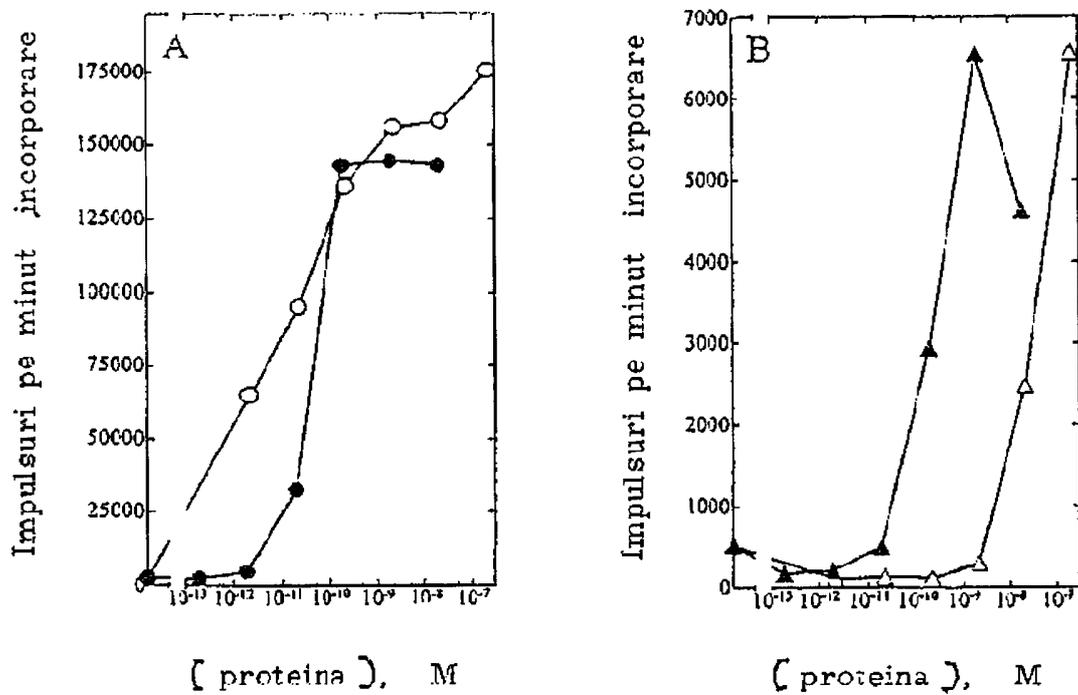


Fig. 3

(51) Int.CI.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

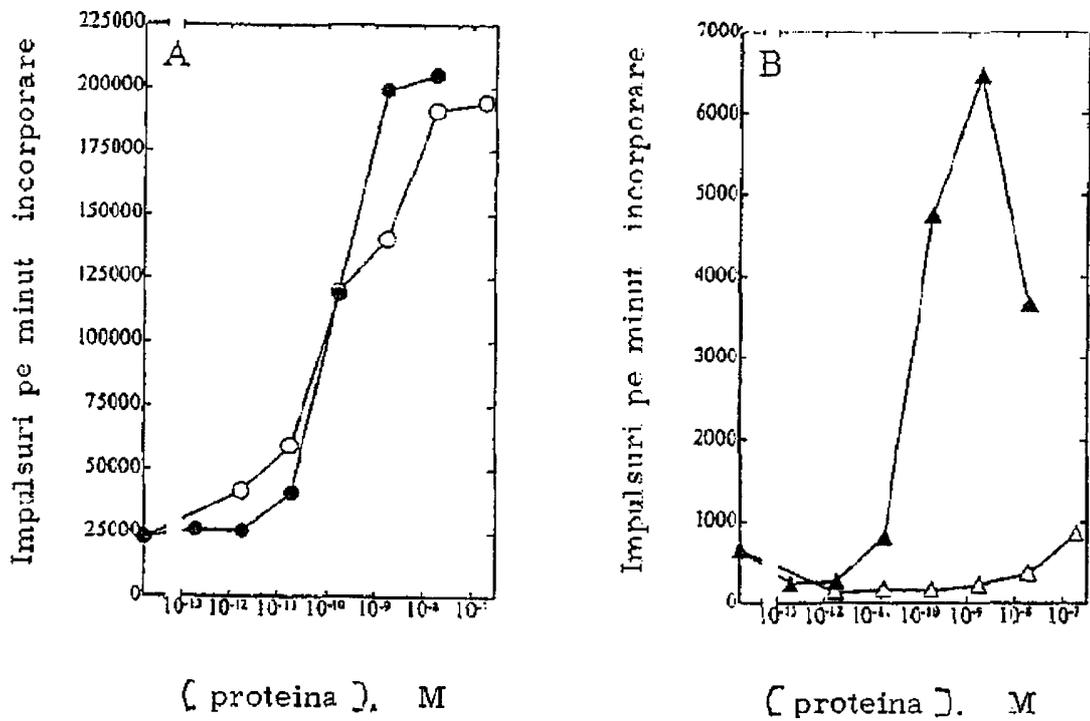


Fig. 4

RO 122150 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

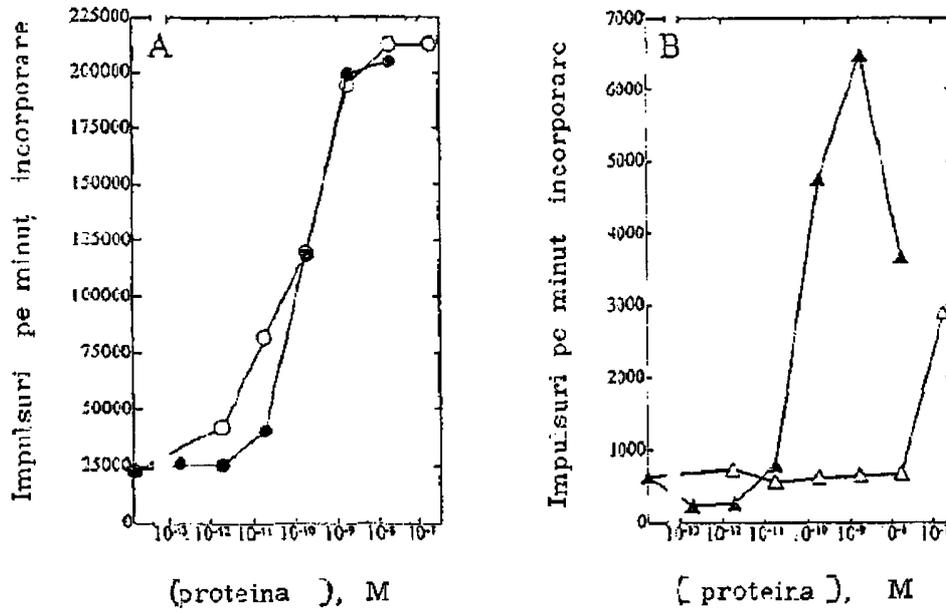


Fig. 5

(51) Int.Cl.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

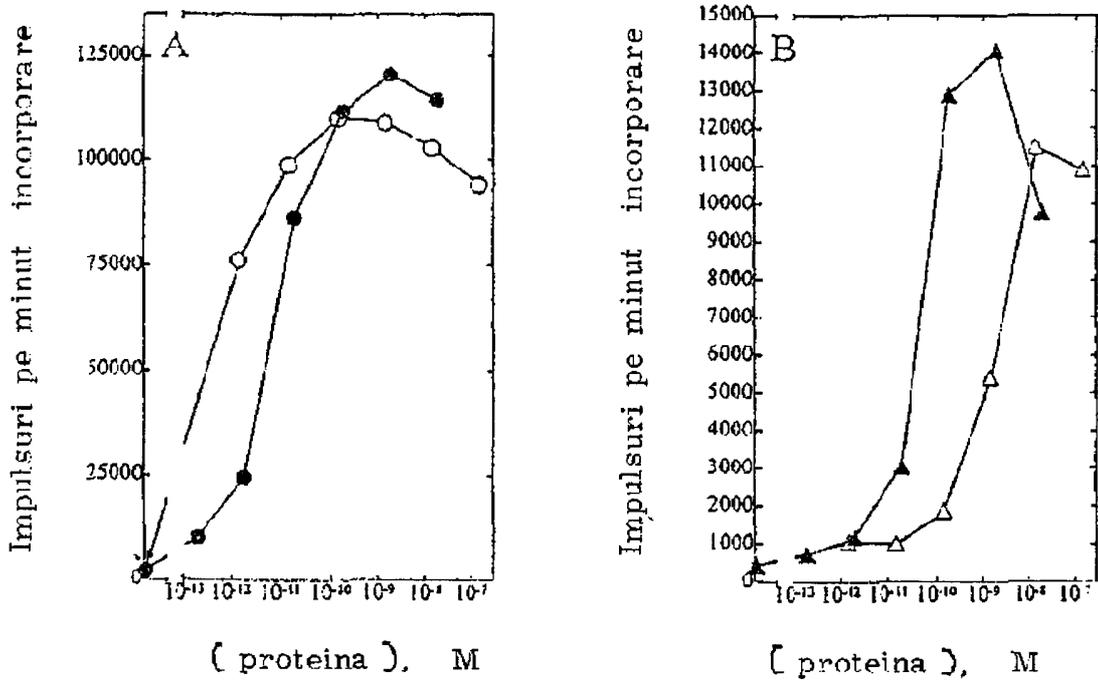


Fig. 6

RO 122150 B1

(51) Int.CI.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

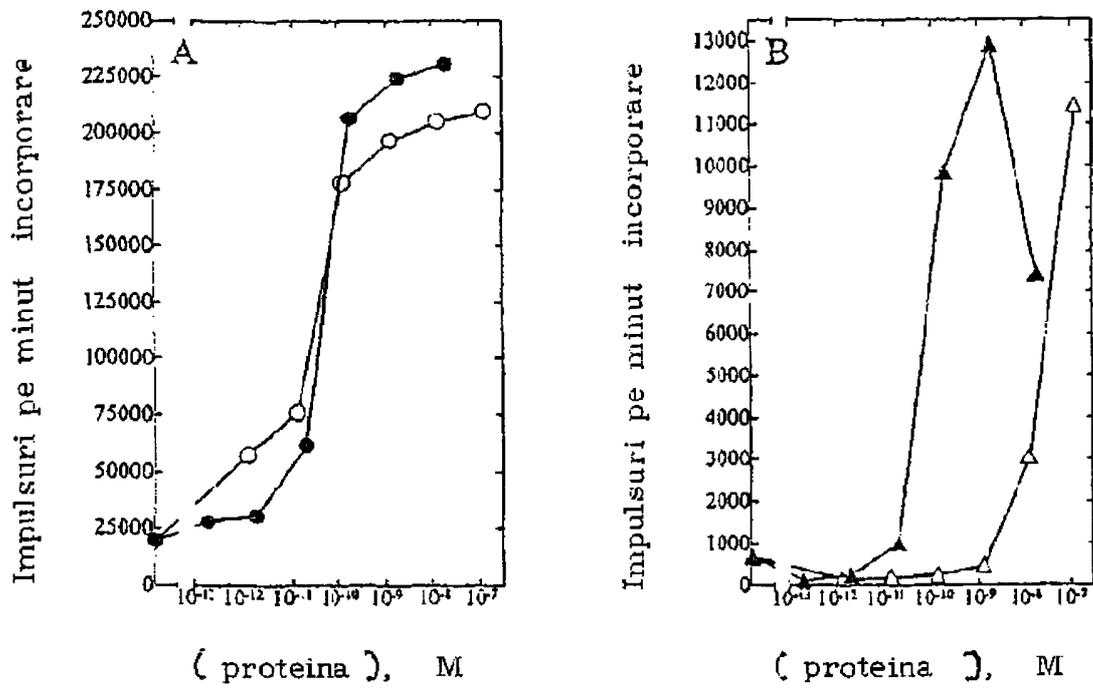


Fig. 7

RO 122150 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

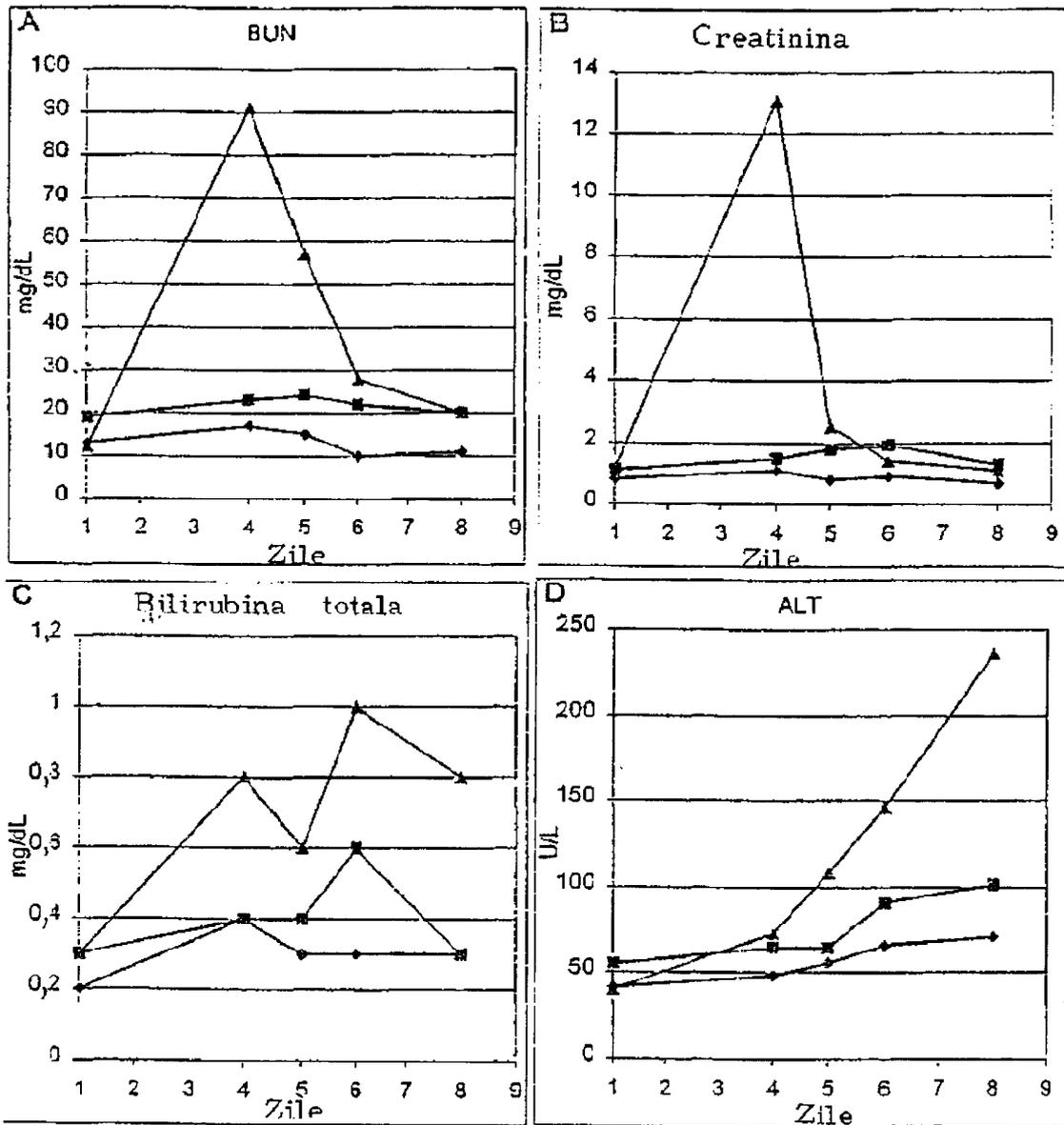


Fig. 8

RO 122150 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

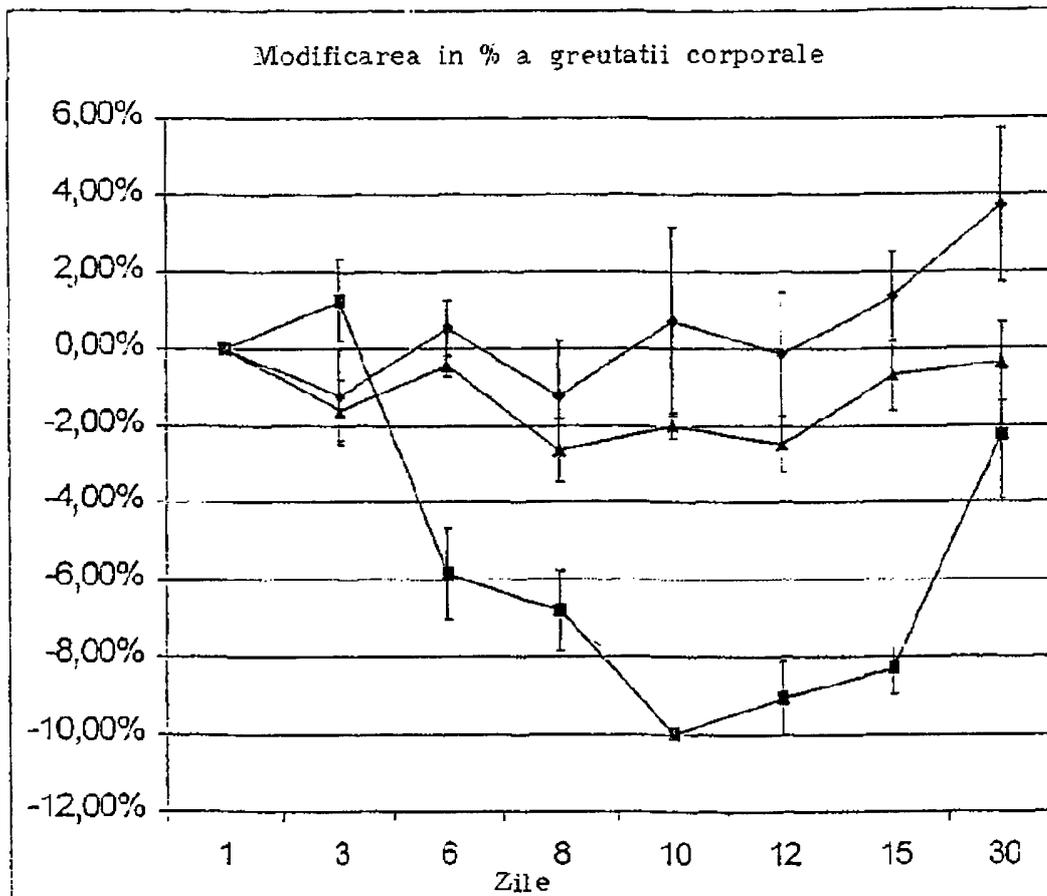


Fig. 9

(51) Int.CI.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

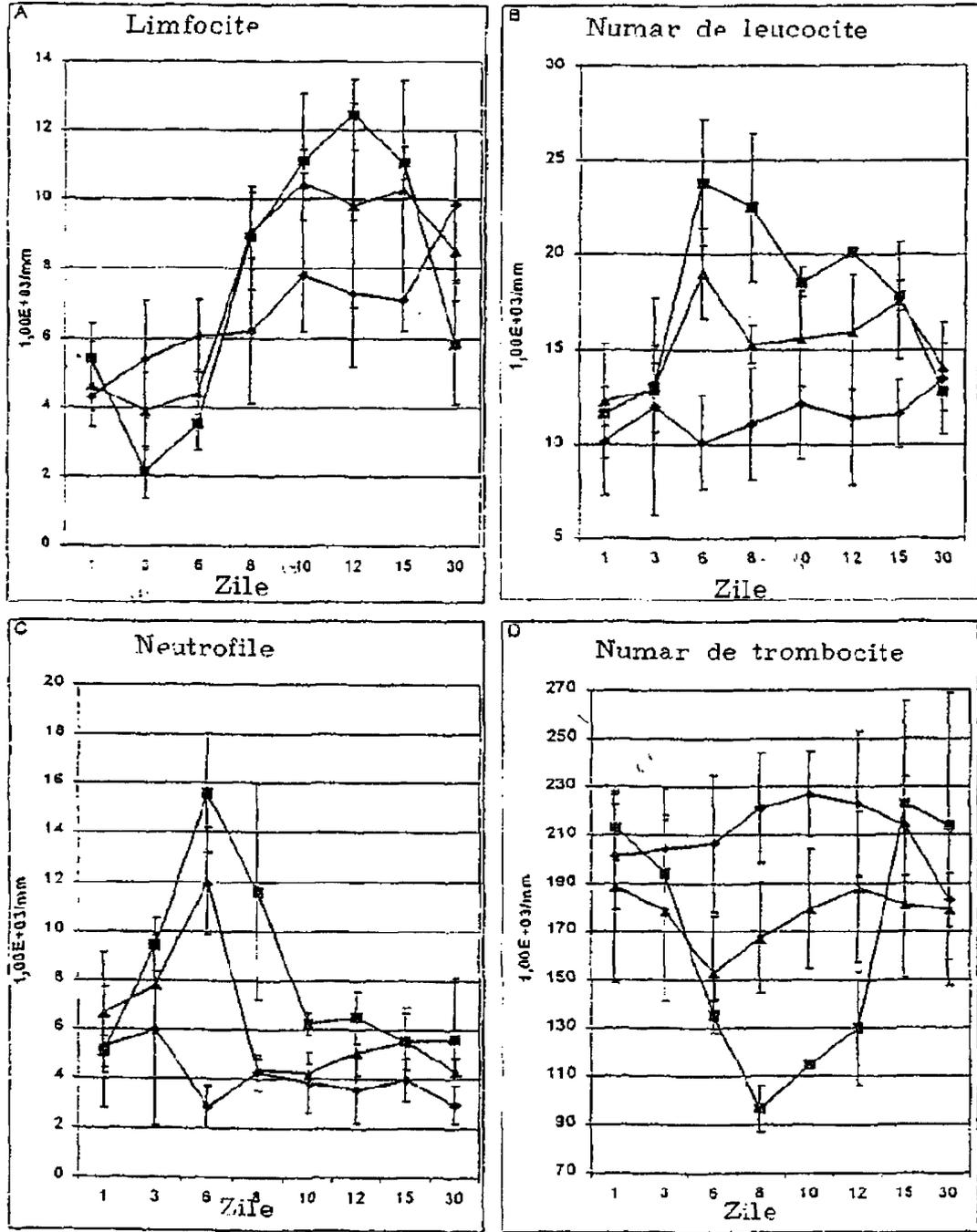


Fig. 10

RO 122150 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

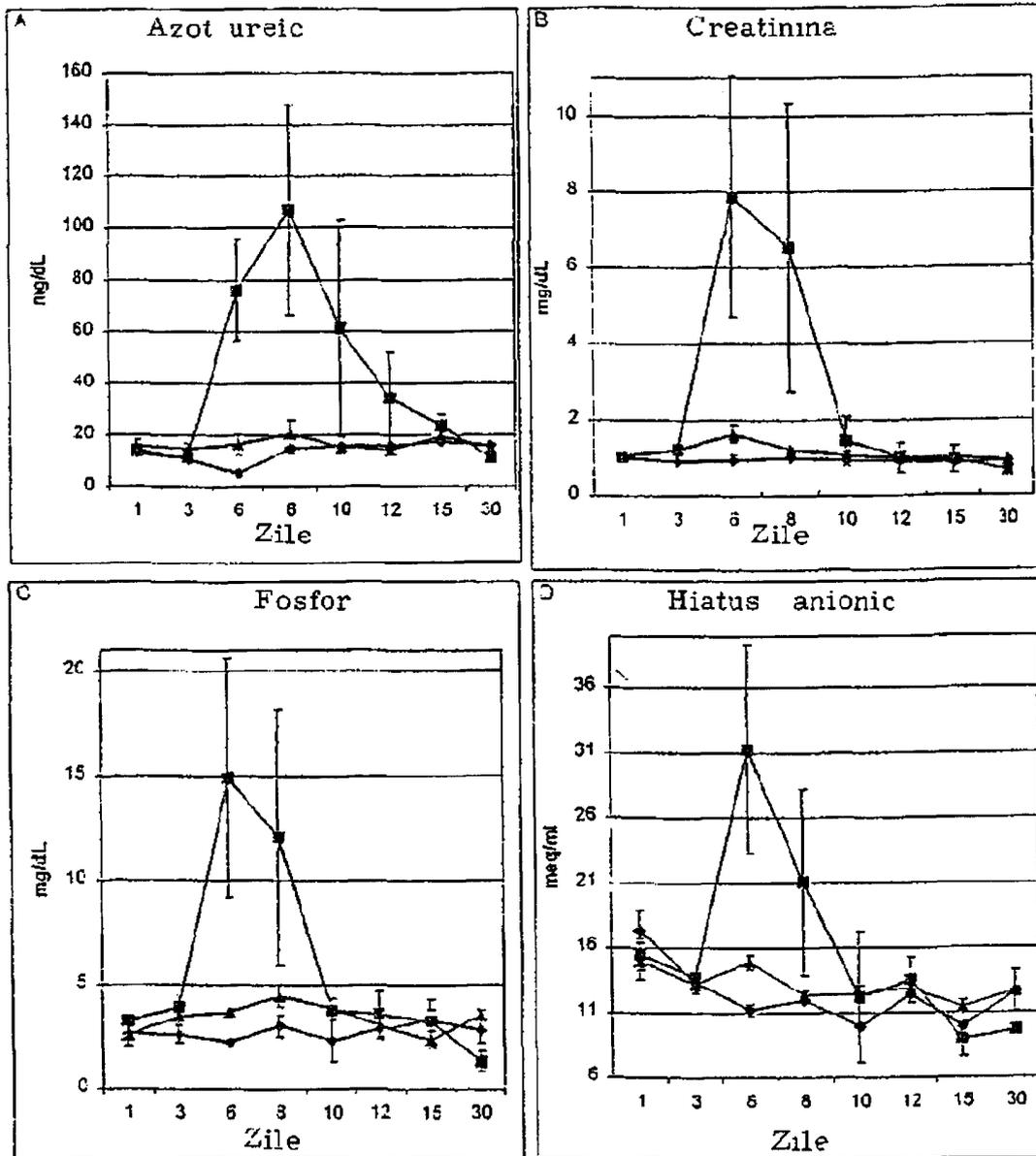


Fig. 11

RO 122150 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

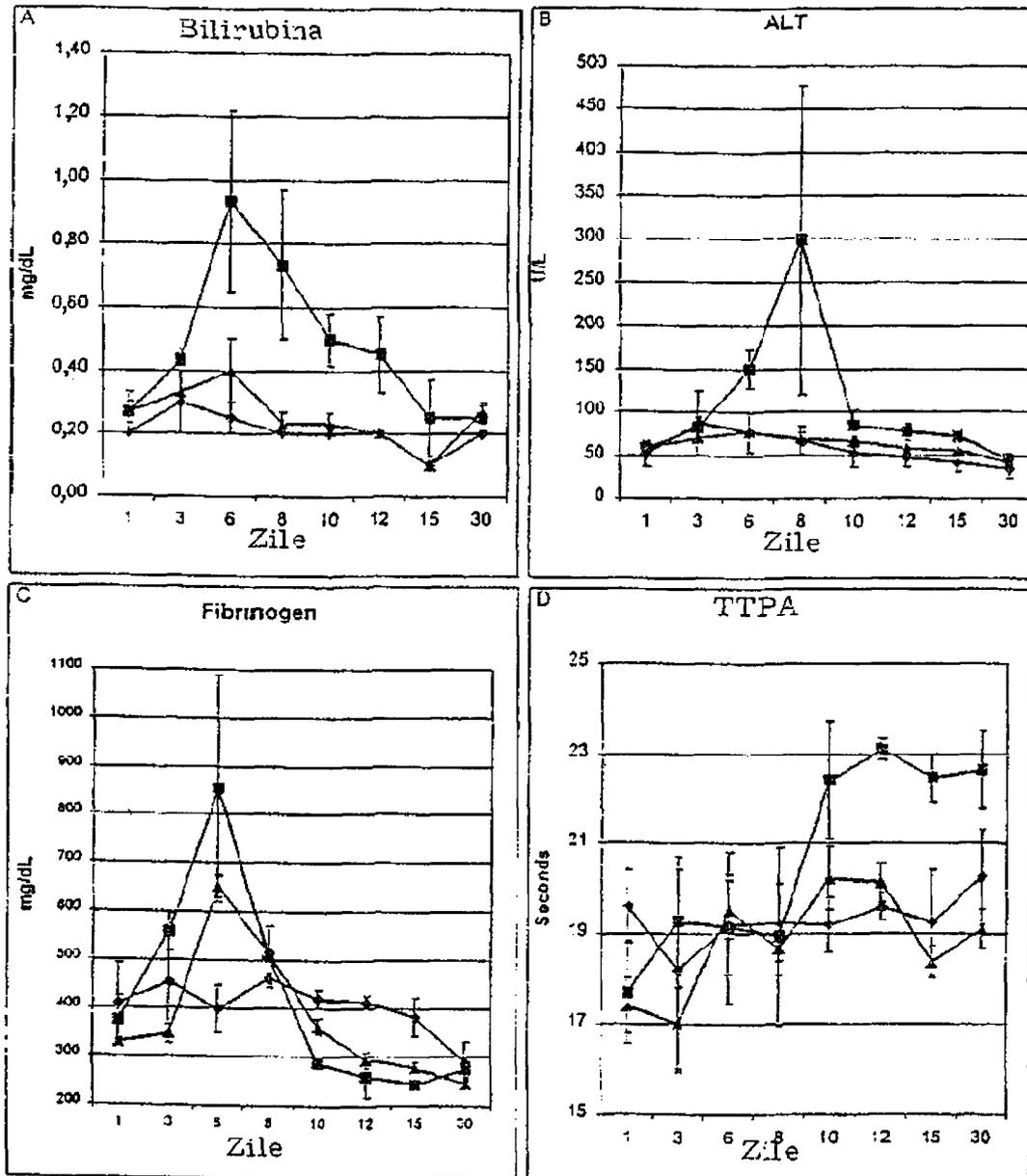


Fig. 12

RO 122150 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

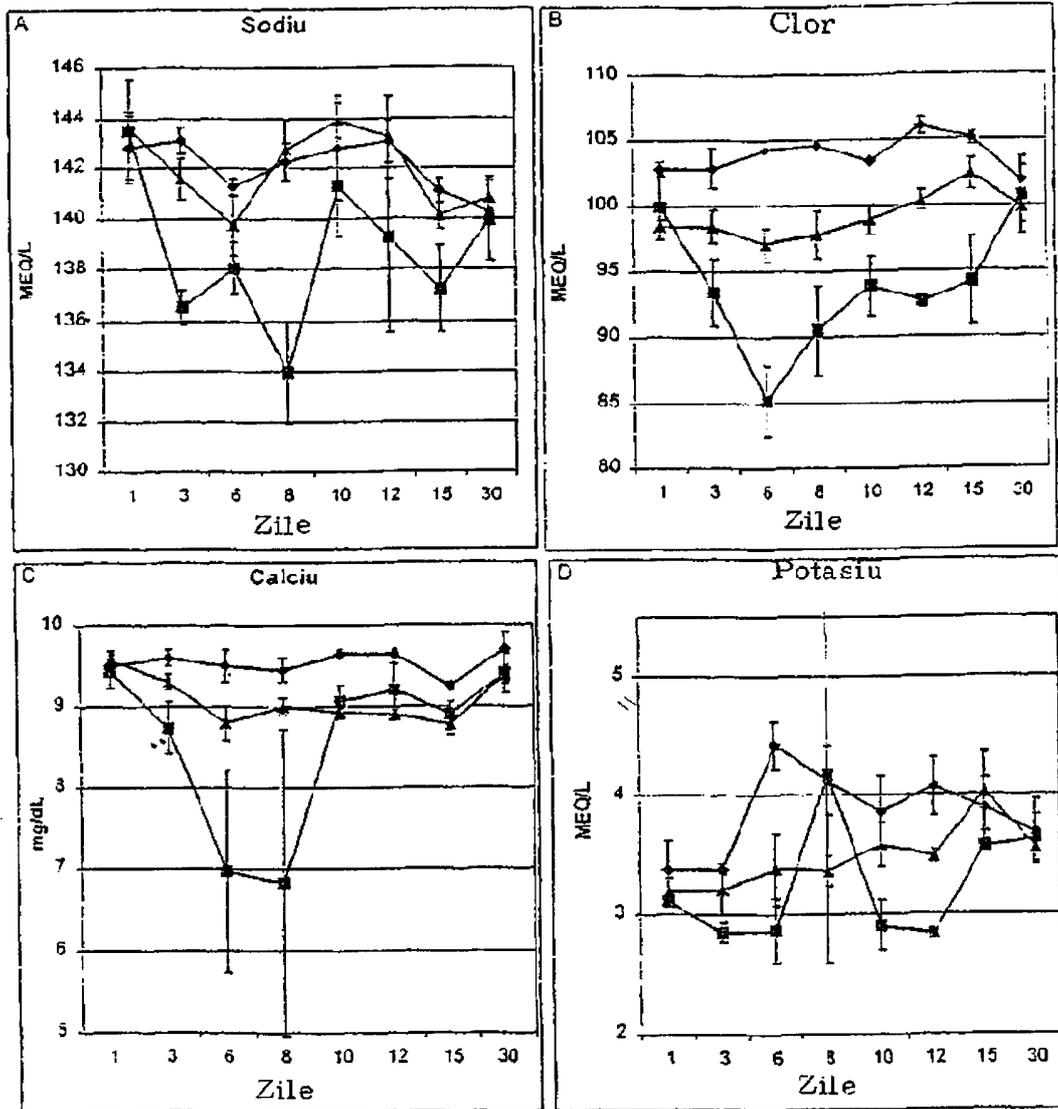


Fig. 13

RO 122150 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

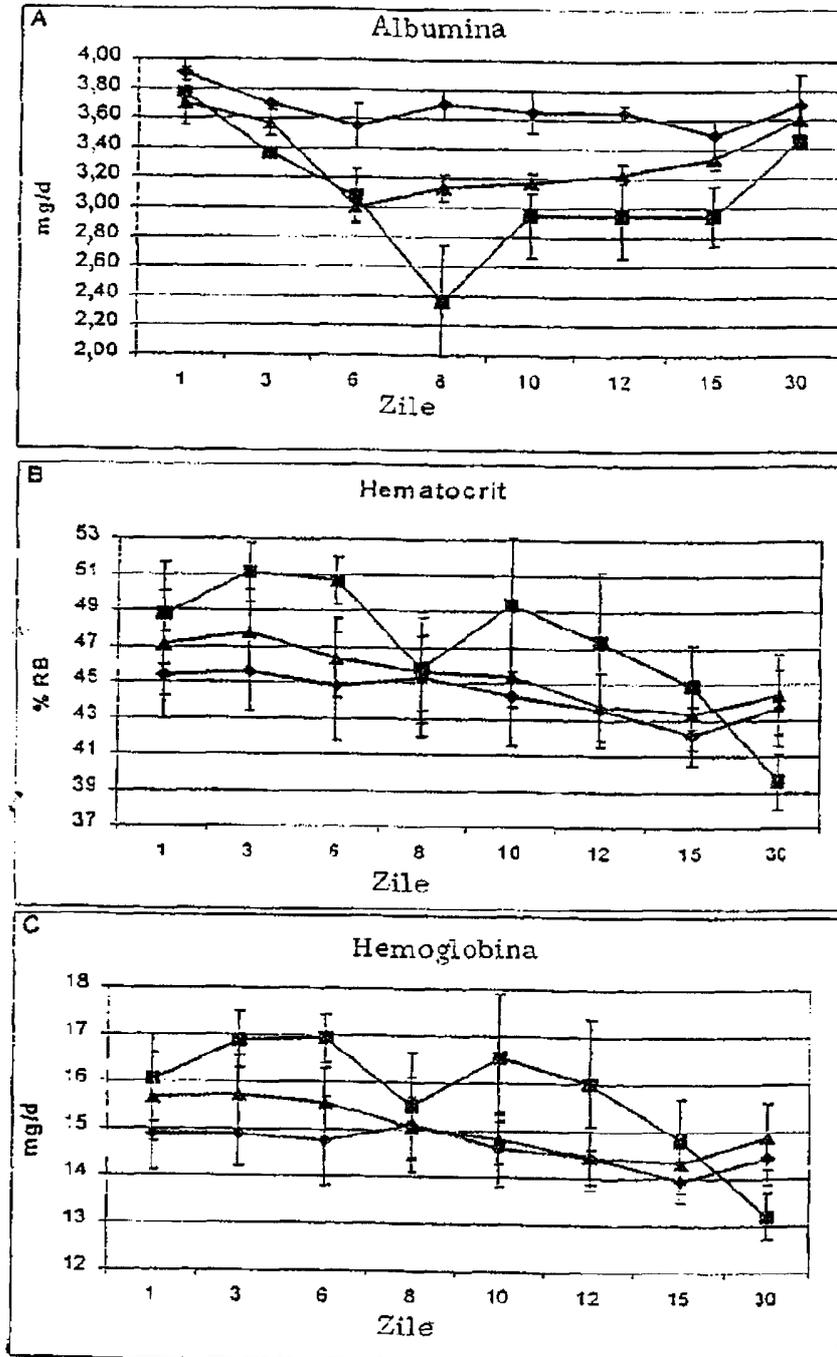


Fig. 14

RO 122150 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

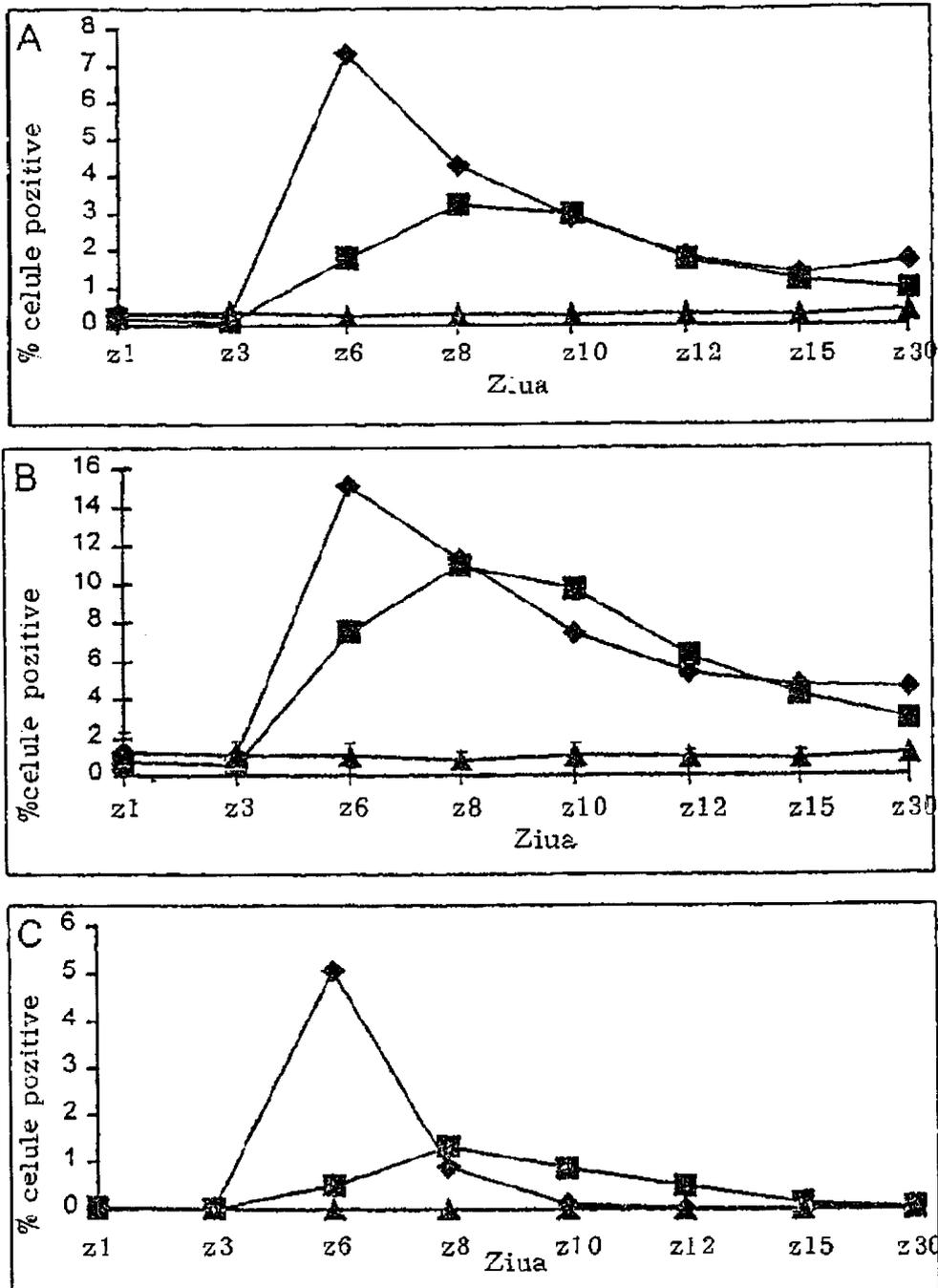


Fig. 15

RO 122150 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

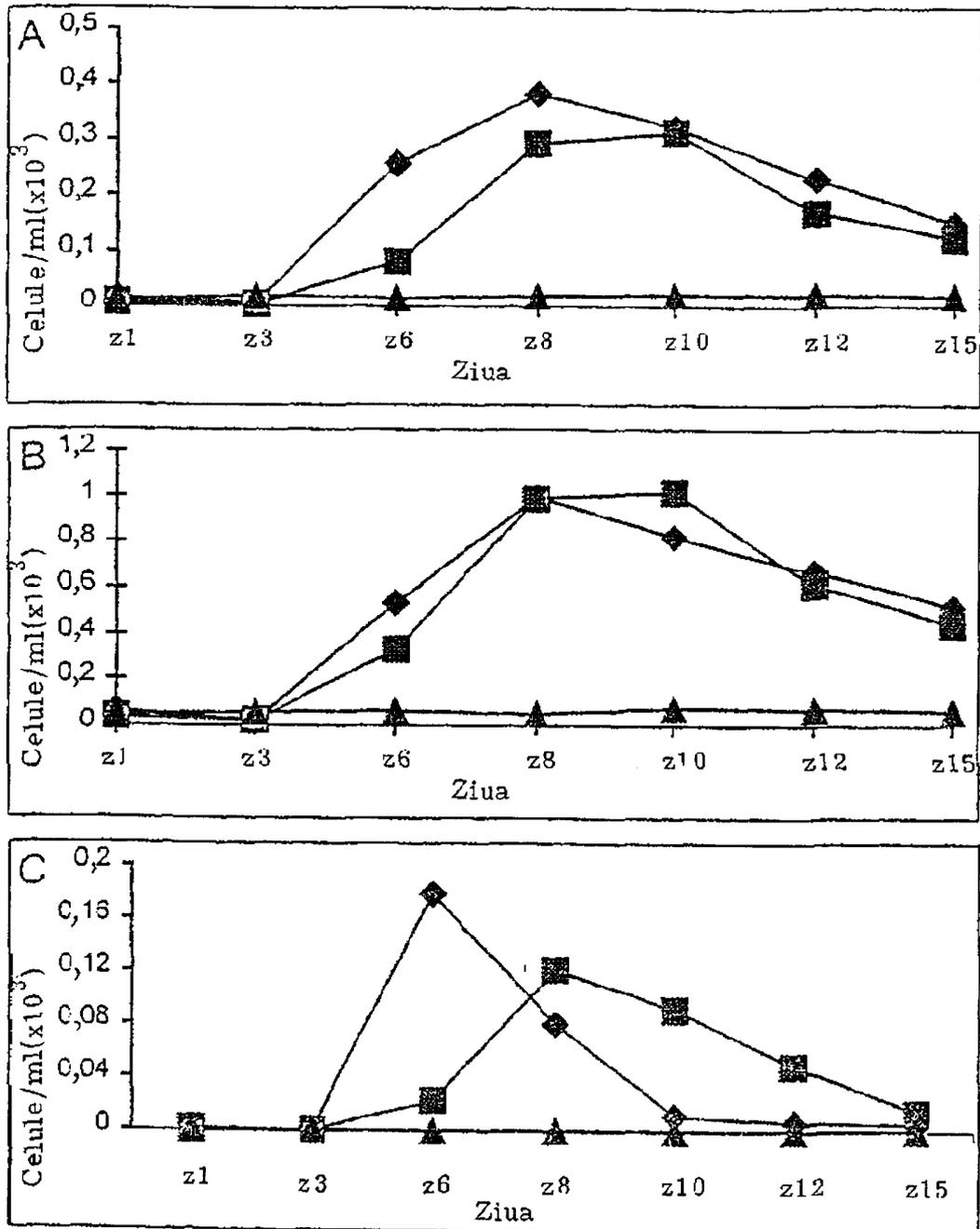


Fig. 16

RO 122150 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

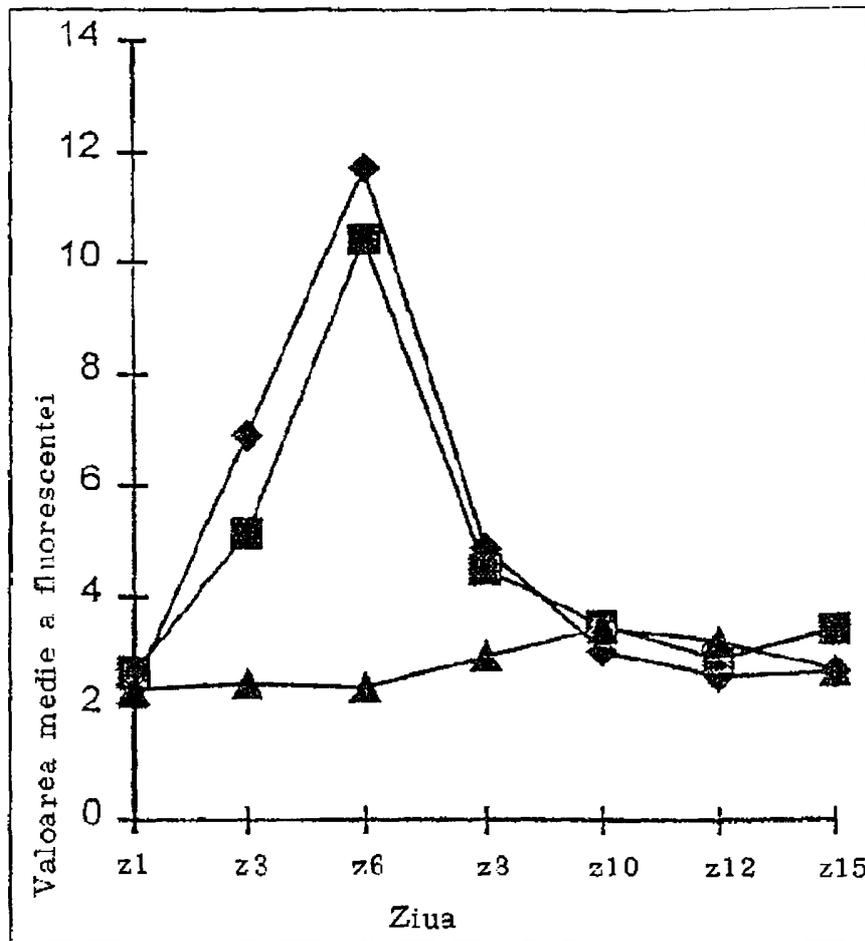


Fig. 17

(51) Int.Cl.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

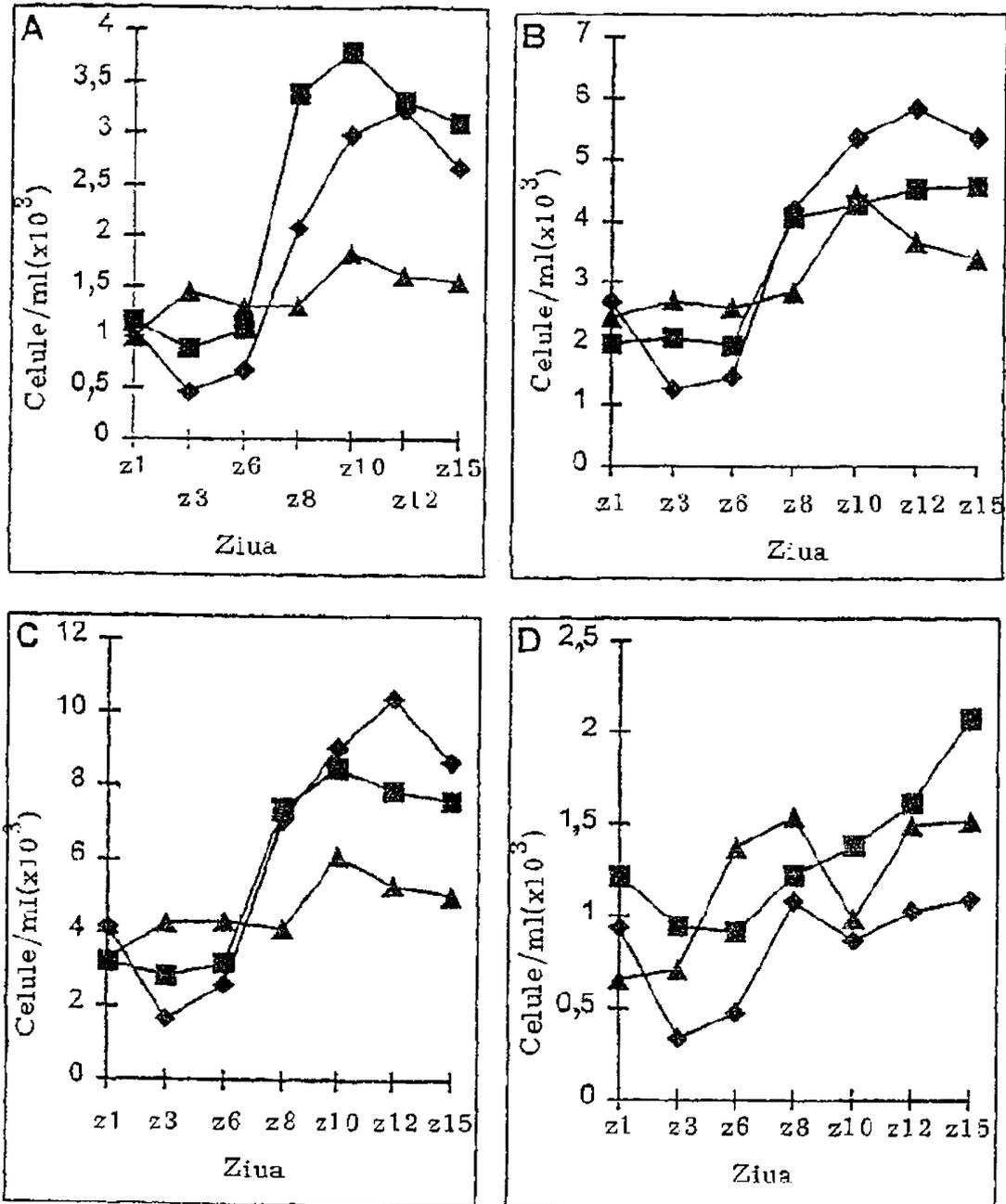


Fig. 18

(51) Int.Cl.

C12N 15/26 (2006.01);

C07K 14/55 (2006.01);

A61K 38/20 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01)

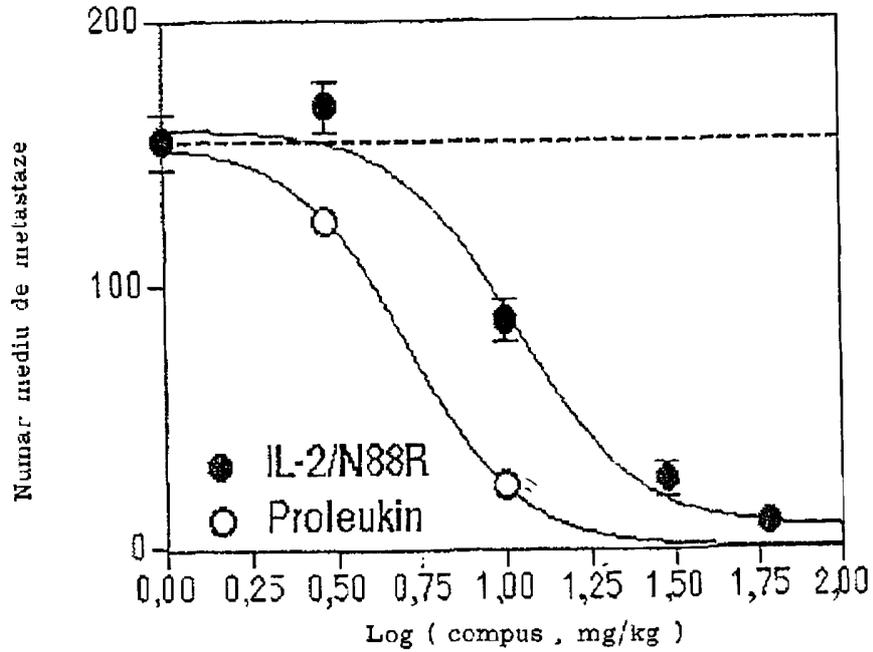


Fig. 19

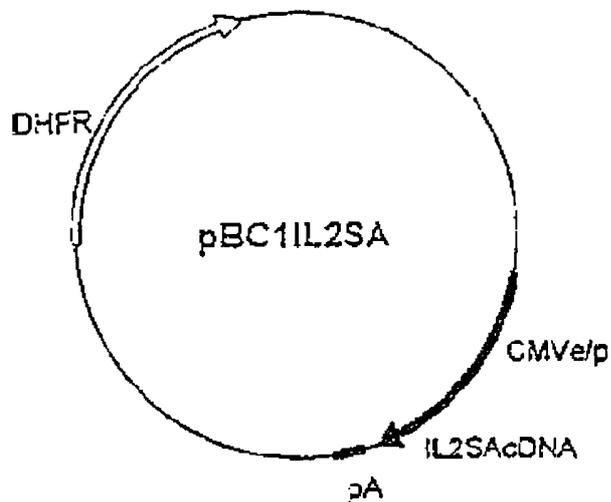


Fig. 20



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci