

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 032863

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2019.07.31

(21) Номер заявки

201591731

(22) Дата подачи заявки

2014.03.14

(51) Int. Cl. C07K 16/00 (2006.01)

(54) АГЛИКОЗИЛИРОВАННЫЕ Fc-СОДЕРЖАЩИЕ ПОЛИПЕТИДЫ

(31) 61/784,669

(32) 2013.03.14

(33) US

(43) 2016.04.29

(86) PCT/US2014/028913

(87) WO 2014/153063 2014.09.25

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

(72) Изобретатель:

Каннан Гунасекаран (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2012125850

JUNG et al. "Aglycosylated IgG variants expressed in bacteria that selectively bind Fc γ RI potentiate tumor cell killing by monocyte-dendritic cells", PNAS, Vol. 107, pgs. 604-609, 12 January 2010 (12.01.2010), entire document

WO-A2-2008062158

US-A1-20100286374

EP-A1-0506124

(57) В изобретении представлены варианты молекул Fc IgG1 человека с отсутствующей или существенно сниженной эфекторной функцией и высокой стабильностью, несмотря на отсутствие гликозилирования N297. Кроме того, в изобретении представлены линкерные пептиды, которые гликозилируются при экспрессии в клетках млекопитающих. IL-2 связывает три трансмембранные субъединицы рецептора: IL-2R- и IL-2R γ , которые вместе активируют внутриклеточные сигнальные процессы при связывании IL-2, и CD25 (IL-2R α), который стабилизирует взаимодействие IL-2 и IL-2R $\beta\gamma$. Сигналы, передаваемые IL-2R $\beta\gamma$, включают таковые сигнальных путей PI3-киназы, Ras-MAP-киназы и STAT5.

B1

032863

032863
B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка истребует приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/784669, поданной 14 марта 2013 г. Вышеуказанная заявка включена в данный документ посредством ссылок.

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка подается совместно с перечнем последовательностей, предоставленным в электронной форме. Перечень последовательностей предоставлен в виде файла, озаглавленного A-1892-WO-PCT ST25.txt, который был создан 13 марта 2014 г. и имеет размер 57344 байт. Информация, содержащаяся в перечне последовательностей, предоставленном в электронной форме, включена в данный документ в полном объеме посредством ссылок.

Уровень техники

IL-2 связывает три субъединицы трансмембранных рецептора: IL-2R β и IL-2R γ , которые совместно активируют внутриклеточную передачу сигнала при связывании IL-2 и CD25 (IL-2R α), который служит для стабилизации взаимодействия между IL-2 и IL-2R $\beta\gamma$. Сигналы, что передают IL-2R $\beta\gamma$, включают сигналы путей PI3-киназы, Ras-MAP-киназы и STAT5.

T-клеткам необходима экспрессия CD25 в ответ на низкие концентрации IL-2, которые, как правило, содержатся в тканях. T-клетки, которые экспрессируют CD25, включают как FOXP3 $^{+}$ регуляторные T-клетки (T-рег клетки), которые необходимы для подавления аутоиммунного воспаления и FOXP3 $^{-}$ T-клетки, которые были активированы для экспрессии CD25. FOXP3 $^{-}$ CD25 $^{+}$ T-эффекторных клеток (T-эфф) могут быть как клетками CD4 $^{+}$, так и CD8 $^{+}$, которые могут влиять на воспаление, аутоиммунные заболевания, отторжения органа трансплантата или заболевание трансплантат-против-хозяина. IL-2-стимулированная сигнализация STAT5 является существенной для нормального роста и выживания T-рег клеток и высокой экспрессией FOXP3.

В заявке WO 2010/085495 совместного владения мы описываем применение мутеинов IL-2 для преимущественной экспансии или стимулирования T-рег клеток. При введении субъекту воздействие на T-рег клетки применяется для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Несмотря на то что мутеины IL-2, описанные в данном документе, применяются для экспансии T-рег клеток относительно T-эфф клеток *in vivo*, было необходимым создание мутеинов IL-2, которые имели бы оптимальные свойства для человеческого терапевтического вещества человека.

Сущность изобретения

В данном документе описаны мутеины IL-2, которые характеризуются высокопроизводительной технологичностью и оптимизированной фармакологической активностью. В процессе получения типичного терапевтического средства человеческого происхождения на основе мутеина IL-2 был установлен ряд неожиданных и непредсказуемых наблюдений. Мутеин IL-2, описанный в данном документе, является результатом указанной исследовательской работы.

Мутеины IL-2, описанные в данном документе, имеют минимальное количество изменений в IL-2, тем самым уменьшая вероятность возникновения иммунного ответа против мутеина IL-2 и/или эндогенного IL-2, при этом поддерживая преимущественное экспансию и активизацию T-рег. Кроме того, в некоторых вариантах реализации изобретения мутеин IL-2, слитый с молекулой, например, антитела Fc, которая увеличивает период полувыведения сыворотки при введении субъекту. Мутеины IL-2 имеют короткий период полураспада сыворотки (от 3 до 5 ч при подкожной инъекции). Примерные гибриды Fc мутеина IL-2, описанные в данном документе, имеют период полураспада в организме человека по меньшей мере 1 день, по меньшей мере 3 дня, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 20 дней или по меньшей мере 25 дней. Данное влияние на фармакокинетику мутеинов IL-2 способствует снижению или менее частому дозированию терапевтического вещества мутеина IL-2.

Кроме того, при создании большой фармацевтической молекулы особое внимание должно уделяться способности продуцировать большую молекулу в больших количествах, сводя к минимуму агрегацию и максимизацию стабильности молекулы. Данные свойства характерны для Fc-гибридных молекул мутеина IL-2.

Кроме того, в некоторых вариантах реализации изобретения Fc-гибридный белок мутеина IL-2 содержит область Fc IgG1. Показано, что при необходимости устранения эффекторных функций IgG1 (например, активности ADCC) мутации аспарагина в положении 297 на глицине (N297G; система нумерации EC) приводили к существенно улучшенной эффективности очистки и биофизических свойств по сравнению с другими мутациями, приводящими к агликозилированию Fc IgG1. В предпочтительных вариантах реализации изобретения цистеины введены в Fc для образования дисульфидных связей, что повышает стабильность агликозилированной Fc-содержащей молекулы. Пригодность агликозилированного Fc выходит за рамки окружения Fc-гибридного мутеина IL-2. Таким образом, в данном документе представлены Fc-содержащие молекулы, Fc-гибриды и антитела, содержащие замещение N297G и необязательно замещение одного или более дополнительных остатков на цистеин.

Другой аспект данного изобретения включает гликозилированные пептидные линкеры. Предпочтительные линкерные пептиды, которые поддаются N-гликозилированию, включают GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7).

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 - в анализе краткосрочной стимуляции гомодимеризация за счет плавления к С-концом IgG-Fc не изменяет активность мутеинов IL-2 со сниженной активностью и с высокой аффинностью к CD25;

фиг. 2А и 2В - мутеины IL-2 с указанными мутациями и гибридизированы с С-концом на одной стороне Fc-гетеродимера были протестированы на их способность стимулировать STAT5 фосфорилирование в Т-клетках. Эти мутеины также содержали три мутации, придающие высокую аффинность к CD25 (V69A, N71R, Q74P). Их активность сравнивали с тремя формами IL-2 без гибридизации Fc (открытые символы): WT IL-2, HAWT (высокая аффинность с CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) и HaD (высокая аффинность с CD25 и снижение сигнальной активности) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D). Ответы фосфо-Stat5 показаны для гейтированных FOXP3⁺ CD4⁺ и FOXP3⁻CD4⁺ Т-клеток;

фиг. 3 - пролиферация субпопуляции Т-клеток в ответ на титрование мутеинов IL-2, гибридизированных с Fc-гетеродимером. Активность гибридных белков сравнивали с тремя формами IL-2 без гибридизации Fc (открытые символы): WT IL-2, HAWT (высокая аффинность с CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) и HaD (высокая аффинность с CD25 и снижение сигнальной активности) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D);

фиг. 4 - пролиферация NK-клеток в ответ на титрование мутеинов IL-2, гибридизированных с Fc-гетеродимером. Активность гибридных белков сравнивали с тремя формами IL-2 без гибридизации Fc (открытые символы): WT IL-2, HAWT (высокая аффинность с CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) и HaD (высокая аффинность с CD25 и снижение сигнальной активности) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D);

фиг. 5 - пролиферация субпопуляции Т-клеток в ответ на титрование мутеинов IL-2, гибридизированных с Fc-гомодимерным N297G. Сравнивали активность Fc.мутеинов с IL-2 WT (открытые круги) и Fc.WT (закрашенные круги). Мутации, которые придают высокую аффинность к CD25 (HaMut1), представляли собой V69A и Q74P;

фиг. 6 - пролиферация NK-клеток в ответ на титрование ИЛ-2 мутеинов IL-2, гибридизированных с Fc-гомодимерной N297G. Сравнивали активность Fc.мутеинов с IL-2 WT (открытые круги) и Fc.WT (закрашенные круги);

фиг. 7А - мутеины Fc.IL-2, которые придают высокую аффинность с CD25, способствуют расширению Т-рег и активации FOXP3 в гуманизированных мышах;

фиг. 8 - низкие недельные дозы (0,5 мкг на животное) мутеинов Fc.IL-2 способствуют расширению Т-рег и FOXP3 активацию в гуманизированных мышах с большей активностью, наблюдаемой для Fc.V91K по отношению к FC.N88D и Fc.WT;

фиг. 9 - Fc.V91K и Fc.N88D сохраняются на поверхности активированных Т-клеток за счет ассоциации с CD25.

Подробное описание предпочтительных вариантов реализации изобретения

Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для ознакомительных целей и не должны быть истолкованы как ограничивающие предмет. Все ссылки, приведенные в тексте настоящего описания, явным образом включены в полном объеме посредством ссылок.

Стандартные методики могут применяться для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, тканевой культуры и трансформации, очистки белка и т.п. Ферментативные реакции и способы очистки могут быть выполнены в соответствии с техническими условиями производителя, или как это обычно осуществляется в данной области техники, или как описано в данном документе. Следующие процедуры и методы могут быть, как правило, выполнены в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники и как описано в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются во всем описании. См., например, Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manuel, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, cold Spring Harbor, N.Y., который включен в данный документ в качестве ссылки для любых целей. Если не предусмотрены конкретные определения, номенклатура, используемая в данном контексте, и лабораторные методики и способы аналитической химии, органической химии и медицинской и фармацевтической химии, описанные в данном документе, являются хорошо известными и широко используются в технике. Стандартные методы могут быть использованы для химического синтеза, химических анализов, фармацевтического препарата, состава и доставки и лечения пациентов.

IL-2.

Мутеины IL-2, описанные в данном документе, представляют собой варианты человеческого IL-2 дикого типа. В данном контексте "человеческий IL-2 дикого типа" или "человеческий IL-2 ДТ" следует рассматривать как полипептид, имеющий следующую аминокислотную последовательность:

APTSSTKKTQLLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR

PRDLISNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT

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

Варианты могут содержать одно или больше замещений, делеций или инсерций в аминокислотной последовательности IL-2 дикого типа. Остатки обозначены в данном документе однобуквенным кодом,

за которым следует положение аминокислоты IL-2, например K35 представляет собой остаток лизина в положении 35 SEQ ID NO: 2. Замещения обозначены в данном документе однобуквенным кодом, за которым следует положение аминокислоты IL-2, например K35 представляет собой замещение лизина в положении 35 SEQ ID NO: 2 на остаток аланина.

Мутеины IL-2.

В данном документе рассматриваются человеческие мутеины IL-2, которые предпочтительно стимулируют Т-регуляторные (T-рег) клетки. В данном контексте "преимущественно стимулируют Т-регуляторные клетки" подразумевается, что мутеины способствуют пролиферации, выживанию, активации и/или действию CD3⁺FOXP3⁺ T-клеток вместо CD3⁺FOXP3⁻ T-клеток. Способы измерения способности преимущественно стимулирования Т-рег могут измеряться проточной цитометрией лейкоцитов периферической крови, для которых наблюдается повышение процентного соотношения FOXP3⁺CD4⁺ T-клеток от общего содержания CD4⁺ T-клеток, повышение процентного соотношения FOXP3⁺CD8⁺ T-клеток от общего содержания CD8⁺ T-клеток, повышение процентного соотношения FOXP3⁺ T-клеток относительно NK клеток, и/или более существенное повышение уровня экспрессии CD25 на поверхности FOXP3⁺ T-клеток относительно повышения экспрессии CD25 на других T-клетках. Преимущественный рост Т-рег клеток также может определяться как повышение копийности деметилированного FOXP3 промотора ДНК (например, Т-рег-специфически деметилированного участка или TSDR) относительно деметилированных генов в ДНК, полученной из цельной крови, что определяется за счет секвенирования продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) из геномной ДНК, обработанной бисульфитом (J. Sehouli, et al. 2011. Epigenetics 6:2, 236-246).

Мутеины IL-2, что преимущественно стимулируют Т-рег клетки, повышают соотношение CD3⁺FOXP3⁺ T-клеток относительно CD3⁺FOXP3⁻ T-клеток в образцах периферической крови по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 500%, по меньшей мере на 600%, по меньшей мере на 700%, по меньшей мере на 800%, по меньшей мере на 900% или по меньшей мере на 1000%. Преимущественные мутеины IL-2 включают, но не ограничиваясь ими, мутеины IL-2, содержащие замещение V91K или N88D в аминокислотной последовательности, описанной под SEQ ID NO: 2. Примерный мутеин IL-2 описан под SEQ ID NO: 1. Особенно предпочтительными являются аминокислотные последовательности, описанные под SEQ ID NO: 1, содержащие замещение C125A. Несмотря на то что снижение числа последующих мутаций последовательности IL-2 дикого типа является преимущественным, данное изобретение включает мутеины IL-2, имеющие усечение или дополнительные инсерции, делеции или замещения в дополнение к замещению V91K или N88D, показано, что указанные мутеины поддерживают активность преимущественно моделюемых Т-рег. Таким образом, варианты реализации изобретения включают мутеины IL-2, что преимущественно стимулируют Т-рег клетки и содержат аминокислотную последовательность, имеющую V91K и N88D, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с аминокислотной последовательностью, описанной под SEQ ID NO: 2. В особо предпочтительных вариантах реализации изобретения такие мутеины IL-2 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с аминокислотной последовательностью, описанной под SEQ ID NO: 2.

Аминокислотная последовательность, идентичность последовательности и/или схожесть определяются с использованием стандартных методов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, алгоритм идентификации локальной последовательности по Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, алгоритм идентификации выравнивания последовательности по Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, поиск метода подобия по Pearson and Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, компьютеризированные варианты реализации данных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном обеспечении Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), программа последовательности Best Fit, описанная Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, предпочтительно с использованием параметров по умолчанию или за счет проверки. Предпочтительно процент идентичности вычисляется путем FastDB, что основывается на следующих параметрах: штраф за несоответствие 1; штраф за пропуск в последовательности 1; штраф за размер пропуска 0,33; и штраф за присоединение 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

PILEUP является примером применяемого алгоритма. PILEUP создает многократное выравнивание последовательности из группы родственных последовательностей за счет использования постепенного попарного выравнивания. В PILEUP используется упрощение потепленного способа выравнивания Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360; данный способ является сходным с тем, что описан Higgins and

Sharp, 1989, CABIOS 5:151-153. Параметры, применяемые для PILEUP, включают штраф за делецию по умолчанию - 3,00, штраф за продолжение делеции по умолчанию - 0,10 и оцениваемые концевые делеции.

Другой пример используемого алгоритма представляет собой алгоритм BLAST, описанный в: Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; и Karin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5787. Особенно полезной программой BLAST является программа WU-BLAST-2, которая была получена из Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480. В WU-BLAST-2 используются несколько параметров, большинство из которых установлено по умолчанию. Настраиваемые параметры установлены согласно следующим показателям: длина перекрывания=1, доля перекрывания=0,125, пороговая длина слова (T)=II. Параметры HSP S и HSP S2 представляют собой динамические показатели и учитываются программой зависимо от состава конкретной последовательности по конкретной базе данных, для которой проводится поиск целевой последовательности; однако, показатель может регулироваться для повышения чувствительности.

Дополнительный применяемый алгоритм представляет собой гэпированный BLAST, как указано в Altschul et al., 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402. Гэпированный BLAST использует баллы замещения BLOSUM-62; значение порога T установлено на 9; двухимпульсный способ с условием негэпированного расширения, заряд длины гэпа k составляет $10+k$; X_u до 16, и X_g установлен на 40 для поиска по базе данных этапе и на 67 на выходном каскаде алгоритмов. Гэпированные выравнивания вызваны за счет результата, соответствующего приблизительно 22 битам.

В то время как сайт или область для введения вариации аминокислотной последовательности может быть предопределен, мутация reg se не должны быть предопределенены. Например, для того чтобы оптимизировать проявление мутации в данном сайте, может быть проведен случайный мутагенез при целевом кодоне или участке, и экспрессированный мутант IL-2 поддается скринингу на оптимальное сочетание с необходимой активностью. Методы получения замещения мутаций в заранее определенных местах в ДНК, имеющей известную последовательность, хорошо известны, например праймер мутагенеза M13 и ПЦР мутагенез. Скрининг мутантов может быть проведен с помощью анализов, например, описанных в данном документе.

Аминокислотные замещения, как правило, представляют собой простые остатки; инсерции, как правило, составляют от одного (1) до приблизительно (20) аминокислотных остатков, в то время как могут допускаться инсерции значительно большего размера. Делеции варьируют от приблизительного одного (1) до приблизительно двадцати (20) аминокислотных остатков, в то время как в некоторых случаях делеции могут быть значительно большего размера.

Замещения, делеции, инсерции или любые другие их комбинации могут использоваться для получения конечного производного или варианта. Как правило, данные изменения проводятся на нескольких аминокислотах для минимизации перестройки молекулы, в частности иммуногенности и специфичности антигенсвязывающего белка. Однако в некоторых случаях могут допускаться более существенные изменения. Как правило, консервативные замещения проводятся согласно следующей схеме, описанной в таблице

Исходные остатки	Примерные замещения
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Значительное изменение функции или иммунологической идентичности проводятся за счет выбора замещений, которые являются менее консервативными по сравнению с теми, что показаны в таблице. Например, замещения могут проводиться с более существенным воздействием: структура цепи полипеп-

тида в участке перестройки, например альфа-спирального или бета-складчатой структуры; заряд или гидрофобность молекулы в целевой области; или основного объема боковой цепи. Замещения, в целом которые предполагают получение более существенных изменений полипептидных свойств, представляют собой те, в которых (а) гидрофильные остатки, например серил или треонил, замещены гидрофобным остатком, например лейцилом, изолейцилом, фенилаланином, валилом или аланином; (б) цистein или пролин замещены любыми другими остатками; (с) замещения, имеющие электроположительную боковую цепь, например лизил, аргинил или гистидил, замещены электронегативными остатками, например глутамилом или аспартилом; или (д) остаток, имеющий массивную боковую цепь, например фенилаланин, замещен остатком, не содержащим боковой цепи, например глицином.

Как правило, варианты проявляют аналогичную качественную биологическую активность и вызывают тот же иммунный ответ, что и природные аналоги, в то время как варианты выбирают с целью модификации необходимых характеристик мутеина IL-2. Альтернативно, варианты могут быть созданы таким образом, что биологическая активность мутеина IL-2 изменяется. Например, сайты гликозилирования могут быть изменены или удалены, как описано в данном документе.

Мутеины IL-2, имеющие удлиненный период полураспада сыворотки.

Поскольку мутеины IL-2, представленные в данном документе, преимущественно увеличивают Т-рер по сравнению с, например, Т-эфф или NK-клетками, предполагается, что при введении пациенту профиль безопасности будет отличаться от IL-2 дикого типа или PROLEUKIN. Побочные эффекты, связанные с IL-2 дикого типа или PROLEUKIN включают гриппоподобные симптомы, озноб/озноб, боль в суставах, лихорадку, сыпь, зуд, реакции в месте инъекции, артериальную гипотензию, диарею, тошноту, беспокойство, спутанность сознания и депрессию. Мутеины IL-2, представленные в данном документе, могут быть изменены для включения или слияния с молекулой, которая увеличивает период полураспада мутеина без повышения риска, что такое повышение периода полураспада будет повышать вероятность или интенсивность побочного эффекта или нежелательное явление у пациента. Подкожное дозирование такого мутеина с повышенным периода полураспада сыворотки может способствовать пролонгированному целевому покрытию с более низким максимальным воздействием (C_{max}). Повышенный период полураспада сыворотки может способствовать более низкому или менее частому режиму дозирования мутеина.

Период полураспада сыворотки мутеина IL-2, представленного в данном документе, может быть повышен за счет преимущественно любого метода, известного в данной техники. Такие способы включают изменение последовательности мутеина IL-2 для включения пептида, который связывается с неонатальным рецептором Fc γ или связывается с белком, имеющим повышенный период полураспада сыворотки, например, IgG или сывороточным альбумином человека. В другом варианте реализации изобретения мутеин IL-2 гибридизирован с полипептидом, который способствует повышенному периоду полураспада гибридной молекулы. Данные полипептиды включают IgG Fc или другие полипептиды, которые связываются с неонатальным рецептором Fc γ , сывороточным альбумином человека или полипептидами, которые связываются с белком, имеющим повышенный период полураспада. В предпочтительных вариантах реализации мутеин IL-2 гибридизируется с молекулой Fc IgG.

Мутеин IL-2 может быть гибридизирован с N-концевым или C-концевым участком участка Fc IgG. Как указано в примерах, гибридизация с C-концом участка Fc IgG способствует активности мутеина IL-2 в вышеупомянутой степени по сравнению с гибридизацией с N-концом Fc IgG.

Один вариант реализации настоящего изобретения относится к димеру, содержащему два Fc-гибридных полипептида, созданных за счет гибридизации мутеина IL-2 и участка Fc антитела. Димер может быть получен, например, путем инсерции гибридного гена, кодирующего гибридный белок, в соответствующий вектор экспрессии, экспрессии гибридного гена в клетке-хозяине, трансформированной рекомбинантным вектором экспрессии и способствуя сборке экспрессированного гибридного белка подобно молекулам антитела, вследствие чего межцепьевые связи формируются между фрагментами Fc для получения димера.

Термин "полипептид Fc" или "участок Fc", используемые в данном документе, включают нативные и мутированные формы полипептидов, полученных из участков Fc антитела. Также включаются усеченные формы таких полипептидов, содержащих шарнирный участок, который способствует димеризации. В некоторых вариантах реализации изобретения участок Fc содержит антитело CH2 и домен CH3. Вместе с повышенным периодом полураспада сыворотки гибридные белки, содержащие фрагменты Fc (и образованные с них олигомеры) способствуют преимущественной легкой очистке путем аффинной хроматографии в колонках белка A или белка B. Предпочтительные участки Fc получают с IgG человека, который содержит IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В данном документе специфические остатки Fc определяют по положению.

Одной из функций части Fc антитела является взаимодействие с иммунной системой во время связывания антитела с его мишенью. Данный процесс рассматривается как "эффекторная функция". Взаимодействие приводит к антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антитело-зависимому клеточному фагоцитозу (ADCP) и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). ADCC и ADCP опосредуются путем связывания Fc с белками комплементарной системы, например C1q.

Подклассы IgG отличаются по их способности опосредовать эффекторные функции. Например, IgG1 является значительно предпочтительнее IgG2 и IgG4 в опосредовании ADCC и CDC. Таким образом, в вариантах реализации изобретения, для которых эффекторная функция является нежелательной, предпочтительным будет Fc IgG2. Однако известно, что Fc-содержащие молекулы IgG2 значительно сложнее получить и они имеют менее приемлемые биофизические свойства, в частности более короткий период полураспада по сравнению с Fc-содержащими молекулами IgG1.

Эффекторная функция антитела может усиливаться или снижаться путем введения одной или нескольких мутаций в Fc. Варианты реализации изобретения включают мутеин IL-2 Fc-гибридных белков, содержащих Fc, сконструированного для повышения эффекторной функции (US 7317091 and Strohl, Сиг. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009; оба включены в данный документ путем ссылки во всей своей полноте). Примеры молекул Fc IgG1, имеющие повышенную эффекторную функцию, включают содержащие следующие замещения:

- S239D/I332E;
- S239D/A330S/I332E;
- S239D/A330L/I332E;
- S298A/D333A/K334A;
- P247I/A339D;
- P247I/A339Q;
- D280H/K290S;
- D280H/K290S/S298D;
- D280H/K290S/S298V;
- F243L/R292P/Y300L;
- F243L/R292P/Y300L/P396L;
- F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L;
- G236A/S239D/I332E;
- K326A/E333A;
- K326W/E333S;
- K290E/S298G/T299A;
- K290N/S298G/T299A;
- K290E/S298G/T299A/K326E;
- K290N/S298G/T299A/K326E.

Другой способ повышения эффекторной функции Fc-содержащих белков IgG состоит в снижении фукозилирования Fc. Удаление коровой фукозы из 2-антенарного типа комплекса олигосахаридов, прикрепленного к Fc, существенно повышает эффекторную функцию ADCC без изменения связывания антигена или эффекторную функцию CDC. Известно несколько способов изменения или предотвращения фукозилирования Fc-содержащих молекул, например антител. Они включают рекомбинантную экспрессию в конкретных клеточных линиях млекопитающих, включая нокаутную клеточную линию FUT8, вариант Lec13 линии СНО, клеточную линию гибридомы крыс YB2/0, клеточную линию, включающую малые интерферирующие РНК, которые являются специфическими относительно гена FUT8 и клеточную линию, коэкспрессирующие β -1,4-N-ацетилглюкозаминтрансферазу III и α -маннозидазу II комплекса Гольджи. Альтернативно, Fc-содержащие молекулы могут экспрессироваться в клетках, что являются клетками млекопитающих, в частности клетках растений, дрожжей или прокариотических клетках, например E.coli.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения Fc-гибридные молекулы белков мутеина IL-2 содержат сконструированный Fc для снижения эффекторной функции. Примеры молекул Fc IgG1, имеющие сниженную эффекторную функцию, включают содержащие следующие замещения:

- N297A или N297Q (IgG1);
- L234A/L235A (IgG1);
- V234A/G237A (IgG2);
- L235A/G237A/E318A (IgG4);
- H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2);
- C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1);
- C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1);
- L234F/L235E/P331S (IgG1);
- S267E/L328F (IgG1).

Известно, что человеческий IgG1 содержит сайт гликозилирования в N297 (система нумерации ЕС) и гликозилирование влияет на эффекторную функцию антител IgG1. Пример последовательности IgG1 представлен в SEQ ID NO: 3. Группы мутировали N297 с целью получения агликозилированных антител. Мутации были направлены на замещение N297 аминокислотами, что были сходными с аспарагином по физикохимическим свойствам, в частности глутамином (N297Q) или аланином (N297A), которые имитируют аспарагины без полярных групп.

Как используется в данном документе, "агликозилированное антитело" или "агликозилированный

fc" относится к статусу гликозилирования отатка в положении 297 Fc. Антитело или другие молекулы могут содержать гликозилирование в одном или более положениях, но все же могут рассматриваться как агликозилированное антитело или агликозилированный Fc-гибридный белок.

Раскрыто, что с целью получения эффекторного нефункционального Fc IgG1 мутация аминокислоты N297 IgG1 на глицин, например IgG1, приводит в более существенной эффективности очитки и биофизических свойств по сравнению с другими аминокислотными замещениями в данном остатке. См. пример 8. Таким образом, в предпочтительном варианте реализации изобретения Fc-гибридный белок мутеина IL-2 содержит Fc IgG1 человека, имеющий замещение N297G. Fc, содержащий замещение N297G, применяется в любом случае, когда молекула содержит Fc IgG1 человека, и применение не ограничивается в случае Fc-гибридного мутеина IL-2. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело содержит Fc, имеющий замещение N297G.

Fc, содержащий Fc IgG1 человека, что имеет мутацию N297G, может также содержать дополнительные инсерции, делеции и замещения. В конкретных вариантах реализации изобретения Fc IgG1 человека содержит замещение N297G и по меньшей мере на 90% идентичен, по меньшей мере на 91% идентичен, по меньшей мере на 92% идентичен, по меньшей мере на 93% идентичен, по меньшей мере на 94% идентичен, по меньшей мере на 95% идентичен, по меньшей мере на 96% идентичен, по меньшей мере на 97% идентичен, по меньшей мере на 98% идентичен, по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности, описанной под SEQ ID NO: 3. В особо предпочтительных вариантах реализации изобретения C-концевой лизин замещен или удален. Аминокислотная последовательность IgG1 человека, содержащая замещение N297G и делецию C-концевого лизина, описана под SEQ ID NO: 4.

Показано, что Fc-содержащие молекулы агликозилированного IgG1 были менее стабильными по сравнению с Fc-содержащие молекулы гликозилированного IgG1. Участок Fc может быть дополнительно сконструирован с целью повышения стабильности агликозилированной молекулы. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более аминокислот замещены цистеином для образования дисульфидной связи в димерном положении. Остатки V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 аминокислотной последовательности, описанной под SEQ ID NO: 3, могут быть замещены цистеином. В предпочтительных вариантах реализации изобретения специфические пары остатков замещены таким образом, что они преимущественно образуют дисульфидные связи с друг другом, таким образом ограничивая или предотвращая запутывание дисульфидной связи. Предпочтительные пары включают, но не ограничиваются ими, A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C и V323C и I332C.

Fc-содержащие молекулы, представленные в данном документе, в которых один или более остатков V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 замещены цистеином. Предпочтительные Fc-содержащие молекулы включают те, что содержат замещения A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C или V323C и I332C.

Примеры Fc-содержащих молекул включают

человеческий IgG1 Fc с замещениями N297G, A287C, L306C и делецией C-концевого K (SEQ ID NO: 39)

```
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNCKTPREEQYGST
YRVVSVCTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:39)
```

человеческий IgG1 Fc с замещениями N297G, V259C, L306C и делецией C-концевого K (SEQ ID NO: 40)

```
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPECTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGST
YRVVSVCTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:40)
```

человеческий IgG1 Fc с замещениями N297G, R292C, V302C и делецией C-концевого K (SEQ ID NO: 41)

```
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST
YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:41)
```

человеческий IgG1 Fc с замещениями N297G, A287C, L306C (SEQ ID NO: 42)

```
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNCKTPREEQYGST
YRVVSVCTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:42)
```

человеческий IgG1 Fc с замещениями N297G, V259C, L306C (SEQ ID NO: 43)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPPKDLMISRTPECTCVVVDSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGST
 YRVVSVCVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAPIEKTISKAGQPREPVTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:43)

человеческий IgG1 Fc с замещениями N297G, R292C, V302C (SEQ ID NO: 44)
 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST
 YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAPIEKTISKAGQPREPVTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:44)

Дополнительные мутации, которые могут быть проведены для Fc IgG1, включают те, что способствуют образованию гетеродимера из Fc-содержащих полипептидов. В некоторых вариантах реализации изобретения участок Fc сконструирован таким образом, чтобы образовать "выступ" и "углубление", которые способствуют образованию гетеродимера из двух разных Fc-содержащих полипептидных цепей при соэкспрессии в клетке. US 7695963. В других вариантах реализации изобретения участок Fc изменяют с целью использования электростатического влияния для способствования образованию гетеродимера в противодействие образованию гетеродимера из двух разных Fc-содержащих полипептидных цепей при соэкспрессии в клетке. WO 09/089004 включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Предпочтительные гетеродимеры включают те, в которых одна цепь Fc содержит замещения D399K и E356K и одна цепь Fc содержит замещения K409D, K392D и K370D.

В конкретных вариантах реализации изобретения может быть предпочтительным, чтобы Fc-гибридный белок мутеина IL-2 был мономерным, например содержал только одну молекулу мутеина IL-2. В таких вариантах реализации изобретения Fc-участок гибридного белка может содержать одну или более мутаций, которые способствуют образованию гетеродимера. Гибридный белок соэкспрессируется Fc участком, имея реципрокную мутацию относительно мутации IL-2 Fc-гибридного полипептида, не имея при этом мутеина IL-2. При образовании гетеродимера из двух Fc-содержащих полипептидов полученный белок содержит только один мутеин IL-2.

Другой способ получения мономерного мутеина IL-2 Fc-гибридного белка представляет собой гибридизацию мутеина IL-2 и мономерного Fc, например недемиризирующегося участка Fc. Стабильные мономерные Fc содержат мутации, которые предотвращают димеризацию и стабилизируют молекулу в мономерной форме. Предпочтительные мономерные Fc раскрыты в WO 2011/063348, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки. В конкретных вариантах реализации изобретения мутеин IL-2 Fc-гибридных белков содержит Fc, включая негативно заряженные аминокислоты в положении 392 и 409 с замещением треонином в Y349, L351, L368, V397, L398, F405 или Y407.

В конкретных вариантах реализации изобретения мутеин IL-2 Fc-гибридного белка содержит линкер между Fc и мутеином IL-2. В данной области техники известны множественные различные линкеры, что могут использоваться в контексте мутеина IL-2 Fc-гибридного белка. В предпочтительных вариантах реализации изобретения мутеин IL-2 Fc-гибридного белка содержит одну или более копий пептида, содержащего GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7) между Fc и мутеином IL-2. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный участок между участком Fc и участком мутеина IL-2 содержит одну копию GGGGS (SEQ ID NO: 5), GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7). Как указано в данном документе, линкеры GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7) гликозилируются при экспрессии в соответствующую клетку, и данная гликозилизация может способствовать стабилизации белка в растворе и/или при введении *in vivo*. Таким образом, в конкретных вариантах реализации изобретения гибридный белок мутеина IL-2 содержит гликозилированный линкер между участком Fc и участком мутеина IL-2.

Предполагается, что гликозилированный линкер может использоваться при введении в отношении полипептида. Представленные в данном документе полипептиды, что включают GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7), введены в аминокислотную последовательность полипептида или замещают одну или несколько аминокислот в аминокислотной последовательности полипептида. В предпочтительных вариантах реализации изобретения GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7) введены в петлю полипептидов третичной структуры. В других вариантах реализации изобретения одна или более аминокислот петли замещены GGNGT (SEQ ID NO: 6) или YGNGT (SEQ ID NO: 7).

C-концевой участок Fc и/или концевая часть аминогруппы мутеина IL-2 может содержать одну или несколько мутаций, которые изменяют профиль гликозилирования мутеина Fc-гибридного белка IL-2 при экспрессии в клетках млекопитающих. В некоторых вариантах реализации изобретения мутеин IL-2 дополнительно содержит замещение T3, например T3n или T3A. Мутеин IL-2 может дополнительно содержать замещение S5, например S5T.

Ковалентные модификации мутеина IL-2 и мутеина IL-2 Fc-гибридных белков включены в объем настоящего изобретения и, как правило, но не всегда, получены посттрансляционно. Например, несколько типов ковалентных модификаций мутеина IL-2 или мутеина IL-2 Fc-гибридного белка вводят в молекуле в результате реакции конкретных аминокислотных остатков мутеина IL-2 или Fc-гибридного белка

мутеина IL-2 с помощью органического дериватизирующего агента, который способен реагировать с выбранными боковыми цепями или N- или C-концевым остатками.

Остатки цистеинила наиболее часто вступают в реакцию с α -галоацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид для получения производных карбоксиметила или карбоксиамидометила. Остатки цистеинила также модифицируют путем реакции с бромтрифторацетоном, α -бром- β -(5-имидозоил) пропионовой кислотой, хлоруксусным фосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилидисульфидом, метил-2-пиридилидисульфидом, п-хлоррутгуртным бензоатом, 2-хлоррутурным-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

Гистидиловые остатки модифицируют путем реакции с диэтилпирокарбонатом при pH 5,5-7,0, поскольку этот агент относительно специфичен для гистидиловых боковых цепей. Парабромфенацилбромид также может быть использован; реакцию предпочтительно проводят в 0,1M какодилате натрия при pH 6,0.

Концевые остатки лизинила и аминокислот подвергают взаимодействию с янтарным ангидридом или ангидридами других карбоновых кислот. Получение производных с этими агентами имеет эффект изменения заряда остатков лизинила. Другие подходящие реагенты для дериватизации альфа-амино-содержащих остатков включают имидоэфиры, такие как метил николиминидат; пиридоксаль фосфат; пиридоксаль; хлорбромгидрид; тринитробензолсульфоновая кислота; O-метилизомочевину; 2,4-пентандион и трансаминазы-катализируемой реакции с глиоксилатом.

Аргиниловые остатки модифицируют путем реакции с одним или несколькими обычными реагентами, среди которых фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Получение производных остатков аргинина требует, чтобы реакция осуществлялась в щелочных условиях из-за высокой рK_a функциональной группы гуанидина. Кроме того, эти реагенты могут реагировать с группами лизина, а также эпсилон-аминогруппой аргинина.

Специфическая модификация остатков тирозина могут быть получена с особым интересом для введения спектральных меток в остатки тирозила путем реакции с ароматическими соединениями диазония или тетранитрометана. Чаще всего, N-ацетилимидазол и тетра-нитрометан применяются для образования O-ацетил видов тирозила и 3-нитропроизводных соответственно. Остатки тирозила йодируют с использованием ¹²⁵I или ¹³¹I, чтобы подготовить меченные белки для использования в радиоиммуноанализе, описанный выше способ хлорамина Т может быть использован.

Карбоксильные боковые группы (аспартил или глутамил) избирательно модифицируются реакцией с карбодиимидами ($R'-N=C=N-P'$), причем R' и R' необязательно представляют собой различные алкильные группы, такие как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил) карбодиимид или 1-этил-3-(4-азоний-4,4-диметилпентил)карбодиимида. Кроме того, остатки аспартила и глутамила преобразуются в остатки аспарагинила и глутаминила путем реакции с ионами аммония.

Получение производных с бифункциональными агентами применяется для сшивания антигенсвязывающие белков с нерастворимой в воде матрицей или поверхностью, что применяется в различных способах. Широко используемые сшивающие агенты включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаровый альдегид, сложные эфиры N-гидроксисукцинида, например сложные эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, гомобифункциональные имидоэфиры, в том числе эфиры дисукцинидила, такие как 3,3'-дитиобис(сукцинидиилпропионат) и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан. Дериватизирующие агенты, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]пропионимидат, способствуют получению фотоактивируемых промежуточных продуктов, которые способны образовывать поперечное сшивание в присутствии света. Альтернативно, активные нерастворимые в воде матрицы, такие как бромид-активированный углевод циана и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах США № 3969287, 3691016, 4195128, 4247642, 4229537 и 4330440, используются для иммобилизации белков.

Остатки глутаминила и аспарагинила часто деамидируют в соответствующие остатки глутамила и аспартила соответственно. Кроме того, данные остатки деамидируют в слабокислой среде. Любая форма этих остатков входит в объем изобретения.

Другие модификации включают гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп остатков серила или треонила, метилирование альфа-аминогрупп лизина, аргинина и боковых цепей гистидина (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, p. 79-86), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Другой тип ковалентной модификации мутеина IL-2 или Fc-гибридного белка мутеина IL-2 включены в объем настоящего изобретения, содержат изменение профиля гликозилирования белка. Как известно в данной области, профиль гликозилирования может зависеть как от последовательности белка (например, в частности, наличия или отсутствия гликозилированных аминокислотных остатков, что обсуждается ниже) или клетки-хозяина, или организма, в котором белок продуцируется. Конкретные системы экспрессии обсуждаются ниже.

Гликозилирование полипептидов, как правило, является N-связанным или O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного остатка к боковой цепи остатка аспарагина. Трипеп-

тидные последовательности аспарагин-Х-серин и аспарагин-Х-треонин, где Х обозначает любую аминокислоту, кроме пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного остатка к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трех пептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. О-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы, к гидроксиаминокислоте, наиболее часто серина или треонина, хотя также могут быть использованы 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин.

Добавление сайтов гликозилирования к мутеину IL-2 или мутеину IL-2 Fc-гибридного белка может быть легко достигнуто путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, что она содержит один или более из описанных выше трипептидных последовательностей (для N-связанного гликозилирования). Изменение также может быть достигнуто путем добавления или заменой одного или более остатков серина или треонина в исходной последовательности (для O-связанного гликозилирования). Для простоты мутеин IL-2 или аминокислотная последовательность Fc-гибридной белка мутеин IL-2 предпочтительно изменяется посредством изменения на уровне ДНК, в частности путем мутации ДНК, кодирующей целевой полипептид, в предварительно выбранных оснований, таким образом, что полученные кодоны что будут транслировать в необходимые аминокислоты.

Другой способ повышения числа углеводных остатков в мутеине IL-2 или мутеине IL-2 Fc-гибридного белка представляет собой химическое или ферментативное присоединение гликозидов к белку. Эти методики являются преимущественными благодаря тому, что они не требуют продукции белка в клетке-хозяине, которая обладает способностью гликозилирования для N- и O-гликозилирования. В зависимости от используемого способа соединения сахар (а) может быть прикреплен к (а) аргинину и гистидину, (б) свободным карбоксильным группам, (с) свободным сульфогидрильным группам, таким как те, цистеина, (г) свободным гидроксильным группам, в частности к серину, треонину или гидроксипролину, (е) ароматическим остаткам, в частности к фенилаланину, тирозину или триптофану, или (е) амидной группе глутамина. Данные способы описаны в WO 87/05330, опубликованной 11 сентября 1987 г., и Arplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., p. 259-306.

Удаление углеводных остатков, присутствующих в исходном мутеине IL-2 или мутеина IL-2 Fc-гибридного белка, может быть осуществлено химическим или ферментативным способом. Химическое дегликозилирование требует воздействия белка на соединение трифторметансульфонаты или эквивалентного соединения. Такая обработка приводит к расщеплению большинства или всех сахаров, за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), оставляя полипептид нетронутыми. Химическое дегликозилирование описывается Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 and by Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Ферментативное расщепление углеводных остатков на полипептидов может быть достигнуто за счет использования различных эндо- и экзогликозидаз, как описано Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350.

Гликозилирование потенциальных сайтов гликозилирования может быть предотвращено путем использования соединения туницимицина, как описано Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Туницицин блокирует образование белок-N-гликозид связей.

Другой тип ковалентной модификации мутеина IL-2 или мутеина IL-2 Fc-гибридного белка включает связывание мутеина IL-2 или мутеина IL-2 Fc-гибридного белка с различными небелковыми полимерами, в том числе, но не ограничиваясь этим, с различными полиолами, в частности полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксиалкилены, в порядке, описанном под патентами США №№ 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Кроме того, аминокислотные замещения могут быть получены в различных положениях в пределах мутеина IL-2 или мутеина IL-2 Fc-гибридного белка для облегчения добавления полимеров, таких как ПЭГ. Таким образом, варианты реализации настоящего изобретения включают в себя пегилированные мутеины IL-2 и мутеин IL-2 Fc-гибридных белков. Такие пегилированные белки могут иметь увеличенный период полурастворения и/или сниженную иммуногенность сравнительно с непегилированными белками.

Полинуклеотиды, кодирующие мутеины IL-2 и мутеин IL-2 Fc-гибридных белков.

Изобретение охватывает нуклеиновые кислоты, кодирующие мутеины IL-2 и мутеин IL-2 Fc-гибридных белков. Аспекты данного изобретения включают в себя варианты полинуклеотидов (например, в связи с вырожденностью), которые кодируют аминокислотные последовательности, описанные в данном документе. В предпочтительных вариантах реализации изобретения полипептид, кодируемый выделенную нуклеиновую кислоту, является составным мутеина IL-2 Fc-гибридного белка.

Нуклеотидные последовательности, соответствующие аминокислотным последовательностям, описанным в данном документе, применяются в качестве зондов или праймеров для выделения нуклеиновых кислот или в качестве искомых последовательностей в поисковых базах данных, могут быть получены путем "обратной трансляции" из аминокислотных последовательностей. Хорошо известная процедура полимеразной цепной реакции (ПЦР) может быть использована для выделения и амплификации последовательности ДНК, кодирующей мутеин IL-2 и мутеин IL-2 Fc-гибридного белка. В качестве 5' и 3' праймеров используют олигонуклеотиды, которые определяют необходимые концы комбинации фрагментов ДНК. Олигонуклеотиды могут дополнительно содержать сайты узнавания для эндонуклеаз рест-

рикции, для облегчения введения амплифицированного комбинации фрагментов ДНК в вектор экспрессии. Методики ПЦР описаны в Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); Recombinant DNA Methodology, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), p. 189-196; and PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Молекулы нуклеиновых кислот по данному изобретению включают ДНК и РНК в обеих одноцепочечных и двухцепочечных формах, а также соответствующие комплементарные последовательности. Термин "выделенная нукleinовая кислота" означает нукleinовую кислоту, которая была отделена от смежных генетических последовательностей, присутствующих в геноме организма, из которого нукleinовая кислота была выделена, касательно нукleinовых кислот, выделенных из природных источников. Касательно нукleinовых кислот, синтезированных ферментативным путем из матрицы или химическим путем, в частности из ПЦР-продуктов, молекул кДНК или олигонуклеотидов, например, следует понимать, что нукleinовые кислоты в результате таких процессов представляют собой выделенные нукleinовые кислоты. Выделенная молекула нукleinовой кислоты относится к молекуле нукleinовой кислоты в виде отдельного фрагмента или в качестве компонента более крупной конструкции нукleinовой кислоты. В одном предпочтительном варианте реализации изобретения нукleinовые кислоты являются, по существу, свободными от загрязняющего эндогенного материала. Молекула нукleinовой кислоты предпочтительно была получена из ДНК или РНК, изолированной по меньшей мере один раз в существенно чистом виде и в количестве или концентрации, позволяющей идентификацию, манипуляцию и восстановление его компонентов нуклеотидных последовательностей стандартными биохимическими методами (например, теми, которые изложены в in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Такие последовательности предпочтительно представлены и/или получены в форме открытой рамкой считывания, непрерываемой внутренними нетранслируемыми последовательностями или инtronами, которые обычно присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслируемых ДНК могут представлять собой 5' или 3' с открытой рамкой считывания, причем аналогичные не мешают манипулированию или экспрессии кодирующей области.

Как правило, варианты согласно данному изобретению получают путем сайтнаправленного мутагенеза нуклеотидов в ДНК, кодирующей мутеин IL-2 или мутеин IL-2 Fc-гибридного белка, используя кассету или ПЦР мутагенез и другие методы, хорошо известные в данной области техники, с целью получения ДНК, кодирующей вариант, с последующей экспрессией рекомбинантной ДНК в клеточной культуре, как описано в данном документе. Кроме того, мутеин IL-2 и мутеин IL-2 Fc-гибридного белка могут быть получены путем синтеза *in vitro*, используя установленные методы. Как правило, варианты проявляют такую же качественную биологическую активность, как и природный аналог, например растяжение Т-рег, в то время как также могут быть выбраны варианты, которые имеют измененные свойства, что будет более подробно описано ниже.

Как будет понятно специалистам в данной области техники, из-за вырожденности генетического кода чрезвычайно может быть получено большое количество нукleinовых кислот, все из которых кодируют мутеины IL-2 и мутеин IL-2 Fc-гибридные белки по настоящему изобретению. Таким образом, определив конкретную аминокислотную последовательность, квалифицированные специалисты в данной области техники могут получить любое количество различных нукleinовых кислот путем простого изменения последовательности одного или более кодонов таким образом, который не изменяет аминокислотную последовательность кодируемого белка.

Настоящее изобретение также обеспечивает системы экспрессии и конструкции в форме плазмид, векторов экспрессии, кассет транскрипции или экспрессии, которые содержат по меньшей мере один полинуклеотид, как описано выше. Кроме того, настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, включающие такие системы экспрессии или конструкции.

Как правило, векторы экспрессии, используемые в любой из клеток-хозяев, будут содержать последовательности для поддержания плазиды и для клонирования и экспрессии экзогенных нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности, что избирательно называются как "фланкирующие последовательности" в некоторых вариантах, как правило, включают одну или более из следующих нуклеотидных последовательностей: промотор, одну или более последовательностей энхансера, источник репликации, транскрипционную последовательность терминации, полную последовательность интрана, содержащую донорный и акцепторный сплайсинга сайт, последовательность, кодирующую лидерную последовательность для секреции полипептида, сайт связывания рибосом, последовательности полиаденилирования, полилинкерный участок для вставки нукleinовой кислоты, кодирующей экспрессируемый полипептид и селективный маркер элемента. Каждая из этих последовательностей рассматривается ниже.

Необязательно, вектор может содержать "метку"-кодирующую последовательность, т.е. молекулу олигонуклеотида, расположенному на 5' или 3' конце мутеинов IL-2 или мутеинов IL-2 Fc-гибридных белков, кодирующих последовательность; последовательность кодирует олигонуклеотид поли-His (например, гекса-His (SEQ ID NO: 21)) или другую "метку", такую как FLAG, HA (гемаглютинин вируса гриппа) или тус, для которого существуют коммерчески доступные антитела. Как правило, данную метку тег

гибридизируют с полипептидом при экспрессии полипептида, и может служить в качестве средства для аффинной очистки или обнаружения мутеина IL-2 в клетке-хозяине. Аффинная очистка может осуществляться, например, с помощью колоночной хроматографии с использованием антител против метки в качестве аффинной матрицы. Необходимо, метка может быть впоследствии удалена из очищенных мутеинов IL-2 и мутеин IL-2 Fc-гидридного белки разными методами, в частности с использованием определенных пептидов для расщепления.

Фланкирующие последовательности могут быть гомологичными (т.е. из того же вида и/или штамма, что и клетка-хозяин), гетерологичными (т.е. из видов и штаммов, отличающихся от клетки-хозяина), гибридными (т.е. комбинацией фланкирующих последовательностей из более чем одного источника), синтетическими или нативными. Таким образом, источником фланкирующей последовательности может быть любой прокариотической или эукариотической организма, любой позвоночный и беспозвоночный организм или любое растение при условии, что фланкирующая последовательность является функциональной и может быть активирована с помощью аппарата клетки-хозяина.

Фланкирующие последовательности, используемые в векторах по данному изобретению, могут быть получены любым из нескольких способов, хорошо известных в данной области техники. Как правило, фланкирующие последовательности, используемые в данном документе, будут ранее определены за счет картирования и/или путем расщепления рестрикционной эндонуклеазой и могут быть таким образом изолированы от надлежащего источника ткани с использованием соответствующих рестрикционных эндонуклеаз. В некоторых случаях может быть известна полная нуклеотидная последовательность фланкирующей последовательности. В данном документе фланкирующие последовательности могут быть синтезированы для синтеза нукleinовых кислот или клонирования с помощью способов, описанных в данном документе.

Если известна вся или только часть фланкирующей последовательности, то она может быть получена с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или путем скрининга геномной библиотеки с подходящим зондом, таким как олигонуклеотид и/или фрагмент фланкирующей последовательности из того же или другого вида. Если боковая последовательность неизвестна, фрагмент ДНК, содержащий фланкирующую последовательность, может быть выделен из большего участка ДНК, который могут содержать, например, кодирующую последовательность или даже другой ген или гены. Выделение может быть достигнуто путем расщепления рестрикционной эндонуклеазой с целью получения надлежащего фрагмента ДНК с последующим выделением с помощью гель-агарозной очистки, колоночной хроматографии Qiagen® (Chatsworth, CA) или другими способами, известными специалистам в данной области техники. Выбор подходящих ферментов для достижения этой цели является очевидным любому рядовому специалисту в данной области техники.

Источник репликации, как правило, является частью этих прокариотических экспрессирующих векторов, что являются коммерчески доступными, и источник используется при амплификации вектора в клетку-хозяин. Если выбранный вектор не содержит источник репликации, он может быть коммерчески синтезирован, исходя из известных последовательностей и лигирован в вектор. Например, источник репликации из плазмида pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) подходит для большинства грамотрицательных бактерий, а также различных вирусных источников (например, SV40, полиомы, адено-вируса, вируса везикулярного стоматита (VSV) или папилломавируса, в частности HPV или BPV) используются для клонирования векторов в клетках млекопитающих. В целом, источник компонента репликации не является необходимым для экспрессирующих векторов млекопитающих (например, источник SV40 часто используется только потому, что он также содержит вирус раннего промотора).

Транскрипционная последовательность терминации, как правило, расположена в 3' конце участка, кодирующего полипептид, и служит для терминации транскрипции. Как правило, последовательность терминации транскрипции в прокариотических клетках является G-C-обогащенным фрагментом, за которой следует последовательность поли-T. В то время как последовательность легко клонируется из библиотеки или даже приобретается как часть вектора, она может также быть легко синтезирована с использованием методов синтеза нукleinовых кислот, таких как те, что описаны в данном документе.

Селективный маркерный ген кодирует белок, необходимый для выживания и роста клетки-хозяина, выращенной в селективной культуральной среде. Типичные селективные маркерные гены кодируют белки, которые: (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, тетрациклину или канамицину для прокариотических клеток-хозяев; (б) комплементарный ауксотрофный дефицит клетки; или (с) снабжают необходимыми питательными веществами, доступными из сложных или сред определенного состава. Конкретные селективные маркеры являются генами устойчивости к канамицину, генами устойчивости к ампициллину и генами устойчивости к тетрациклину. Предпочтительно ген устойчивости к неомицину также могут быть использованы для выбора в обеих прокариотических и эукариотических клетках-хозяевах.

Для амплификации гена, который будут поддавать экспрессии, могут быть использованы другие селективные гены. Амплификация представляет собой процесс, в котором гены, необходимые для производства белка, критического для роста или выживания клеток, повторяется в tandemе в хромосомами последующих поколений рекомбинантных клеток. Примеры подходящих селективных маркеров

для клеток млекопитающих включают дигидрофолатредуктазы (DHFR) и беспромоторные гены тими-динкиназы. Трансформанты клеток млекопитающих помещают под определенное давление, при котором только трансформанты однозначно адаптированы, чтобы выжить в силу селектируемого гена, присутствующего в векторе. Давление при отборе задается при культивировании трансформированных клеток в условиях, в которых концентрация селективного агента в среде последовательно увеличивается, что приводит к амплификации как селективного гена и ДНК, которая кодирует другой ген, такой как мутеин IL-2 или мутеин IL-2 Fc-гибридный белок. В результате, повышенное количество полипептида, в частности мутеина IL-2 или мутеина IL-2 Fc-гибридного белка, синтезируется из амплифицированной ДНК.

Сайт связывания рибосомы, как правило, необходим для инициации трансляции мРНК и характеризуется последовательностью Шайна-Дальгарно (прокариоты) или последовательности Козака (эукариоты). Элемент обычно расположен в положении 3' по отношению к промотору и в положении 5' по отношению к последовательности полипептида, что поддается экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более кодирующих участков могут быть функционально связаны с сайтом связывания рибосомы (внутренний IRES), что позволяет трансляцию двух открытых рамок считывания из одного транскрипта РНК.

В некоторых случаях, например, когда желательным является гликозилирование в системе экспрессии эукариотической клетки-хозяина, он может включать изменение различных пред- или пропоследовательностей для улучшения гликозилирования или выхода. Например, может быть изменен сайт расщепления пептидазы конкретного сигнального пептида или добавлена пропоследовательность, которая также может влиять на гликозилирование. Конечный белковый продукт может иметь в положении -1 (по отношению к первой аминокислоте зрелого белка) один или несколько дополнительных аминокислот к экспрессии, который не является полностью удаленным. Например, конечный белковый продукт может иметь один или два аминокислотных остатка, найденные в участке расщепления пептидазы, прикрепленном к аминоконцу. Кроме того, использование некоторых сайтов расщепления фермента может привести к незначительно укороченной форме необходимого полипептида, если фермент разрезает данный участок зрелого полипептида.

Экспрессирующие и клонирующие векторы по изобретению обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой, кодирующей мутеин IL-2 или Fc-гибридный белок мутеина IL-2. Промоторы представляют собой несчитываемые последовательности, расположенные в обратном направлении (т.е. 5') до стартового кодона структурного гена (обычно от примерно 100 до 1000 пар оснований), которые контролируют транскрипцию структурного гена. Промоторы можно условно разделить на два класса: индуцибельные промоторы и конститтивные промоторы. Индуцибельные промоторы инициируют повышенные уровни транскрипции с ДНК под их контролем в ответ на некоторое изменение в условиях культивирования, таких как наличие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры. Конститтивные промоторы, с другой стороны, равномерно считывают гены, с которым они функционально связаны, т.е. практически с минимальным или без контроля над экспрессией генов. Значительное количество промоторов распознается различными потенциальными клетками-хозяинами, что являются хорошо известными в данной области техники.

Подходящие промоторы для применения в дрожжевых хозяевах также хорошо известны в данной области техники. Дрожжевые энхансеры предпочтительно используются с дрожжевыми промоторами. Подходящие промоторы для использования с клетках-хозяевах млекопитающих хорошо известны и включают, но не ограничиваются ими, те, что получены из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус птичьей оспы, аденоовирус (такой как аденоовирус 2), вируса папилломы крупного рогатого скота, птичьего вируса саркомы, цитомегаловируса, ретровируса, вируса гепатита В и наиболее предпочтительно вируса обезьяны 40 (SV40). Другие подходящие промоторы млекопитающих включают гетерологичные промоторы млекопитающих, например промоторы теплового шока и промотор актина.

Дополнительные промоторы, которые могут представлять интерес, включают, но не ограничиваются ими: ранний промотор SV40 (Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); промотор CMV (Thornissen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); промотор, содержащийся в 3'-концевом повторе вируса саркомы Payca (Yamamoto et al., 1980, *Cell* 22:787-797); промотор тими-динкиназы герпеса (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); промотор и регуляторные последовательности из гена металлотионина Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42); и прокариотические промоторы, такой как промотор бета-лактамазы (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); или промотор tac (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). Также представляют интерес следующие контролирующие области транскрипции животных, которые проявляют тканевую специфичность и были использованы в трансгенных животных: контрольный сегмент гена эластазы I, который активен в ацинарных клетках поджелудочной железы (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); участок регулирования гена инсулина, который активен в панкреатических бета-клетках (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); участок генного контроля иммуноглобулина, который активен в лимфоидных клетках (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); участок регулирования вируса молочной железы мыши, который является

активным в яичках, молочной железе, лимфоидных и тучных клетках (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495); участок регулирования гена альбумина, который является активным в печени (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276); участок регулирования гена альфа-фето-протеина, который активен в печени (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 253:53-58); контрольный сегмент гена α -1-антитрипсина, который активен в печени (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171); участок регулирования гена гена β -глобина, который активен в миелоидных клетках (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); регулирующий ген базового белка миелина, который является активным в олигодендроцитных клетках мозга (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); регулирующего гена легкой цепи-2 миозина, который активен в скелетной мышце (Sani, 1985, Nature 314:283-286); и ген регулирования высвобождения гонадотропного гормона, который является активным в гипоталамусе (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

Последовательности энхансера могут быть введены в вектор, чтобы увеличить транскрипцию высших эукариот. Энхансеры представляют собой цис-действующие элементы ДНК, обычно длиной около 10-300 п.н., которые действуют на промотор для повышения транскрипции. Усилители являются относительно ориентированными и независимы относительно положения, будучи найденными в положениях 5' и 3' к транскрипционной единице. Известно, что несколько энхансерных последовательностей являются доступными из генов млекопитающих (например, глобина, эластазы, альбумина, α -фетопротеина и инсулина). Как правило, однако, используется энхансер из вируса. Энхансер SV40, энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы, аденоизвестные в данной области техники, являются примерными элементами, усиливающими активацию эукариотических промоторов. В то время как энхансер может быть расположен векторе в положении 5' или 3' к кодирующему последовательности, он, как правило, расположен в сайте 5' от промотора. Последовательность, кодирующая соответствующую нативную или гетерологичную сигнальную последовательность (лидерную последовательность или сигнальную пептидную) может быть включена в вектор экспрессии для способствования внеклеточной секреции мутеина IL-2 или Fc-гибридного белка мутеина IL-2. Выбор сигнального пептида или лидера зависит от типа клеток-хозяев, которые продуцируют белок, и гетерологичная сигнальная последовательность может заменять нативную сигнальную последовательность. Примеры сигнальных пептидов, которые являются функциональными в клетках-хозяевах млекопитающих, включают следующее: сигнальную последовательность интерлейкина-7 (IL-7), описанного в патенте США № 4965195; сигнальную последовательность рецептора интерлейкина-2, описанного в Cosman et al., 1984, Nature 312:768; сигнальный пептид интерлейкина-4 рецептора, описанного в патенте ЕР № 0367566; сигнальный пептида рецептора интерлейкин-1 I типа, описанного в патенте США № 4968607; сигнальный пептида рецептора интерлейкин-1 II типа, описанного в патенте ЕР № 0460846.

Вектор может содержать один или более элементов, которые способствуют экспрессии, если вектор интегрирован в геном клетки-хозяина. Примеры включают элемент EASE (Aldrich et al. 2003 Biotechnol Prog. 19:1433-38) и участок прикрепления матрикса (MAR). MAR является посредником структурной организации хроматина и может изолировать интегрированный вектор от воздействия "позиции". Таким образом, MAR применяются, в частности, при использовании вектора для создания стабильных трансфектантов. Ряд природных и синтетических MAR-содержащих нуклеиновых кислот известны в данной области техники, например патенты США №№ 6239328; 7326567; 6177612; 6388066; 6245974; 7259010; 6037525; 7422874; 7129062.

Векторы экспрессии по данному изобретению могут быть сконструированы из исходного вектора, в частности из коммерчески доступного вектора. Такие векторы могут содержать или не содержать все желаемые фланкирующие последовательности. Если один или более из фланкирующих последовательностей, описанных в данном документе, не присутствует в векторе, они могут быть индивидуально получены и лигированы в вектор. Способы, используемые для получения каждой из фланкирующих последовательностей, хорошо известны специалистам в данной области техники.

После того как вектор был построен и молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая мутеин IL-2 или мутеин IL-2 Fc-гибридного бека была введена в соответствующий сайт вектора, полученный вектор может быть введен в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептида. Преобразование вектора экспрессии в выбранной клетке-хозяине может быть достигнуто с помощью хорошо известных методов, включая трансфекцию, инфекцию, фосфат-кальциевое соосаждение, электропорацию, микропункцию, липофекцию, DEAE-декстран-опосредованную трансфекцию или других известных методов. Выбранный способ будет частично зависеть от типа клетки-хозяина, которая будет использоваться. Эти способы и другие подходящие способы хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области техники и изложены, например, в Sambrook et al., 2001, выше.

Клетка-хозяин при культивировании в подходящих условиях синтезирует мутеин IL-2 или Fc-гибридного белка мутеина IL-2, который впоследствии может быть собран из культуральной среды клетки-хозяина (если клетка-хозяин секретирует его в среду) или непосредственно из клетки, продуцирующей его (если он не секретируется). Выбор подходящей клетки-хозяина будет зависеть от различных факторов, таких как желаемый уровень экспрессии, полипептидные модификации, которые желательны

или необходимы для активности (например, гликозилирования или фосфорилирования) и легкости складывания в биологически активную молекулу. Клетка-хозяин может быть прокариотической или эукариотической.

Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, иммортализованные клеточные линии, доступных из Американской коллекции типовых культур (ATCC) и любые клеточные линии, используемые в системе экспрессии, известной в данной области техники, могут использоваться для получения рекомбинантных полипептидов согласно данному изобретению. В общем, клетки-хозяева, трансформированные вектором рекомбинантной экспрессии, который содержит ДНК, кодирующую желаемый мутеин IL-2 или мутеин IL-2 Fc-гибрида. Клетки-хозяева, которые могут быть использованы, представляют собой прокариоты, дрожжи или высшие эукариотические клетки. Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например *E.coli* или бациллы. Высшие эукариотические клетки включают клетки насекомых и установленные клеточные линии млекопитающих. Примеры подходящих клеток-хозяев млекопитающих линий включают в себя линию COS-7 клеток почек обезьян (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), L-клетки, клетки 293, клетки C127, клетки 3T3 (ATCC CCL 163), клетки яичника китайского хомячка (CHO) или их производные, такие как Veggie CHO и родственные клеточные линии, которые растут в бессывороточной среде (Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31), клетки HeLa, клеточные линии BHK (ATCC CRL 10), и линию клеток CVI/EBNA, получены из африканской зеленой обезьяны линии клеток почки CVI (ATCC CCL 70), как описано McMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821, эмбриональные клетки почки человека, такие как 293, 293 EBNA или MSR 293, клетки эпидермиса человека A431, клетки человека Colo205, другие трансформированные клеточные линии приматов, нормальные диплоидные клетки, клеточные штаммы, полученные из культуры в пробирке первичной ткани, первичных эксплантов, HL-60, U 937, Нак или клеток Jurkat. Необходимо, клеточные линии млекопитающих, такие как НерG2/3B, KB, NIH-3T3 или S49, например, могут быть использованы для экспрессии полипептида, когда желательным является использование полипептида в различных сигналах трансдукции или репортерных анализах.

В качестве альтернативы, могут продуцироваться полипептиды в низших эукариотах, таких как дрожжи или у прокариотах, что представляют собой бактерии. Подходящие дрожжи включают *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces strains*, *Candida* или любой штамм дрожжей, способный экспрессировать гетерологичные полипептиды.

Подходящие бактериальные штаммы включают *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* или любой бактериальной штамм, способный экспрессировать гетерологичные полипептиды. Если полипептид получен из дрожжей или бактерий, может быть желательной модификация полипептида, полученного из них, например, путем фосфорилирования или гликозилирования соответствующих сайтов для получения функционального полипептида. Такие ковалентные прикрепления могут быть осуществлены с использованием известных химических или ферментативных методов.

Материалы и способы экспрессии систем бакуловируса/клетки насекомого являются коммерчески доступными в форме набора, например, из Invitrogen, San Diego, Calif., U.S.A. (the MaxBac® kit), и такие способы хорошо известны в данной области техники, как описано в Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) и Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988). Бесклеточные системы трансляции также могут быть использованы для получения полипептидов с использованием РНК, полученных из конструкций нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе. Соответствующее клонирование и экспрессия векторов для использования с бактериальными, грибковыми, дрожжевыми и клетками-хозяевами млекопитающих описаны Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual., Elsevier, New York, 1985). Клетка-хозяин, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту по данному изобретению, предпочтительно функционально связана по меньшей мере с одной последовательностью, контролирующей экспрессию, является "рекомбинантной клеткой-хозяина".

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую человеческий мутеин IL-2, который предпочтительно стимулирует Т-регуляторные клетки и содержит замещение V91K и аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по крайней мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, описанной под SEQ ID NO: 1. Выделенная нуклеиновая кислота может кодировать любой из примерных мутеинов IL-2, представленных в данном документе.

Также включены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из примерных Fc-гибридных белков мутеина IL-2, описанного в данном документе. В предпочтительных вариантах реализации изобретения часть Fc антитела и мутеина IL-2 человека кодируются в пределах одной открытой рамки считывания, необязательно с линкером, что кодируется между участком Fc и мутеином IL-2.

В другом аспекте предусмотренные в данном документе экспрессирующие векторы включают указанный выше мутеин IL-2 или Fc-гибридный белок мутеина IL-2, кодирующий нуклеиновые кислоты, функционально связанные с промотором.

В другом аспекте предусмотренные в данном документе клетки-хозяева, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные выше мутеины IL-2 или Fc-гибридный белок мутеина IL-2. Клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку, такую как E.coli, или может быть эукариотической клеткой, такой как клетка млекопитающего. В некоторых вариантах реализации изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку клеточной линии яичника китайского хомячка (CHO).

В другом аспекте в данном документе представлены способы получения мутеина IL-2 человека. Способы, включающие культивирование клетки-хозяина в условиях, при которых экспрессируется промотор, функционально связанный с человеческим мутеином IL-2. Впоследствии человеческий мутеин IL-2 получают из указанной культуры. Мутеин IL-2 может быть получен из культуральной среды и/или лизатов клеток-хозяев.

В другом аспекте в данном документе предусмотрены способы получения человеческого Fc-гибридного белка мутеина IL-2. Способы, включающие культивирование клетки-хозяина в условиях экспрессии промотора, функционально связанного с человеческим Fc-гибридным белком мутеина IL-2. Впоследствии человеческий IL-2 мутеин FC-слитый белок собирают из указанной культуры. Fc-гибридный белок мутеина IL-2 человека может быть получен из культуральной среды и/или лизатов клеток-хозяев.

Фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах реализации изобретение представляет собою фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество мутеина IL-2 с фармацевтически эффективным растворителем, носителем, солюбилизатором, эмульгатором, консервантом и/или адьювантом. В конкретных вариантах реализации изобретения мутеин IL-2 включается в содержание Fc-гибридного белка мутеина IL-2. Фармацевтические композиции по данному изобретению включают, но не ограничиваясь ими, жидкие, замороженные и лиофилизированные композиции.

Предпочтительно компоненты составов являются нетоксичными для реципиента в используемых дозах и концентрациях. В конкретных вариантах реализации изобретения представлены фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество терапевтической молекулы, содержащей мутеин IL-2, например Fc-гибрид мутеина IL-2.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат составные вещества для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения композиции. В таких вариантах реализации изобретения надлежащие составные вещества содержат, но не ограничиваясь ими, аминокислоты (например, глицин, глутамин, аспарагин, аргинин, пролин или лизин); противомикробные препараты; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или сульфит гидрокарбоната натрия); буферы (такие как борат, бикарбонат, Tris-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); наполнители (такие как маннит или глицин); хелатирующие агенты (такие как этилендиаминететрауксусная кислота (ЭДТА)); комплексообразующие агенты (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды; и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (например, сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители, вкусовые добавки и разбавители; эмульгаторы; гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как хлоридベンзалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); спирты сахаров (таких как маннит или сорбит); супсендирующие агенты; поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты (например, плюроники, ПЭГ, сложные эфиры сорбита, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тринитротолуол, трометамин, лецитин, холестерин, тиоксапал); агенты, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); агенты, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочного металла, предпочтительно натрия или хлорида калия, маннит сорбит); носители; разбавители; наполнители и/или фармацевтические адьюванты. См., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18 Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

В некоторых вариантах реализации изобретения оптимальная фармацевтическая композиция определяется квалифицированным специалистом в данной области техники исходя из, например, предполагаемого пути введения, формата доставки и необходимого дозирования. См., например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше. В некоторых вариантах реализации изобретения данные композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса антител связывающих белков *in vivo* по данному изобретению. В некоторых вариантах реализации изобретения основной растворитель или носитель в фармацевтической композиции может быть как водной, так и неводной природы. Например, надлежащий растворитель или носитель может представлять собой воду для инъекций, физиологический раствор или искусственную спинномозговую жидкость с возможным добавлением других веществ, используемых в композициях для парентерального введения. Нейтральный солевой буфер или физиологический раствор, смешанный с сывороточным альбумином,

представляют собой дополнительные примеры растворителей. В конкретных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат трис-буфер с pH приблизительно 7,0-8,5 или ацетатный буфер с pH приблизительно 4,0-5,5 и могут дополнительно содержать сорбит или соответствующий ему аналог. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции мутеина IL-2 могут быть получены для хранения путем смешивания выбранной композиции, имеющей желаемую степень чистоты с необязательными составляющими агентами (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше) в форме лиофилизированной таблетки или водного раствора. Кроме того, в некоторых вариантах реализации изобретения препарат мутеина может быть получен как лиофилизат с использованием надлежащего наполнителя, в частности сахараозы.

Фармацевтические композиции по изобретению могут быть выбраны для парентеральной доставки. Альтернативно, данные композиции могут быть выбраны для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например перорально. Приготовление таких фармацевтически приемлемых композиций находится в пределах квалификации специалистов в данной области техники. Компоненты композиции присутствуют предпочтительно в концентрациях, приемлемых для области введения. В некоторых вариантах реализации изобретения буферы используются для поддержания композиции при физиологическом pH или при незначительно ниже pH, как правило, в пределах диапазона pH от около 5 до около 8.

При предполагаемом парентеральном введении терапевтических композиции для применения в настоящем изобретении могут быть представлены в виде апирогенного, приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего необходимую композицию мутеина IL-2 в фармацевтически приемлемом растворителе. Особенно подходящим растворителем для парентерального введения является стерильная дистиллированная вода, в которой композиция мутеина IL-2 представляет собой стерильный изотонический раствор, что хранится надлежащим образом. В некоторых вариантах реализации изобретения препарат может включать состав необходимой молекулы с агентом, таким как инъецируемые микросфера, биоразрушаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислоты), гранулы или липосомы, которые могут обеспечить контролируемое или замедленное высвобождение вещества, которое может быть доставлено с помощью инъекции замедленного всасывания. В некоторых вариантах реализации изобретения также может быть использована гиалуроновая кислота, способствуя устойчивой продолжительности циркуляции. В некоторых вариантах реализации изобретения для введения композиции мутеина IL-2 могут быть использованы имплантируемые устройства доставки лекарственного средства.

Дополнительные фармацевтические композиции очевидны квалифицированным специалистам в данной области техники, включая составы, содержащие композиции мутеина IL-2 в составах пролонгированной или контролированной доставки. Квалифицированным специалистам в данной области техники также известны методы создания множества других пролонгированных или контролируемых средств доставки, таких как липосомные носители, биологически разрушающиеся микрочастицы или пористые гранулы и инъекция веществ замедленного всасывания. См., например, международная патентная заявка PCT/US 93/00829, которая включена путем ссылки и описывает регулируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с замедленным высвобождением могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Устойчивые матрицы высвобождения могут включать сложные полизэфиры, гидрогели, полилактиды (как раскрыто в патенте США № 3773919 и публикации европейской патентной заявке № EP 058481, каждая из которых включена путем ссылок), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 и Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляная кислота (публикация европейской патентной заявки № EP 133988). Устойчивые композиции с высвобождением могут также включать липосомы, которые могут быть получены любым из нескольких способов, известных в данной области техники. См., например, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; публикации европейских патентных заявок № EP 036676; EP 088046 и EP 143949 включены посредством ссылок.

Фармацевтические композиции, используемые для введения *in vivo*, как правило, представлены в виде стерильных препаратов. Стерилизация может быть достигнута путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембранны. В случае лиофилизации композиций стерилизация с использованием данного способа может быть проведена либо до, либо после лиофилизации и восстановления. Композиции для парентерального введения могут храниться в лиофилизированной форме или в растворе. Как правило, парентеральные композиции обычно помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, прокалываемую иглой для подкожных инъекций.

Аспекты настоящего изобретения включают в себя составы мутеина IL-2 с буферными свойствами, которые могут применяться как фармацевтические композиции, как описано в международной патентной заявке WO 06138181 A2 (PCT/US 2006/022599), которая включена в данный документ во всей своей полноте в качестве ссылки.

Как описано выше, некоторые варианты реализации изобретения представляют собой композиции мутеина IL-2, в частности фармацевтические Fc-гибридные белки мутеина IL-2, которые содержат в дополнение к композиции мутеина IL-2 одно или несколько вспомогательных веществ, в частности те, что иллюстративно описаны в данном разделе и в других местах данного документа. В данном изобретении в связи с этим вспомогательные вещества могут быть использованы для различных целей, в частности для регулирования физических, химических или биологических свойств составов, таких как регулирования вязкости и/или процессов по настоящему изобретению для повышения эффективности и/или для стабилизации таких составов и процессов предотвращающих разложение и порчу в связи с, например, стрессовыми условиями, которые возникают в процессе производства, перевозки, хранения, подготовкой к использованию и введением и впоследствии.

Доступно разнообразие экспозиций для стабилизации белка и разработки материалов и способов, используемых в данной области, в частности Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm. Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution," in: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology, 13:61-84 (2002), and Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," Pharm. Biotechnol. 13:159-75 (2002), каждый из которых включен в данный документ в качестве ссылки в полном объеме, в частности в разделах, имеющих отношение к вспомогательным веществам и сходным процессам разработки белков со способностью поддержания pH в соответствии с данным изобретением, особенно в отношении белковых фармацевтических продуктов и процессов для применения в ветеринарии и/или для лечения человека целях.

Соли могут быть использованы в соответствии с некоторыми вариантами реализации изобретения, например для регулирования ионной силы и/или изотоничности композиции, и/или для улучшения растворимости и/или физической стабильности белка или другого ингредиента композиции согласно данному изобретению.

Как известно, ионы могут стабилизировать нативное состояние белков путем связывания с заряженными остатками на поверхности белка и защиты заряженных и полярных групп в белке и уменьшения прочности их электростатических взаимодействий, сил притяжения и отталкивания. Ионы могут также стабилизировать денатурированное состояние белка путем связывания с, в частности, денатурированными пептидными связями (-CONH) белка. Кроме того, ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами в белке может также уменьшить межмолекулярные электростатические взаимодействия и тем самым предотвратить или уменьшить агрегацию белка и нерастворимость.

Ионные виды значительно отличаются по своим воздействиям на белки. Был разработан ряд категорий рейтингов ионов и их влияния на белки, которые могут быть использованы при разработке фармацевтических композиций в соответствии с изобретением. Одним из примеров является серия Гофмейстера, которая классифицирует ионные и полярные неионные растворимые вещества по их влияния на конформационную стабильности белков в растворе. Стабилизирующие растворенные вещества называются "космопротинами." Дестабилизирующие растворенные вещества называются "хаотропами." Космопротопы обычно используются при высоких концентрациях (например, >1 моль сульфата аммония), чтобы осадить из раствора белки ("высаливание"). Хаотропы обычно используются для замены и/или солюбилизации белков ("всаливание"). Относительная эффективность ионов "всаливания" и "высаливания" определяет свою позицию в серии Гофмейстера.

Свободные аминокислоты могут быть использованы в составах мутеина IL-2 в соответствии с различными вариантами реализации изобретения как вспомогательные вещества, стабилизаторы и антиоксиданты, а также для других стандартных применений. Лизин, пролин, серин и аланин могут быть использованы для стабилизации белков в композиции. Глицин применяется во время лиофилизации с целью обеспечения надлежащей структуры и свойств лиофилизата. Аргинин может быть использован для ингибирования агрегации белка как в жидких, так и лиофилизованных композициях. Метионин применяется в качестве антиоксиданта.

Полиолы включают сахара, например маннит, сахарозу и сорбитол, и многоатомные спирты, такие как, например, глицерин и пропиленгликоль, и в целях, раскрытых в данном документе, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и сопутствующие вещества. Полиолы являются космопротинами. Они используются как стабилизирующие агенты как в жидких, так и в лиофилизованных составах для защиты белков от процессов физического и химического разрушения. Полиолы пригодны также для регулирования тоничности составов.

Полиолы, используемые в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, представляют собой маннит, что широко используется с целью обеспечения структурной стабильности лиофилизата в лиофилизованных составах. Это обеспечивает структурную стабильность лиофилизата. Как правило, он используется с лиопротектором, например сахарозой. Сорбит и сахароза являются предпочтительными агентами для регулирования тоничности и стабилизаторами для защиты от стрессового воздействия замораживания-оттаивания во время транспортировки или при подготовке нарасфасованной продукции во время производственного процесса. Редуцирующие сахара (которые содержат свободные альдегидные или кетонные группы), в частности глюкоза и лактоза, могут гликозировать поверхностные остатки ли-

зина и аргинина. Таким образом, они, как правило, не являются предпочтительными полиолами для использования в соответствии с данным изобретением. Кроме того, сахара, что образуют такие реакционноспособные частицы, в частности сахароза, которая гидролизуется до фруктозы и глюкозы в кислой среде, и, следовательно, способствует гликозированию, также не входит в число предпочтительных полиолов по данному изобретению в этом отношении. ПЭГ применяются для стабилизации белков и с данной целью могут быть использованы как криопротектора в данном изобретении.

Варианты реализации составов мутеина IL-2 дополнительно содержат поверхностно-активные вещества. Белковые молекулы могут быть восприимчивы к адсорбции на поверхности и к денатурации и последующего агрегирования на поверхности раздела воздух-жидкость, твердое тело-жидкость и жидкость-жидкость. Данное воздействие, как правило, масштабно обратно пропорционально концентрации белка. Данные разрушительное взаимодействие, как правило, масштабно обратно пропорционально концентрации белка и в основном усугубляется физическим перемешиванием, в частности генерируемым во время перевозки и обработки продукта.

Поверхностно-активные вещества обычно используются для предотвращения, минимизации или снижения поверхностной адсорбции. Поверхностно-активные вещества, используемые по данному изобретению с этой целью, включают полисорбат 20, полисорбат 80, другие сложные эфиры жирных кислот и полиэтиоксилатов сorbitана и полоксамера 188.

Поверхностно-активные вещества также широко используются для мониторинга конформационной стабильности белка. Применение поверхностно-активных веществ с данной целью является белок-специфичным, поскольку любая данная поверхность, как правило, будет стабилизировать одни белки и дестабилизировать другие.

Полисорбаты подвержены окислительному разложению и часто на момент поставки содержат значительное количество пероксидов, что вызывает окисление остаток боковых цепей белка, особенно метионина. Следовательно, полисорбаты должны быть использованы с большой осторожностью и в случае использования должны вносится в самой низкой эффективной концентрации. В связи с этим полисорбаты иллюстрируют общее правило, что вспомогательные вещества должны быть использованы в их минимальных эффективных концентрациях.

Варианты реализации составов мутеина IL-2 дополнительно содержат один или несколько антиоксидантов. В некоторой степени вредное окисление белков можно предотвратить в фармацевтических препаратах, поддерживая соответствующие уровни кислорода и температуры окружающей среды, а также за счет предотвращения воздействия света. Антиоксидантные наполнители могут быть использованы также для предотвращения окислительной деструкции белков. Антиоксиданты, используемые в данном аспекте, представляют собой восстановители, антиоксиданты кислорода/свободных радикалов и хелатообразователи.

Антиоксиданты для использования в терапевтических составах белка в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно являются водорастворимыми и поддерживают их активность на протяжении всего срока годности продукта. ЭДТА является предпочтительным антиоксидантом в соответствии с изобретением в этом отношении.

Антиоксиданты могут разрушать белки. Например, восстановители, в частности такие как глутатион, могут нарушать внутримолекулярные дисульфидные связи. Таким образом, антиоксиданты для использования в настоящем изобретении выбирают так, чтобы, среди прочего, устраниТЬ или значительно уменьшить возможность разрушения самих белков в составе.

Составы в соответствии с данным изобретением могут включать ионы металлов, которые представляют собой белковые кофакторы и которые необходимы для образования координационных комплексов белка, в частности, цинк необходим для формирования определенных инсулиновых супензий. Ионы металлов также могут ингибировать некоторые процессы, которые разрушают белки. Однако ионы металлов также катализируют физические и химические процессы, которые разрушают белки.

Ионы магния (10-120 мМ) могут применяться для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты в изоаспарагиновую кислоту. Ионы Ca^{+2} (до 100 мМ) могут повышать устойчивость человеческой дезоксирибонуклеазы. Однако Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} могут приводить к дестабилизации рЧДНКазы. Аналогичным образом Ca^{+2} и Sr^{+2} может стабилизировать фактор VIII, он может дестабилизоваться Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} , Cu^{+2} и Fe^{+2} , и его агрегация может быть увеличена за счет ионов Al^{+3} .

Варианты состава мутеина IL-2 дополнительно содержат один или несколько консервантов. Консерванты необходимы при разработке парентеральных препаратов для многократного приема, которые включают более одного извлечения из того же контейнера. Их основная функция заключается в ингибировании роста микроорганизмов и поддержании стерильности продукта в течение срока годности или срока использования лекарственного препарата. Обычно используемые консерванты включают бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Несмотря на то что консерванты характеризуются длительным периодом использования с низкомолекулярными парентеральными препаратами, разработка белковых составов, что содержит консерванты, может быть сложной задачей. Консерванты фактически всегда характеризуются дестабилизирующим воздействием (агрегацией) на белки, и это стало основным фактором, ограничивающим их использование в белковых составах для многократного приема. На сегодняшний день

большинство белковых препаратов разработано только для однократного приема. Однако в случае возможности использования многодозовых составов они имеют дополнительное преимущество, способствуя удобству пациента и повышенной конкурентоспособности. Гормон роста человека (hGH) является целесообразным примером того, как разработка составов, содержащих консерванты, привела к коммерциализации более удобной формы выпуска в виде шприца-ручки для многоразового использования. В настоящее время на рынке доступно по крайней мере четыре таких устройства в виде ручек, содержащих составы hGH с консервантами. Norditropin (нордитропин) (жидкий препарат, Novo Nordisk), Nutropin AQ (нутропин AQ) (жидкий препарат, Genentech) и Genotropin (генотропин) (лиофилизированный препарат - двухкамерный картридж, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, в то время как в состав Somatropin (Eli Lilly) входит м-крезол.

Некоторые аспекты должны быть рассмотрены в процессе технологии получения лекарственных препаратов и разработки лекарственных форм, содержащих консерванты. Эффективная концентрация консерванта в лекарственном средстве должна быть оптимизирована. Это требует проверки данного консерванта в лекарственной форме в диапазоне концентраций, которые способствуют антимикробной эффективности без нарушения стабильности белка.

Как и следовало ожидать, разработка жидких составов, содержащих консерванты, является более сложной по сравнению с лиофилизованными составами. Лиофилизированные продукты могут быть лиофилизированы без консерванта и восстановлены консервантом, содержащим разбавитель во время применения. Это сокращает время контактирования консерванта с белком, значительно минимизируя связанные с этим риски стабильности. В жидких составах антисептическая эффективность и стабильность должна поддерживаться в течение всего срока годности продукта (около 18 до 24 месяцев). Следует отметить важный аспект, что эффективность консерванта должна быть продемонстрирована в конечном составе, содержащем активное лекарственное средство и все компоненты вспомогательного вещества.

Как правило, составы мутеина IL-2 разработаны для конкретных путей и способов введения, для конкретного дозированного введения и частоты введения, конкретного лечения конкретных заболеваний, с диапазонами биодоступности и стойкости, помимо прочего. Таким образом, составы могут быть разработаны в соответствии с настоящим изобретением для доставки любым подходящим путем, включая, но не ограничиваясь, пероральным, ауральным, офтальмологическим, ректальным, и вагинальным, и парентеральным путем, в том числе за счет внутривенной и внутриартериальной инъекции, внутримышечной инъекций и подкожной инъекции.

После составления фармацевтическая композиция может храниться в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого, кристаллического либо же в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие составы могут храниться либо в готовой к употреблению или в форме (например, лиофилизированной), которая восстанавливается перед введением. Настоящее изобретение также относится к наборам для получения единицы доз однократного введения. Наборы по настоящему изобретению могут содержать как каждый первый контейнер, имеющий сухой белок, так и второй контейнер, имеющий водную композицию. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения представлены наборы, содержащие одно- и многокамерные шприцы предварительного заполнения (например, шприцы с жидким составом и лиофилизатом).

Терапевтически эффективное количество для использования мутеина IL-2, содержащего фармацевтическую композицию, будет зависеть, например, от терапевтического предназначения и показаний. Специалистам в данной области техники будет понятно, что соответствующие уровни доз для лечения могут варьироваться в зависимости, в частности, от доставленной молекулы, для индикации которой используется мутеин IL-2, путем введения, а также телосложения (масса тела, поверхность тела или размер органа) и/или состояния (возраст и общее состояние здоровья) пациента. В некоторых вариантах реализации изобретения клиницист может варьировать дозу и модифицировать способ введения для получения оптимального терапевтического эффекта. Типичная доза может варьироваться от примерно 0,1 мкг/кг до приблизительно до 1 мг/кг или более в зависимости от указанных выше факторов. В конкретных вариантах реализации изобретения доза может варьироваться от 0,5 мкг/кг до около 100 мкг/кг, необязательно, от 2,5 мкг/кг до около 50 мкг/кг.

Терапевтически эффективное количество мутеина IL-2 предпочтительно приводит к уменьшению тяжести симптомов заболевания, к увеличению частоты или продолжительности болезни бессимптомных периодов или к предотвращению нарушений или инвалидности вследствие угнетения заболевания.

Фармацевтические композиции могут вводится с использованием медицинских устройств. Примеры медицинских устройств для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США №№ 4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851 и 5399163, которые включены в данный документ посредством ссылок.

Способы лечения аутоиммунных расстройств или воспалительных заболеваний.

В некоторых вариантах реализации изобретения мутеин IL-2 по настоящему изобретению используются для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания. В предпочтительных вариантах реализации изобретения применяется мутеин IL-2 Fc-гибридного белка.

Расстройства, которые особенно поддаются лечению описанным в данном документе мутеином IL-2, включают, но не ограничиваются ими, воспаление, аутоиммунное заболевание, атопические заболевания, парапластические аутоиммунные заболевания, воспаление хряща, артрит, ревматоидный артрит, ювенильный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, системное начало ювенильного ревматоидного артрита, ювенильный анкилозирующий спондилоартрит, ювенильный энтеропатический артрит, ювенильный реактивный артрит, ювенильный синдром Рейтера, SEA синдром (синдром серонегативности, энтеропатии, артропатии), ювенильный дерматомиозит, ювенильный псoriатический артрит, ювенильный склеродермия, ювенильную системную красную волчанку, юношеский васкулит, ревматоидный артрит, ревматоидный полиартрит, системное начало ревматоидного артрита, анкилозирующего спондилита, энтеропатический артрит, реактивный артрит, синдром Рейтера, SEA синдром (синдром серонегативности, энтеропатии, артропатии), дерматомиозит, псoriатический артрит, склеродермию, васкулит, миозит, полимиозит, дерматомиозит, полиартериит, гранулематоз Вегенера, артериит, ревматическую полимиалгию, саркоидоз, склероз, первичный билиарный склероз, склерозирующий холангит, синдром Шегрена, псoriаз, псoriазную бляшку, каплевидный псoriаз, обратный псoriаз, пустулезный псoriаз, эритродермический псoriаз, дерматит, атопический дерматит, атеросклероз, волчанку, болезнь Стилла, системную красную волчанку (СКВ), миастению, воспалительные заболевания кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, целиакию, рассеянный склероз (MS), астму, ХОБЛ, риносинусит, риносинусит с полипами, эозинофильный эзофагит, эозинофильный бронхит, болезнь Гийена-Барре, диабет I типа, тиреоидит (например, болезнь Грейвса), болезнь Адисона, синдром Рейно, аутоиммунный гепатит, GVHD, отторжение транспланта, повреждение почек, гепатит С-индуцированного васкулит, спонтанную потерю беременности и т.п.

В предпочтительных вариантах реализации аутоиммунное или воспалительное расстройство представляет собой красную волчанку, болезнь трансплантата против хозяина, гепатит С-индуцированный васкулит, сахарный диабет I типа, множественный склероз, спонтанную потерю беременности, атопические заболевания и воспалительные заболевания кишечника.

Способы экспансии Т-рег клеток.

Мутеин IL-2 или мутеин IL-2 Fc-гибридных белков может быть использован для экспансии Т-рег клеток у субъекта или в образце. В данном документе представлены способы повышения соотношения Т-рег клеток относительно нерегуляторных Т-клеток. Способ включает приведение в контакт Т-клеток с эффективным количеством мутеина IL-2 человека или мутеина IL-2 Fc-гибридного белка. Соотношение может быть измерено путем определения соотношения CD3⁺FOXP3⁺ клеток CD3⁺ в клетках FOXP3⁺ в популяции Т-клеток. Типичная частота Т-рег в крови человека составляет 5-10% от общего числа CD3⁺CD4⁺ Т-клеток, однако, для заболеваний, перечисленных выше, этот процент может быть выше или ниже. В предпочтительных вариантах реализации изобретения процент Т-рег увеличивается по крайней мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 500%, по меньшей мере на 600%, по меньшей мере на 700%, по меньшей мере на 800%, по меньшей мере на 900%, или по крайней мере на 1000%. Максимальное увеличение числа Т-рег может отличаться от болезней; однако максимальная частота Т-рег, которая может быть получена с помощью воздействия на мутеин IL-2, составляет 50 или 60% от общего числа CD4⁺CD3⁺ Т-клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения мутеин IL-2 или мутеин IL-2 Fc-гибридного белка вводят субъекту, причем соотношение регуляторных Т-клеток (Tregs) к не-регуляторным Т-клеткам в периферической крови субъекта возрастает.

Поскольку мутеин IL-2 и мутеин IL-2 Fc-гибридных белков преимущественно увеличивают Т-рег по сравнению с другими типами клеток, они также могут быть использованы для увеличения соотношения регуляторных Т-клеток (Т-рег) по отношению к естественным клеткам-киллерам (NK) в периферической крови субъекта. Соотношение может быть измерено путем определения соотношения CD3⁺FOXP3⁺ клеток к CD16⁺ и/или CD56⁺ лимфоцитов, которые представляют собой CD19⁺ и CD3⁺.

Предполагается, что мутеины IL-2 или мутеин Fc-гибридных белков могут иметь терапевтическое воздействие на заболевание или расстройство пациента без значительного увеличения соотношения Т-рег и нерегуляторных Т-клеток или NK-клеток в периферической крови пациента. Терапевтический эффект может быть обусловлен локализованной активностью Fc-гибридного белка IL-2 или мутеина IL-2 в участке воспаления или аутоиммунности.

Примеры

Следующие примеры и фактические, и примеры возможного использования, которые даны с целью иллюстрации конкретных вариантов или особенностей настоящего изобретения и не предназначены для ограничения его объема.

Пример 1. Снижение числа мутаций, которые придают высокую аффинность к CD25.

ИЛ-2 мутеины с повышенной аффинностью к CD25 и сниженной силой сигналов через ИЛ-2Р β преимущественно способствуют росту и функционированию Т-рег. Чтобы уменьшить потенциальную иммуногенность, было найдено минимальное число мутаций, необходимых для достижения высокой

аффинности к CD25.

Кристаллическая структура ИЛ-2 в комплексе с его тремя рецепторами (PDB код - 2B5I) показывает, что V69A и Q74P находятся в спиральной структуре, которая взаимодействует с CD25. Это может объяснить, почему V69A и Q74P часто изолировали в двух независимых скринингах мутагенеза ИЛ-2 для высокой степени сродства к CD25 (Rao et al. 2005; Thanos et al. 2006). Этот пример изучает, какие из других мутаций в ИЛ-2 мутеине "2-4", определены в скрининге Rao et al., являются наиболее важными для повышения сродства более того, что наблюдается в случае только V69A и Q74P. Следующие белки подвергали скринингу с помощью проточной цитометрии для связывания с CD25 на поверхности активированных Т-клеток. Все конструкции также включали С-концевой FLAG и поли-His метку для очистки и обнаружения. Конкретные мутации представлены в скобках

HaMut1D (V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:8)

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL

EEELKPLEEALNLAPSKN

FHLRPRDLISDINVIVLEKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut2D (N30S, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:9)

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINSYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL

LEEELKPLEEALNLAPSKN

FHLRPRDLISDINVIVLEKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut3D (K35R, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:10)

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLARMLTFKFYMPKKATELKHLQCL

LEEELKPLEEALNLAPSKN

FHLRPRDLISDINVIVLEKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut4D (T37A, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:11)

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLARMLTFKFYMPKKATELKHLQCL

LEEELKPLEEALNLAPSKN

FHLRPRDLISDINVIVLEKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut5D (K48E, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:12)

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL

LEEELKPLEEALNLAPSKN

FHLRPRDLISDINVIVLEKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut6D (E68D, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:13)

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL

LEEELKPLEEDALNLAPSKN

FHLRPRDLISDINVIVLEKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut7D (N71R, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:14)

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL

EEELKPLEEALRLAPSKN

FHLRPRDLISDINVIVLEKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut8D (K35R, K48E, E68D, N88D, C125A) (SEQ ID NO:15)

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL

LEEELKPLEDVNLNAQSKN

FHLRPRDLISDINVIVLEKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut7D связывается с CD25 с почти такой же аффинностью как исходный изолят "2-4" (~200 пм), что указывает на то, что мутация N71R способна значительно увеличивать аффинность больше, чем наблюдается только при V69A, Q74P (HaMut1D, ~2 нм). Другие конструкции обладали аффинностью аналогичной или немного большей, чем HaMut1D, за исключением HaMut8D, аффинность которого лишь незначительно выше, чем у ДТ (wild type=дикий тип) ИЛ-2.

Пример 2. Мутеины ИЛ-2, гибридизованные с доменами IgG1-Fc для увеличения времени полужизни.

Мы оценили различные гибридизации между ИЛ-2 и IgG1-Fc доменами для уменьшения частоты дозирования необходимого для достижения обогащения Трег мутеином ИЛ-2. Домены Fc содержали точечные мутации, нарушающие эффекторные функции опосредованные IgG1, такие как лизис клеток-мишеней. Мутации эффекторных функций Fc, используемые в наших исследованиях, - это либо A327Q, Ala Ala (L234A+L235A), либо N297G. Поскольку Трег-селективные мутеины ИЛ-2 имеют частичное снижение активности ИЛ-2, было важно провести гибридизацию ИЛ-2 с Fc таким образом, чтобы существенно не повлиять на передачу сигнала рецептором ИЛ-2Р (IL-2R). Таким образом, мутеины ИЛ-2 были протестированы на предмет активации IL-2R при гибридизации с Fc и без.

Чтобы определить, увеличит ли димеризация ИЛ-2 при гибридизации Fc силу передачи сигнала ИЛ-2Р из-за повышенной авидности ИЛ-2Р, более слабый мутеин ИЛ-2 (haD5) (US 20110274650) был гибридизован с N-концом Fc, выделенным с помощью линкерной последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 5). Данный мутеин имел 3 мутации, влияющие на передачу сигнала ИЛ-2Р (E15Q, H16N, N88D), 8 мутаций для придания высокой аффинности к CD25 (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) (Rao et al., 2005), и C125S для предотвращения ошибочного спаривания и агрегации цистеина. Гибридизация с Fc таким образом полностью нейтрализовала биологическую активность haD5, в то время как было увеличено его высокоаффинное связывание с CD25 клеточной поверхности, скорее всего, из-за повышенной авидности от димеризации.

Мутеины ИЛ-2 были также гибридизованы с N- или С-концом гетеродимера Fc так, что только одна цепь димера Fc несет домен ИЛ-2. Гетеродимерному спариванию между двумя асимметричными цепями Fc способствовали электростатические взаимодействия между введенным лизином в одной цепи Fc и введенной аспарагиновой кислотой в другой цепи Fc. Мутеин ИЛ-2 haD6 был гибридизован с N-концом одной цепи Fc или другой, в том случае, если одна из конфигураций была предпочтительной, получая на выходе две белковые конструкции, названные haD6.FcDD и haD6.FcKK. Мы также гибридизовали мутеин haMut7D с С-концом Fc-гетеродимера с одним или двумя линкерами GGGGS (SEQ ID NO: 5) (FcKK (G4S) haMut7D, FcKK (G4S) 2haMut7D). Гибридизация мутеина ИЛ-2 haD6 с N-концом Fc-гетеродимера привела к частичной потере активности относительно свободного haD6 как в pSTAT5, так и в экспериментах Т-клеточной пролиферации. В противоположность этому гибридизация haMut7D с С-концом Fc-гетеродимера с одним или двумя линкерами GGGGS (SEQ ID NO: 5) не изменяла специфическую активность haMut7D.

Также была исследована гибридизация мутеина ИЛ-2 с С-концом гомодимера Fc. Общие МКПК активируются в колбах с тканевой культурой T75 с 300 миллионами клеток на 100 мл со 100 нг/мл анти-CD3 (OKT3). На 3 сутки культивирования клетки промывали 3 раза и оставляли в покое в свежей среде на 3 суток. Затем клетки стимулировали вариантами ИЛ-2 при титровании 10-кратными дозами в диапазоне от 1 пм до 10 нм до конечного объема 50 мкл. Уровень фосфорилирования STAT5 измеряли с помощью набора буферов BD phosflow. Вкратце, 1 мл лизирующего/фикссирующего буфера BD phosflow был добавлен, чтобы остановить стимуляцию. Клетки фиксировали в течение 20 мин при 37°C и пермеабилизировали с 1× пермеабилизующим буфером BD phosflow на льду перед тем, как окрашивать для CD4, CD25, FOXP3 и pSTAT5.

Как можно увидеть на фиг. 1, биологическая активность мутеинов haMut1D и haMut7D не была изменена в результате гибридизации с С-концом гомодимера Fc. Таким образом, гибридизация между N-концом ИЛ-2 и С-концом Fc не подвергала опасности агонистической активность мутеинов ИЛ-2, даже в контексте гомодимера Fc.ИЛ-2. В этих конструкциях мутация C125A была использована вместо C125S для улучшения производства.

Пример 3. Настройка специфической активности мутеина ИЛ-2 для достижения селективного роста Т-рег.

Исходная панель мутеинов ИЛ-2 содержала единственную N88D или с 1 или 2 дополнительными мутациями, влияющими на передачу сигнала ИЛ-2Р. Вторая панель мутеинов, все с отдельными точечными мутациями, была разработана с целью выявления мутеинов с либо аналогичным, либо несколько более мощным агонизмом, чем у серии N88D. Панель из 24 мутаций передачи сигнала определена на основе прогнозируемых ИЛ-2Рβ взаимодействующих аминокислот (кристаллической структуры, PDB код - 2B5I). Были отобраны конкретные замены на основе прогнозируемого снижения свободной энергии связи между мутеином и ИЛ-2Рβ. Свободная энергия связи была рассчитана с использованием вычислительного алгоритма EGAD (Handel's Laboratory Калифорнийского университета в Сан-Диего, США). Свободная энергия связи мутанта определяется как

$$\Delta\Delta G_{\text{mut}} = \mu(\Delta G_{\text{mut}} \Delta G_{\text{wt}}),$$

где μ (=0,1, в целом) является коэффициентом масштабирования для нормализации прогнозируемых изменений аффинности связывания, чтобы иметь уклон 1 при сравнении с экспериментальными энергиями (Pokala и Handel 2005). Свободная энергия диссоциации (ΔG) была определена как разность энергий между комплексом (ΔG_{bound}) и свободными состояниями (ΔG_{free}).

Энергия диссоциации ΔG_{mut} была рассчитана для каждой замены.

Панель мутеинов ИЛ-2 со следующими заменами (H16E, H16Q, L19K, D20R, D20K, D20H, D20Y, M23H, D84K, D84H, S87Y, N88D, N88K, N88I, N88H, N88Y, V91N, V91K, V91H, V91R, I92H, E95K, E95R или E95I) экспрессировалась как С-концевые гибриды с гетеродимером Fc. Эти конструкции также содержали мутации haMut7 для высокой аффинности связывания CD25 (V69A, N71R, Q74P) и C125A для эффективной укладки.

Панель подвергали скринингу на активность в анализе фосфорилирования STAT5 в Т-клетках согласно примеру 2, и было обнаружено, что H16E, D84K, V91N, V91K и V91R обладают меньшей активностью, чем дикий тип ИЛ-2, и большей, чем N88D (фиг. 2). H16E, D84K, V91N, V91K и V91R обладали меньшей активностью, чем дикий тип ИЛ-2, и большей, чем N88D.

Отобранные мутеины также были протестированы в анализах роста Т-клеток и NK-клеток.

Для анализа Т-клеток общие МКПК в 3 млн/мл активировали со 100 нг ОКТ3. На 2-е сутки клетки промывали 3 раза и оставляли в покое в свежей среде на 5 суток. Затем клетки метили с помощью карбоксифлуоресцеин сукцинимидил эфира (CFSE) и дополнительно культивировали в 24-луночном планшете при 0,5 млн/лунку в ИЛ-2-содержащей среде в течение 7 дней до анализа с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS). Пролиферация субпопуляций Т-клеток представлена на фиг. 3 как разведение CFSE (средняя флуоресценция CFSE).

Для анализа NK-клеток культивировали NK-клетки CD16⁺, отсортированные с помощью магнитоактивированного клеточного сортинга (MACS), в ИЛ-2-содержащей среде в течение 3 дней при 0,1 млн/лунку в 96-луночных планшетах. 0,5 мкКи ³H-тимидина было добавлено в каждую лунку в течение последних 18 ч инкубации. Результаты показаны на фиг. 4.

Мутанты H16E, D84K, V91N, V91K, а также мутанты V91R были способны стимулировать рост Т-рег аналогично ДТ ИЛ-2, но были примерно в 10 раз менее активны в других Т-клетках (фиг. 3) и примерно в 100 раз менее активны в NK-клетках (фиг. 4).

Была разработана отдельная панель гибридных белков Fc.ИЛ-2, в которых расстояние между гетеродимером Fc и мутеином haMut7 (V69A, N71R, Q74P, C125A) было уменьшено путем вырезания группы отдельных аминокислот

```

Fc . haMut7  Fc . . . TQKSLSLSPGKGCGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILN . . . haMut7
(SEQ ID NO:22)

Trunc1  Fc . . . TQKSLSLSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILN . . . haMut7 (SEQ ID NO:23)
Trunc2  Fc . . . TQKSLSLS - STKKTQLQLEHLLDLQMILN . . . haMut7 (SEQ ID NO:24)
Trunc3  Fc . . . TQKSLSLS - - TKKTQLQLEHLLDLQMILN . . . haMut7 (SEQ ID NO:25)
Trunc4  Fc . . . TQKSLSLS - - - KKTQLQLEHLLDLQMILN . . . haMut7 (SEQ ID NO:26)
Trunc5  Fc . . . TQKSLSLS - - - - KTQLQLEHLLDLQMILN . . . haMut7 (SEQ ID NO:27)
Trunc6  Fc . . . TQKSLSLS - - - - - TQLQLEHLLDLQMILN . . . haMut7 (SEQ ID NO:28)
Trunc7  Fc . . . TQKSLSLS - - - - - - QLQLEHLLDLQMILN . . . haMut7 (SEQ ID NO:29)
Trunc8  Fc . . . TQKSLSL - - - - - - QLQLEHLLDLQMILN . . . haMut7 (SEQ ID NO:30)

```

Trunc1-Trunc4 обладал активностью такой же как исходная конструкция полной длины Fc.haMut7, что определено с помощью фосфорилирования STAT5 и пролиферации Т-клеток и NK-клеток и описано на фиг. 2-4. Trunc5 и Trunc6 стимулировали слабые ответы, но все еще сильнее, чем те, что стимулировались мутациями N88D (haD и haMut7D) и очень подобны тем, что стимулировались V91K. Trunc7 был слабее, чем мутеины N88D, а Trunc8 проявлял очень низкую активность. Однако при тестировании в NK-клетках Trunc5 и Trunc6 были более сильными агонистами, чем V91K, что указывает на то, что селективность Т-рег легче достигается мутациями передачи сигнала, а не стерическим несоответствием для проксимального домена Fc.

Пример 4. Мутации высокой аффинности CD25 в контексте гомодимера Fc.

Мутации, которые предоставляют высокую аффинность связывания CD25, считались выгодными, потому что они увеличивали тропизм Т-клеток с высоким уровнем экспрессии CD25 (CD25-high) и способствовали долгосрочной ассоциации CD25::ИЛ-2 мутеин и длительной передачи сигнала. Однако уменьшение количества мутаций может уменьшить потенциал иммуногенности. Мутеины N88D или V91K с и без мутаций V69A и Q74P высокой аффинности haMut1 экспрессировались в виде гибридов с С-концом гомодимера Fc и сравнивались по биологической активности. В анализах стимуляции pSTAT5 гомодимеризация не имела никакого эффекта на силу сигнала по отношению к мономерному мутеину. Реверсия высокоаффинных мутаций V69A и Q74P также не влияла на передачу сигнала pSTAT5. В анализах роста Т-клеток высокоаффинные мутации снижали активность в обычных CD4 Т-клетках и CD8 Т-клетках, но не в регуляторных Т-клетках (фиг. 5). Высокоаффинные мутации также не изменяли пролиферативные ответы в NK-клетках (фиг. 6).

Чтобы определить, влияют ли высокоаффинные мутации на ответы Т-клеток *in vivo*, мы давали до-

зы гибридных протеинов Fc.ИЛ-2-мутеина гуманизированным мышам (NOD.SCID.II2rg-нuleвые мыши реконструированные с помощью человеческих CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток) и контролировали развитие Т-рег. NOD.SCID.II2rg-нuleвых (NSG) мышей (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) в возрасте семи недель облучали (180 рад) и реконструировали с помощью 94000 CD34⁺ гемопоэтических эмбриональных стволовых клеток печени человека. На 21-й неделе мышей распределили на 6 групп, основанных на равномерном распределении процентов химеризма (определенено с помощью проточной цитометрии лимфоцитов периферической крови (ЛПК) и делали подкожные инъекции 1 мкг указанных гибридных белков Fc-мутеин или натрий-фосфатного буфера на 0- и 7-й день. На 11-й день частота субпопуляций Т-клеток в крови была определена с помощью проточной цитометрии. При низкой дозе 1 мкг на животное высокоаффинные мутации не улучшали развитие Трег сверх того, что наблюдалось лишь при N88D или V91K мутациях (фиг. 7).

Развитие Трег является селективным в том, что количество FOXP3⁻CD4⁺ Т-клеток не увеличивалось в избытке по отношению к общему количеству лейкоцитов периферической крови (ЛПК), которые включают смесь человеческих В- и Т-клеток, а также миелоидных клеток мышей. Кроме того, при более высоких дозах высокоаффинные мутации стимулировали увеличение количества CD25⁺ Т-клеток FOXP3⁻, тем самым уменьшая селективность Т-рег. Таким образом, применительно к гомодимеру Fc высокоаффинные мутации не были отнесены к необходимым для стимуляции преимущественного роста Т-рег

Fc.WT	IgG1Fc (N297G_de1K)::G4S::huIL-2 (C125A)	(SEQ ID NO:16)
	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWY	
	VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY	
	RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPSREEM	
	TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE	
	WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ	
	KSLSLSPQ	
	<u>GGGGS</u>	
	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQC	
	LEEELKPLEEVNLIAQSKNFHLRPRDLI	
	SNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	
	Fc.haMut1V91KIgG1Fc (N297G_de1K)::G4S::huIL-2 (V69A, Q74P, V91K, C125A) (SEQ ID NO:17)	
	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWY	
	VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY	
	RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPSREEM	
	TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE	
	WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ	
	KSLSLSPQ	
	<u>GGGGS</u>	
	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQC	
	LEEELKPLEEVNLAPSKNFHLPRLDI	
	SNINKIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	

Fc.V91K IgG1Fc (N297G_delK) ::G4S::huIL-2 (V91K, C125A) (SEQ ID NO:18)

DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG
GGGGS
APTSSTKKTQLLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQC
LEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLI
SNINKIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

Fc.haMut1N88DIgG1Fc (N297G_delK) ::G4S::huIL-2 (V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:19)

DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG
GGGGS
APTSSTKKTQLLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQC
LEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLI
SDINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

Fc.N88DIgG1Fc (N297G_delK) ::G4S::huIL-2 (N88D, C125A) (SEQ ID NO:20)

DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG
GGGGS
APTSSTKKTQLLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQC
LEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLI
SDINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

Пример 5. Продолжительная ассоциация Fc.ИЛ-2-мутеина с поверхностным клеточным CD25.

Неожиданным результатом в исследованиях на гуманизированных мышах было то, что несмотря на их пониженную способность к передаче сигналов мутеины индуцированной более надежное (устойчивое) обогащение Трег по сравнению с Fc.ДТ ИЛ-2. Большее обогащение Т-рег и положительная регуляция (повышение экспрессии) FOXP3 по сравнению с тем, что показан для Fc.ДТ, наблюдалось при дозе 1 мкг/мышь (фиг. 7) и при более низкой дозе 0,5 мкг/мышь (фиг. 8). Такая увеличенная активность *in vivo* может быть результатом снижения потребления Т-клетками, что делает большее количество Fc.ИЛ-2-мутеина доступным для длительной передачи сигнала.

В исследованиях фармакокинетики *in vitro* и *in vivo* не удалось, однако, показать значительное увеличение устойчивости FC.V91K или FC.N88D по сравнению с Fc.ДТ в супернатантах из активированных культур Т-клеток или сыворотки из дозированных мышей. Поскольку гибриды Fc несут два домена мутеина Ил-2, мы предположили, что увеличение эндосомального рециклинга может привести к длительной ассоциации с клеточной поверхностью в связи с увеличеннойavidностью CD25. Действительно, мы обнаружили, что FC.V91K и FC.N88D сохранялись более эффективно, чем Fc.ДТ, на поверхности ранее активированных Т-клеток после кратковременного воздействия гибридными белками (фиг. 9).

Общие МКПК были предварительно простимулированы в течение 2 дней с помощью 100 нг/мл ОКТ3. Клетки собирали, промывали 4 раза и оставляли в покое на ночь в среде. Затем клетки сенсибилизировали 400 пм Fc.ИЛ-2 в течение 30 мин при 37°C. После сенсибилизации клетки либо собирали для

T0 после одного отмывания, либо промывали еще 3 раза в 12 мл теплой среды и культивировали в течение 4 ч. Для обнаружения связанного с клетками Fc.ИЛ-2 клетки окрашивали anti-human IgG-FITC (Jackson Immunoresearch) и anti-CD25-APC.

Пример 6. Оптимизация последовательности гибридов.

В доклинических исследованиях на мышах наши Fc.ИЛ-2-мутеины показали (дифференциальное воздействие при концентрации в сыворотке крови интактных молекул сопоставимой с порцией человеческого Fc, что указывает на циркуляцию катаболитов человеческого Fc. Для оптимизации стабильности *in vivo* и фармакокинетики наших Fc.ИЛ-2-мутеинов мы охарактеризовали модификации последовательности гибридов по их воздействию на протеолитический распад Fc.ИЛ-2-мутеинов в системном кровотоке и по утилизации через ретикулоэндотелиальную систему. Следующие конструкции были оценены по протеолитическому распаду *in vitro* и *in vivo*

(Ala_AlA)_G4S	...TOKSLSLSPCKGGGGSAPTSSTKKTQL...	ha7N88D (SEQ ID NO:31)
(N297G_delK)_G4S	...TOKSLSLSPG GGGGSAPTSSTKKTQL...	ha1V91K (SEQ ID NO:32)
(N297G_KtoA)_AAPT	...TOKSLSLSPGA APTSSSTKKTQL...	ha1V91K (SEQ ID NO:33)
(N297G_KtoA)_AAPA	...TOKSLSLSPGA APASSSTKKTQL...	ha1V91K (SEQ ID NO:34)

Устойчивость была измерена с помощью количественных иммуноанализов, сравнивая в течение времени концентрации общего человеческого Fc с интактным Fc.ИЛ-2-мутеином. Протеолиз Fc.ИЛ-2-мутеинов был подтвержден с помощью вестерн-блоттинга с использованием антител anti-IL-2 и anti-human Fc с последующим иммунозахватом и определением методом масс-спектрометрии. Определение катаболитов (Ala_AlA) G4S методом масс-спектрометрии из образцов *in vitro* и *in vivo* выявило лизин (Lys) C-концевого домена Fc как сайт протеолитического расщепления. Делеция или мутация лизина C-концевого домена Fc ((N297G delK) G4S и (N297G KtoA) AAPT) приводило к длительной стабильности *in vitro* в мышиной сыворотке при 37°C по сравнению с конструкциями Fc с C-концевым лизином ((Ala_AlA) G4S). Даная длительная стабильность в сыворотке *in vitro* объясняет большую устойчивость в мышах, что было измерено областью под кривой зависимости концентрации Fc.ИЛ-2-мутеина в сыворотке крови от времени (AUC). Даная длительная устойчивость Fc.ИЛ-2-мутеинов, лишенных C-концевого лизина Fc, наблюдалось также *in vitro* в сыворотке яванского макака и человека. Мутация Thr-3 в ИЛ-2 на Ala ((N297G KtoA) AAPA) привела к снижению стабильности *in vitro* при 37°C (по сравнению с (N297G KtoA) AAPT) в мышиной сыворотке и в отдельных инкубациях с рекомбинантным человеческим катепсином D и L. Этот низкий уровень стабильности в сыворотке *in vitro* объясняет более низкую устойчивость (AUC) (N297G KtoA) AAPA у мышей *in vivo* по сравнению с (N297G KtoA) AAPT. Определением катаболитов (N297G KtoA) AAPA в образцах *in vitro* и *in vivo* методом масс-спектрометрии идентифицировали Лиз 8 и Лиз 9 домена мутеина ИЛ-2 как остатки, восприимчивые к протеолизу, что не наблюдалось у эквивалентных образцов (N297G KtoA) AAPT. Сниженная стабильность (N297G KtoA) AAPA при 37°C по сравнению с (N297G KtoA) AAPT также наблюдалась *in vitro* в сыворотке яванского макака и человека.

Из-за важности гликозилирования в этой области и для потенциального улучшения технологичности гибридного белка гибридные последовательности были изменены, чтобы способствовать N-связанному, а не O-связанному, гликозилированию следующим образом.

Исходный

IgG1Fc (N297G_delK)::G4S::huIL-2 (V91K, C125A)

TOKSLSLSPGGGGSAPTSSTKKTQL (SEQ ID NO:32)

Измененный

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(T3N,V91K,C125A)
ID NO:35)

TOKSLSLSPGGGGSAPNSSTKKTQL (SEQ

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(T3N,S5T,V91K,C125A)
ID NO:36)

TOKSLSLSPGGGGSAPNSTSTKKTQL (SEQ

IgG1Fc(N297G_delK)::GGNGT::huIL-2(T3A,V91K,C125A)
ID NO:37)

TOKSLSLSPGGNGTAPASSSTKKTQL (SEQ

IgG1Fc(N297G_delK)::YGNGT::huIL-2(T3A,V91K,C125A)
ID NO:38)

TOKSLSLSPGYGNGTAPASSSTKKTQL (SEQ

Пример 7. Определение фармакокинетики/фармакодинамики на яванского макака.

Стандартные ИЛ-2-стимулирующие иммунные методы лечения требуют безмедикаментозные канукулы (без воздействия) между циклами дозирования, чтобы избежать нежелательных побочных эффектов. В отличие от этого методы лечения на основе развития или стимуляции Т-рег могут требовать длительного воздействия с непрерывными уровнями лекарственных препаратов (C_{min} в сыворотке крови), достаточных для стимуляции Трег, но с максимальным воздействием (C_{max} в сыворотке крови) ниже уровня лекарственных препаратов, который приводит к иммунной активации. Даный пример демонстрирует тактики дозирования мутеинов с расширенным периодом полураспада у яванских макак для дли-

тельного поражения цели (C_{min} в сыворотке крови), сохраняя максимальное воздействие (C_{max} в сыворотке крови) ниже уровня лекарственных препаратов, что рассматривается как необходимый для провоспалительной иммунной активации.

Яванским макакам дозированно вводили Fc.V91K (IgG1Fc(N297G delK)::G4S::huIL-2(V91K, C125A) в четырех группах (A-D), где трем группам (A-C) дозированно вводили подкожно и одной группе (D) - внутривенно. В каждой группе четырем биологически интактным самцам яванских макак дозировали препарат согласно тактике дозирования, описанной ниже. Подкожное введение мутеинов с расширенным периодом полураспада может обеспечить большую лимфатическую абсорбцию, в результате чего уменьшается максимальное воздействие (C_{max} в сыворотке) и/или более надежные фармакологическая реакции (развитие Трег). Тактика дозированного введения в группе A состоит из трех последовательных доз равных 10 мкг на килограмм на 0-, 2- и 4-й день в цикле 1 и 10 мкг на килограмм на 14 день, что обеспечивает длительное поражение цели, похожее как в случае с более высокой начальной дозой в 50 мкг на килограмм, при поддержании более низкого максимального воздействия (C_{max}). Тактика дозированного введения в группе B - 50 мкг на килограмм вводили на 0- и 14-й день для сравнения с группой A. Тактика дозированного введения в группе C - 50 мкг на килограмм вводили на 0- и 28-й день. Разрешение определения, необходимо ли покрытие для поддержания богащения Т-рег или же выгодны безмединентозные каникулы между циклами введения доз. Тактика внутривенного в переднюю лапу дозированного введения в группе B - 50 мкг на килограмм вводили на 0-й день, что давало возможность сравнивать максимальное воздействие (C_{max}) и различия в развитии Т-рег с показателями при подкожном введении доз.

Фармакокинетика (количественный иммуноанализ интактных молекул и общего человеческого Fc), антитела к лекарственному препарату, выделение растворимого CD25 и цитокины сыворотки крови (ИЛ-1 β , ФНО- α , ИФН- γ , ИЛ-10, ИЛ-5, ИЛ-4 и ИЛ-13) измеряются в следующих временных точках для каждой группы по введению доз как установлено:

Группа А: перед использованием препарата (первый цикл; доза 1), 48 (перед использованием препарата в первом цикле; доза 2), 96 (перед использованием препарата в первом цикле; доза 3), 100, 104, 120, 168, 216, 264, 336 (перед использованием препарата во втором цикле), 340, 344, 360, 408, 456, 504, 576, 672, 744, 840 и 1008 ч.

Группа В: перед использованием препарата (первый цикл), 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336 (перед использованием препарата во втором цикле), 340, 344, 360, 408, 456, 504, 576, 672, 744, 840 и 1008 ч.

Группа С: перед использованием препарата (первый цикл), 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336, 408, 504, 672 (перед использованием препарата во втором цикле), 676, 680, 696, 744, 792, 840, 912, 1008, 1080 и 1176 ч.

Группа D: перед использованием препарата (первый цикл), 0,25, 1, 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336, 408, 504 и 672 ч.

Фармакодинамика (иммунофенотипирование и подсчет Трег, нерегуляторных CD4 и CD8 Т-клеток и NK-клеток в периферической крови) измеряется в следующих временных точках для каждой группы по введению доз как установлено.

Группа А: перед использованием препарата (первый цикл; доза 1), 96 (перед использованием препарата в первом цикле; доза 3), 168, 336 (перед использованием препарата во втором цикле), 456 и 576 ч.

Группа В: перед использованием препарата (первый цикл), 120, 240, 336 (перед использованием препарата во втором цикле), 456 и 576 ч.

Группа С: перед использованием препарата (первый цикл), 120, 240, 672 (перед использованием препарата во втором цикле), 792 и 912 ч.

Группа D: перед использованием препарата (первый цикл), 120 и 240 ч.

Гематологию и клиническую химию оценивали на всех животных и дозовых группах по дозе перед использованием препарата и через 24 ч после первоначальной дозы в каждой дозовой группе. Оценивали следующие параметры.

Гематология:

количество лейкоцитов (общее и абсолютный дифференциал);

количество эритроцитов

гемаглобин;

гематокрит;

средний эритроцитарный гемоглобин, средний объем эритроцитов, средняя концентрация гемоглобина (определяется с расчетом);

абсолютные ретикулоциты;

количество тромбоцитов;

морфология клеток крови;

ширина распределения эритроцитов;

средний объем тромбоцитов.

Клиническая химия:

щелочной фосфатазы;

общий билирубин (с прямым билирубином, если общий билирубин выше 1 мг/дл);
 аспартатаминотрансфераза;
 аланинаминотрансфераза;
 гамма-глутамилтрансфераза;
 азот мочевины;
 креатинин;
 общий белок;
 альбумин;
 глобулин и альбумин-глобулиновый индекс;
 глюкоза;
 общий холестерин;
 триглицериды;
 электролиты (натрий, калий, хлор);
 кальций;
 фосфор.

Пример 8. Агликозилированный Fc IgG1.

Природные антитела IgG обладают сайтом гликозилирования в константном домене 2 тяжелой цепи (CH2). Например, у антител IgG1 человека есть сайт гликозилирования, который находится в положении Asn297 (нумерации ЕС). На сегодняшний день стратегии для создания агликозилированных антитела включают замену остатка аспарагина (Asn) на аминокислоту, которая напоминает Asn по физико-химическим свойствам (например, глицин Gln) или Ala остаток, имитирующий боковую цепь Asn без полярных групп. Этот пример демонстрирует преимущества замены Asn на глицин (N297G). N297G Fc - это агликозилированные молекулы с лучшими биофизическими свойствами и признаками технологичности (например восстановление в процессе очистки).

Исследование многих известных кристаллических структур фрагментов Fc и антител IgG показало значительную гибкость конформации в области гликозилированного сегмента петли, особенно в положении Asn297, который гликозилируется. Во многих из известных кристаллических структур Asn297 принимает положительный двугранный угол каркаса). Gly имеет высокую склонность к принятию положительного двугранного угла каркаса из-за отсутствия атомов боковой цепи. Таким образом, по причине такой конформации и структуры Gly может быть лучше для замены Asn, чем N297Q или N297A.

Мутирование Asn297 на Gly приводит к агликозилированию молекул с весьма улучшенными выходом (или эффективностью) в процессе очистки и биофизическими свойствами. Например, процент выхода (конечный выход) из пула белков A для мутации N297G был 82,6% по сравнению с 45,6% для N297Q и 39,6% для N297A. Анализы на колонке SPHP показали, что более низкий процент выхода для мутантов N297Q и N297A был связан с образованием размытых пиков, что указывает на высокомолекулярную агрегацию и/или неправильную упаковку видов. Этот результат был подтвержден в более широком 2L масштабе.

В биофармацевтической промышленности молекулы с потенциальной необходимостью крупномасштабного производства, например потенциал для продажи в качестве лекарственного средства, оцениваются по ряду признаков, чтобы уменьшить риск того, что молекулы не поддаются крупномасштабному производству и очистке. При оценивании технологичности N297G показал устойчивость на изменении pH. Для N297G не было вопроса агрегации; в то время как N297Q и N297A показали увеличение агрегации на 20 и 10% соответственно. Несмотря на то что N297G имел лучшие признаки технологичности, он был похож на N297Q и N297A во всех функциональных анализах, в которых был протестирован. Например, в анализах антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), у N297G отсутствовала цитотоксичность аналогично N297Q и N297A.

Пример 9. Стабилизированный агликозилированный Fc IgG1.

Этот пример описывает способ улучшения стабильности каркасов антител IgG путем введения сконструированной дисульфидной связи(ей). Природные антитела IgG - это стабильные молекулы. Тем не менее для некоторых применений в лечебных целях может быть необходимо проводить мутации или создавать агликозилированные молекулы. Например, агликозилированные молекулы IgG могут быть использованы при показаниях к применению, когда существует необходимость избежать АЗКЦ и связывания с рецепторами Fcgamma. Однако у агликозилированный IgG1 значительно ниже температуры плавления (температуры плавления домена CH2 уменьшается примерно на 10; 70 до 60°C), чем у гликозилированного IgG1. Наблюдаемая сниженная температуры плавления негативно сказывается на различных биофизических свойствах агликозилированного IgG1. Например, агликозилированный IgG1 обладает большим уровнем агрегации при низком pH по сравнению с гликозилированным IgG1.

Для того чтобы сконструировать дисульфидные связи, изначально использовали метод на основе структуры, включающий расчет расстояния между атомами C-alpha для идентификации 54 пар остатков в области Fc для мутации Cys. Эти 54 сайта были дополнительно сужены до 4 пар остатков (V259C-L306C, R292C-V302C, A287C-L306C и V323C-I332C). Используемые параметры включали (I) позиции внутри домена CH2, (II) удаленность от петель, спиралей и углеводов, (III) удаленность от рецептора Fc

gamma и сайтов взаимодействия FcRn, (IV) доступность растворителя (предпочтительные скрытие позиции) и т.д.

Парные замены цистеина были созданы в контексте агликозилированного N297G Fc. Исследование в невосстановливающих условиях пептидного картирования показало, что 3 из 4 инженерных сайтов формировали дисульфидную связь, как и ожидалось, и разрабатывались с этой целью. Мутация V259C-L306C приводила к некорректному образованию дисульфидных связей и к ошибочному спариванию с природным дисульфидом, уже присутствующим в домене CH2. Остальные три конструкции R292C-V302C, A287C-L306C и V323C-I332C формировали дисульфидные связи правильно как было спрогнозировано и разработано. Добавление дисульфидных связей в мутацию N297G привело к улучшению термической стабильности на 15С, чем в случае только мутации N297G. Среди дисульфидных вариантов R292C-V302C, A287C-L306C и V323C-I332C хорошей фармакокинетикой при введении крысам ($T_{1/2}$ 11 дней и 9 дней соответственно) обладали R292C-V302C и A287C-L306C. Данные отличаются от фармакокинетического профиля, который мы наблюдали у крыс в предыдущей публикации посвященной дисульфидным связям L247C-K339C в домене CH2 (Gong et al., J. Biol. Chem., 284(2009):14203-14210), который имел $T_{1/2}$ 5 дней.

Конструирование дисульфидной связи в области домена CH2 повышает стабильность агликозилированной молекулы наравне с гликозилированными молекулами IgG1 (улучшение температуры плавления от 10 до 15°C, как определено методом дифференциальной сканирующей калориметрии). Инженерные сайты, описанные в данном документе, не приводят к перепутыванию дисульфидов, и дисульфиды образуются как прогнозируется в приблизительно 100% популяции. Что еще более важно, в отличие от опубликованных сайтов дисульфидных связей в CH2-домене, дисульфидные связи, описанные в данном документе, не влияют на фармакокинетику у крыс.

Фармакокинетический (PK) профиль стабилизированных агликозилированный антител определяли у макак. Антитела IgG1, имеющие замены N297G, A287C и L306C (Ab2-1) и антитела IgG1, имеющие замены N297G, R292C и V302C (Ab2-2), вводили макакам (N=2) подкожно в концентрации 5 мг/кг. Образцы сыворотки отбирали перед использованием препарата, на 0,5, 2, 8, 24, 48, 96, 168, 336, 504, 672, 840, 1 008, 1 176, 1 344, 1 512 и 1 680 ч после использования препарата. Образцы анализировали на уровнях антител Ab2-1 и Ab2-2 с помощью многослойного ИФА с anti-hu IgG. Для измерения уровня hu IgG в сыворотке в образцах фармакокинетического исследования использовали следующую методику: 1/2 площади черного планшета (Corning 3694) покрывали 2 мкг/мл anti-hu IgG, антителами 1.35.1 в натрий-fosfatном буфере, а затем инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшет затем промывали и блокировали с помощью I-Block™ (Applied Biosystems) в течение ночи при 4°C. Если пробы необходимо было разводить, то они были разведены в сыворотке макак. Стандарты и образцы затем разводили 1:20 в 1× натрий-фосфатном буфере + 1M раствор NaCl + 0,5% Твин 20 и 1% буфера БСА (5% сыворотки). Планшет промывали и 50 мкл проб разбавленных стандартов и образцов были перенесены в планшет, покрытый антителами 1.35.1, и инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Планшет промывали, а затем 50 мкл anti-hu Fc-антител (100 нг/мл) в комплексе с 21.1-пероксидазой хрена в I-Block™ + 5% БСА и инкубировали в течение 1,5 ч. Планшет промывали, затем добавляли 50 мкл субстрата Пико, после чего планшеты сразу анализировали с помощью люминометра. Данные по концентрации анализировали с использованием некомpartmentных методов с помощью WinNonLin® (Enterprise version 5.1.1, 2006, Pharsight® Corp. Mountain View, CA).

Фармакокинетическое выделение антител Ab2-1 и Ab2-2 у макак сравнивали с антителами IgG1, содержащими замену только N297G, и антителами IgG1, содержащими N297G, L247C и K339C.

Фармакокинетическое выделение антител Ab2-1 и Ab2-2 у макак было в обоих случаях выше, чем антител IgG1, содержащих замену только N297G, и антител IgG1, содержащих N297G, L247C и K339C. Кроме того, Ab2-2 проявляли воздействие и клиренс, сравнимые с родительскими антителами IgG1.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> AMGEN INC.

<120> Агликозированные Fc-содержащие полипептиды

<130> A-1892-WO-PCT

<150> 61/784, 669

<151> 2013-03-14

<160> 44

<170> PatentIn, версии 3.5

<210> 1
<211> 133
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<220>
<221> MOD_RES
<222> (125)..(125)
<223> Cys, Ser, Val or Ala

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

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

<220>
<221> MOD_RES
<222> (125)..(125)
<223> Cys, Ser, Val or Ala

032863

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 3

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

032863

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 4

<211> 226

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 4

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

032863

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Pro Gly
225

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

032863

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 6

Gly Gly Asn Gly Thr
1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 7

Tyr Gly Asn Gly Thr
1 5

<210> 8
<211> 133
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

032863

100

105

110

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 9
<211> 133
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 10
<211> 133
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

032863

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 11

<211> 133

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 11

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

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

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

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys

032863

50 55 60

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 12

<211> 133

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 13
<211> 133
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 14
<211> 133
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 14

Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

032863

1

5

10

15

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 15

<211> 133

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 16
<211> 364
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид
<400> 16

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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

032863

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
225 230 235 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
245 250 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
260 265 270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
275 280 285

Cys Leu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala
290 295 300

Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
305 310 315 320

Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
325 330 335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
355 360

<210> 17
<211> 364
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

032863

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 17

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
225 230 235 240

032863

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
245 250 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
260 265 270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
275 280 285

Cys Leu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala
290 295 300

Pro Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
305 310 315 320

Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
325 330 335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
355 360

<210> 18

<211> 364

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 18

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

032863

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
225 230 235 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
245 250 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
260 265 270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
275 280 285

Cys Leu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala
295 300

Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
305 310 315 320

Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
325 330 335

032863

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
355 360

<210> 19
<211> 364
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид
<400> 19

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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

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

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

032863

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
225 230 235 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
245 250 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
260 265 270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
275 280 285

Cys Leu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala
290 295 300

Pro Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile
305 310 315 320

Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
325 330 335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
355 360

<210> 20

<211> 364

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 20

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

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

032863

20

25

30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
225 230 235 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
245 250 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
260 265 270

032863

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
275 280 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala
290 295 300

Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile
305 310 315 320

Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
325 330 335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
355 360

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая метка 6xHis

<400> 21

His His His His His His
1 5

<210> 22

<211> 42

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 22

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
20 25 30

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
35 40

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 23

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20 25 30

<210> 24

<211> 29

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 24

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
1 5 10 15

Leu Glu His Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20 25

<210> 25

<211> 28

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 25

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu
1 5 10 15

Glu His Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20 25

<210> 26

<211> 27

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 26

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1 5 10 15

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20 25

<210> 27
<211> 26
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид
<400> 27

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

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20 25

<210> 28
<211> 25
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид
<400> 28

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

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20 25

<210> 29
<211> 24
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
<400> 29

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

Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20

<210> 30
<211> 23
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 30

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

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20

<210> 31

<211> 29

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 31

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20 25

<210> 32

<211> 28

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 32

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ala
1 5 10 15

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20 25

<210> 33

<211> 24

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 33

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala Pro Thr Ser Ser
1 5 10 15

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20

<210> 34
<211> 24
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
<400> 34

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala Pro Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20

<210> 35
<211> 28
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
<400> 35

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ala
1 5 10 15

Pro Asn Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20 25

<210> 36
<211> 28
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
<400> 36

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ala
1 5 10 15

Pro Asn Ser Thr Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20 25

<210> 37
<211> 28
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

032863

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 37

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Asn Gly Thr Ala
1 5 10 15

Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20 25

<210> 38

<211> 28

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 38

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Tyr Gly Asn Gly Thr Ala
1 5 10 15

Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20 25

<210> 39

<211> 226

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 39

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Cys Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

032863

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Pro Gly
225

<210> 40
<211> 226
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
<400> 40

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Cys Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

032863

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Pro Gly
225

<210> 41
<211> 226
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
<400> 41

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

032863

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Pro Gly
225

<210> 42

<211> 227

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 42

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

032863

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Cys Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 43
<211> 227
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

032863

<400> 43

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Cys Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 44

032863

<211> 227

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 44

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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

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

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

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

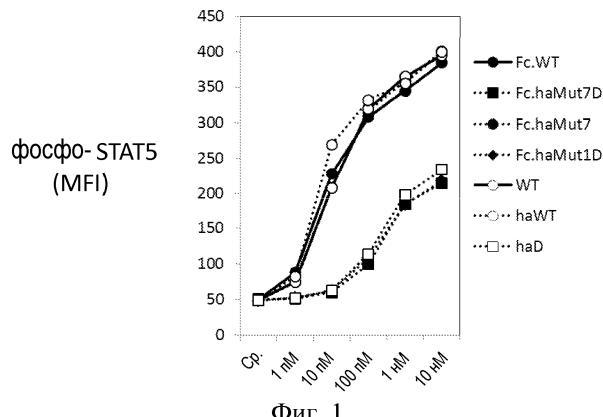
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

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

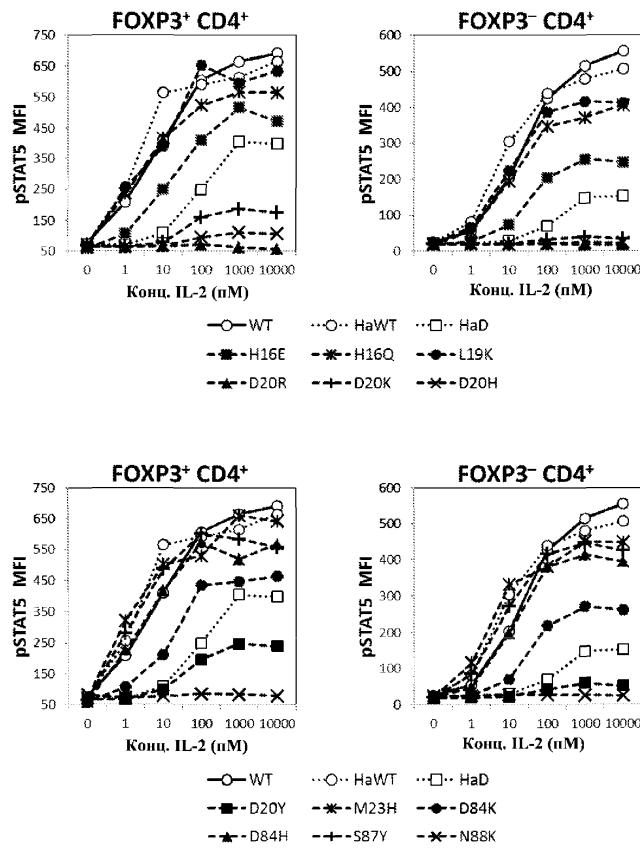
Pro Gly Lys
225

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

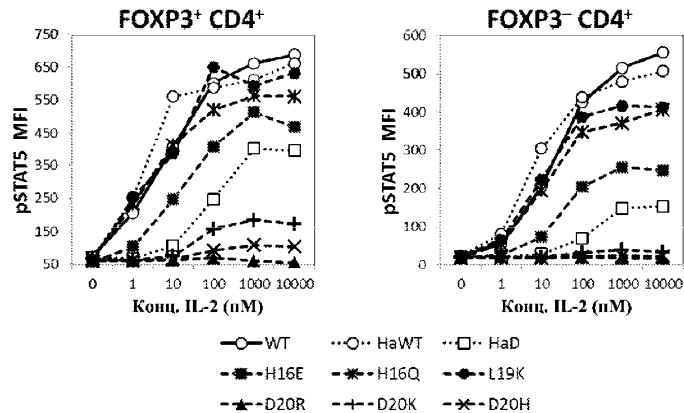
1. Агликозилированный полипептид fc, содержащий область Fc IgG1 человека, причем указанная область Fc содержит мутацию N297G, согласно нумерации EC, и указанная область Fc содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 3, или последовательность SEQ ID NO: 4; причем дополнительно один или более аминокислотных остатков V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 согласно нумерации EC аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4 заменены цистеином для стабилизации полипептида.
2. Полипептид по п.1, в котором указанная область Fc IgG1 человека по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 3.
3. Полипептид по п.1, в котором указанная область Fc содержит замену A287C и L306C в аминокислотной последовательности, описанной под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.
4. Полипептид по п.1, в котором указанная область Fc содержит замену V259C и L306C в аминокислотной последовательности, описанной под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.
5. Полипептид по п.1, в котором указанная область Fc содержит замену R292C и V302C в аминокислотной последовательности, описанной под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.
6. Полипептид по п.1, в котором указанная область Fc содержит замену V323C и I332C в аминокислотной последовательности, описанной под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.
7. Антитело, содержащее область Fc по любому из пп.1-6.
8. Fc-слийный белок, содержащий область Fc по любому из пп.1-6.
9. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из пп.1-6.
10. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.9.
11. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.9.
12. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.10.
13. Клетка-хозяин по п.11 или 12, представляющая собой клетку-хозяин млекопитающего.
14. Способ получения агликозилированного полипептида, содержащего Fc IgG1, по любому из пп.1-6, включающий:
 - а) экспрессию нуклеиновой кислоты по п.9 в культуре клеток млекопитающих; и
 - б) получение агликозилированного полипептида, содержащего Fc IgG1, из указанной культуры.



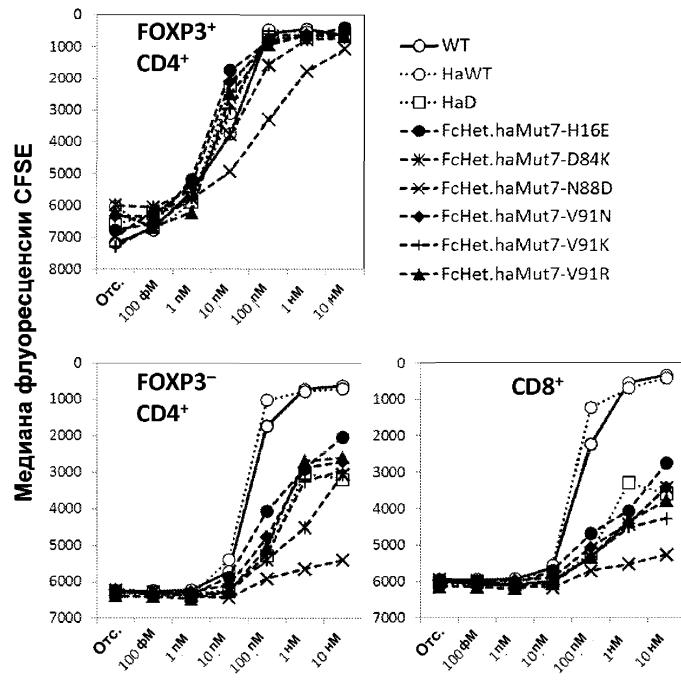
Фиг. 1



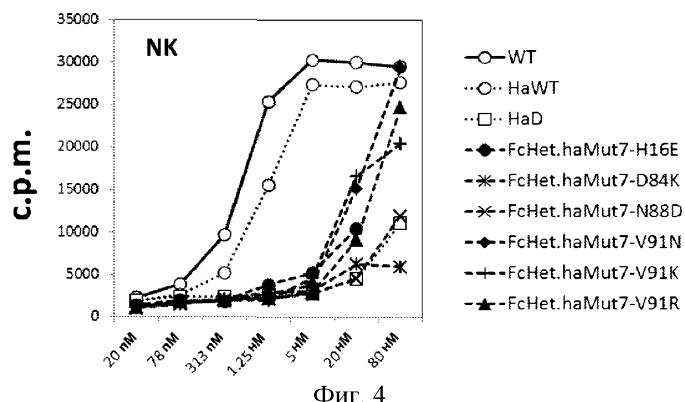
Фиг. 2А



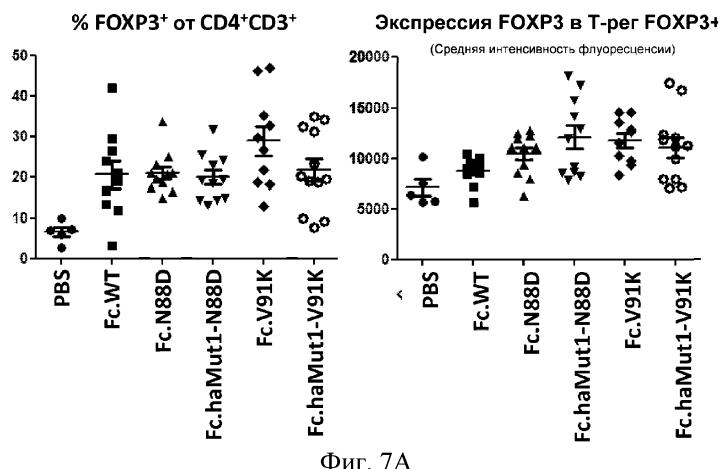
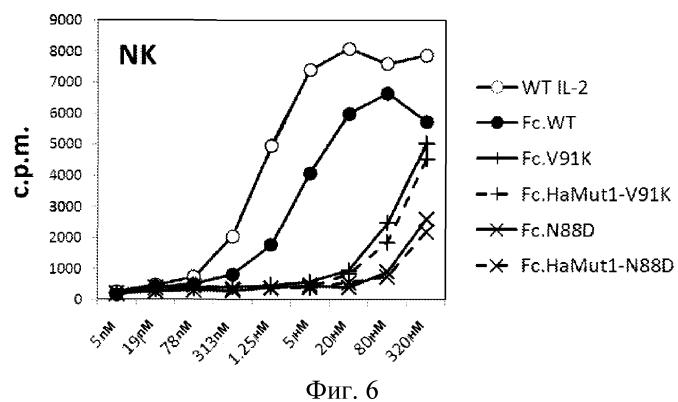
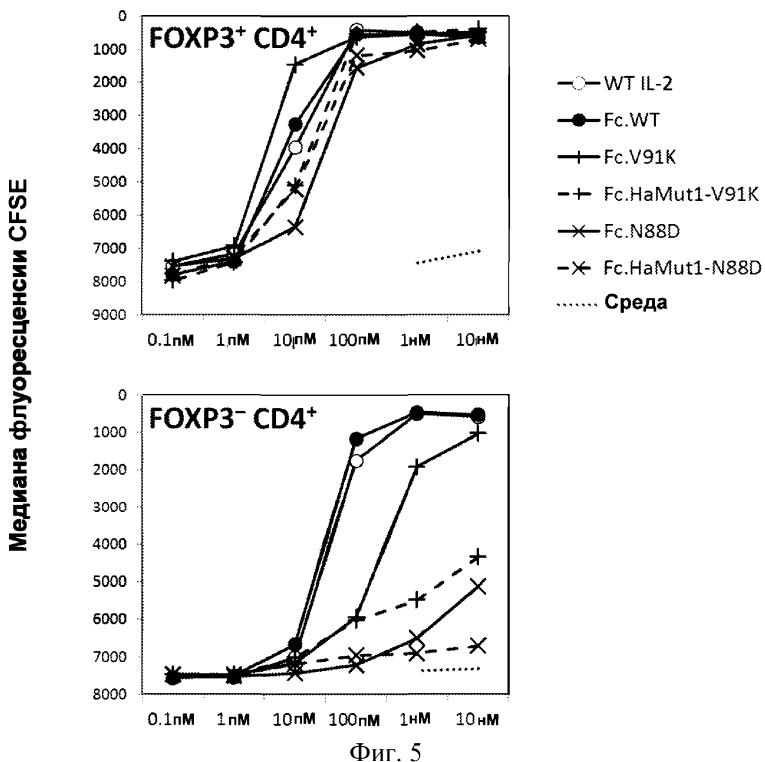
Фиг. 2Б

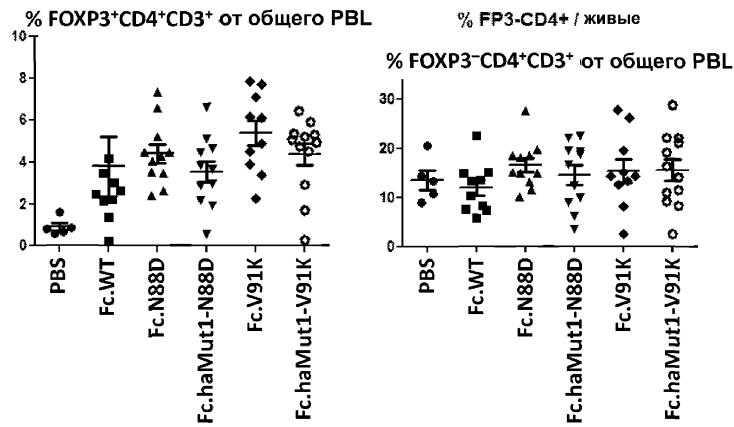


ФИГ. 3

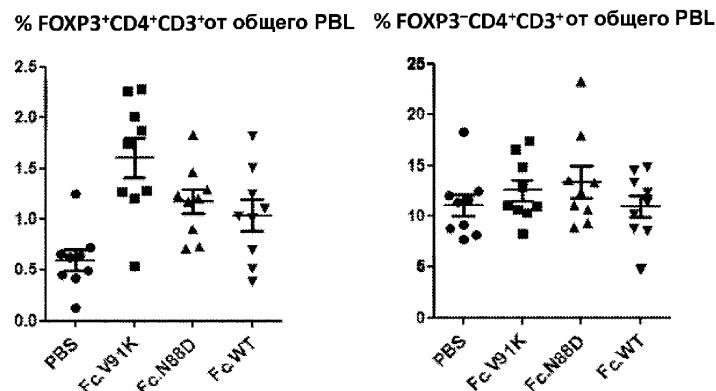
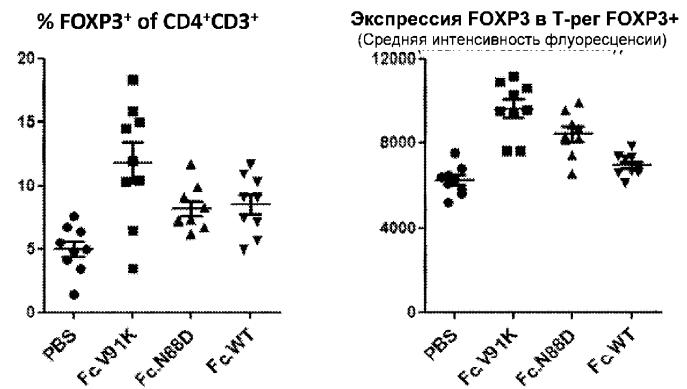


ФИГ. 4

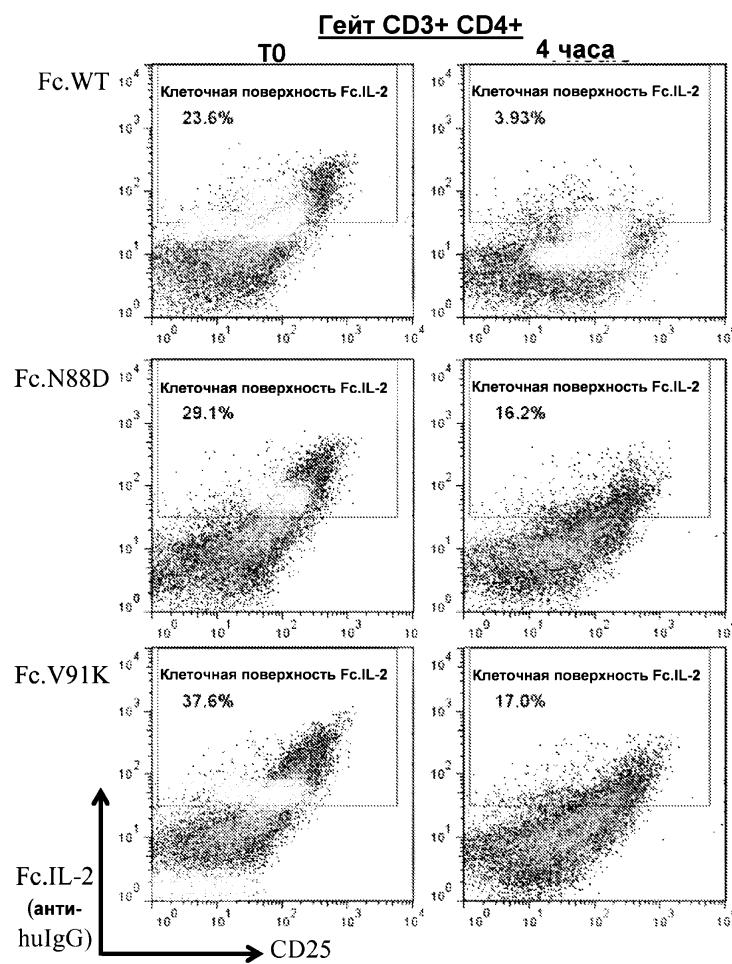




Фиг. 7В



Фиг. 8



Фиг. 9

