



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **106318** (13) **C2**
(51) МПК
C07K 14/55 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2013 07450	(72) Винахідник(и): Леон Монсон Калет (CU), Карменате Портілла Таня (CU), Перес Родрігес Саумель (CU), Енаморадо Ескалона Неріс Мічель (CU), Лахе Давіла Агустін Бьєнвенідо (CU)
(22) Дата подання заявки: 10.11.2011	(73) Власник(и): СЕНТРО ДЕ ІМУНОЛОГІА МОЛЕКУЛАР, Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa, Habana 11600, La Habana, P.O. Box 16040, Cuba (CU)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 11.08.2014	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: P/2010/216	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2008003473 A2, 10.01.2008 WO 2005007121 A2, 27.01.2005 US 2004175357 A1, 09.09.2004 WO 2009061853 A2, 14.05.2009
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 12.11.2010	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: CU	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.10.2013, Бюл.№ 20	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.08.2014, Бюл.№ 15	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/CU2011/000007, 10.11.2011	

(54) ПОХІДНИЙ ПОЛІПЕПТИД ІL-2 З АГОНІСТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАКУ І ХРОНІЧНИХ ІНФЕКЦІЙ

(57) Реферат:

Винахід належить до поліпептиду, який має агоністичну активність відносно ІL-2 і характеризується 95 % гомологією з послідовністю нативного ІL-2 людини, де поліпептид вибраний з групи, яка складається з (I) поліпептиду, який містить мутації R38K, F42I, Y45N, E62L, E68V, (II) поліпептиду, який містить мутації R38K, F42Q, Y45E, E68V, (III) поліпептиду, який містить мутації R38A, F42I, Y45N, E62L, E68V, (IV) поліпептиду, який містить мутації R38K, F42K, Y45R, E62L, E68V, (V) поліпептиду, який містить мутації R38K, F42Q, Y45E, E68V, (VI) поліпептиду, який містить мутації R38A, F42A, Y45A, E62A.

UA 106318 C2

Галузь техніки, до якої належить винахід

Даний винахід стосується імунології. Він стосується, зокрема, терапевтичної модуляції імунної системи за допомогою аналогів натуральної молекули, які виконують агоністичну дію на вихідну молекулу, але несподівано виявляють чудову терапевтичну ефективність.

5 Рівень техніки

Інтерлейкін 2 (IL-2) став першим фактором росту, описаним для Т-клітин. Після його відкриття досліджували його здатність активувати проліферацію і життєздатність Т-клітин *in vitro* (K. A. Smith, Science, 1988 p., т. 240, с. 1169-76), а також посилювати імунну відповідь відносно Т-вірусних інфекцій (J. N. Blattman, і інш., Nat. Med., 2003 p., т. 9, с. 540-7) або вакцин (M. Fishman і інш., J. Immunother., 2008 p., т. 31, с. 72-80; C. Kudo-Saito і інш., Cancer Immunol. Immunother., 2007 p., т. 56, с. 1897-910; C. T. Lin і інш., Immunol. Lett., 2007 p., т. 114, с. 86-93). Однак цю класичну роль IL-2 як активатора Т-імунної відповіді поставили під сумнів численні експериментальні дані (A. R. Almeida і інш., J. Immunol., 2002 p., т. 169, с. 4850-60; M. de la Rosa і інш., Eur. J. Immunol., 2004 p., т. 34, с. 2480-8; T. R. Malek і інш., Nat. Rev. Immunol., 2004 p., т. 4, с. 665-74), що показують, що цей цитокін являє собою гомеостатичний фактор росту для натуральних регуляторних Т-клітин CD4+CD25+FoxP3 + (Treg). Крім того, інтерлейкін 2 запропонований як основний учасник механізму, за допомогою якого регуляторні Т-клітини пригнічують активність і розмноження інших ефекторних клітин, таких як хелперні Т-клітини CD4, цитотоксичні Т-клітини CD8 і натуральні кілерні клітини (NK). Зокрема, недавно зроблене припущення, що регуляторні Т-клітини пригнічують інші Т-клітини, спричиняючи місцеве зниження рівнів IL-2 (P. Pandiyan і інш., Nat. Immunol., 2007 p., т. 8, с. 1353-1362). Основу цього ефекту пригнічення являють собою: а) їх здатність безпосередньо інгібувати ефекторні Т-клітини у виробництві нового IL-2 (A. R. Almeida і інш., J. Immunol., 2002 p., т. 169, с. 4850-60; T. Takahashi і інш., Int. Immunol., 1998 p., т. 10, с. 1969-80; A. M. Thornton і інш., J. Exp. Med., 1998 p., т. 188, с. 287-96; M. Wolf і інш., Eur. J. Immunol., 2001 p., т. 31, с. 1637-45); б) їх здатність швидко вловлювати, інтерналізувати і розкласти IL-2, присутній в їх мікросередовищі (P. Pandiyan і інш., Nat. Immunol., 2007 p., т. 8, с. 1353-62) і з) їх здатність до надмірної експресії альфа-ланцюга рецептора IL-2 (Y. Kuniyasu і інш., Int. Immunol., 2000 p., т. 12, с. 1145-1155), що забезпечує більш ефективне використання IL-2, коли його концентрації є низькими.

30 Таким чином, IL-2 являє собою високоплейотропний цитокін, який має дуже велике значення в біологічній активності різних клітинних популяцій. Дана властивість перетворює IL-2 у важливий центр регуляції імунної відповіді, роблячи його привабливою метою для лікування і комплексної імуномодуляції.

Протягом ряду років IL-2 використовували в лікуванні раку. Зокрема, його використання у високих дозах являє собою дозволене в декількох країнах лікування метастатичної меланоми і карциноми клітин нирок. Однак безпосереднє використання IL-2 пацієнтами серйозно обмежене його токсичною дією і низькою ефективністю. Тому тільки 20 % відповідних пацієнтів отримують лікування на основі IL-2, і тільки 17 % з підданих цьому лікуванню пацієнтів показують об'єктивну відповідь. Вірогідне пояснення такої вираженої невдачі в клінічному дослідженні полягає в тому, що лікування нативним IL-2 також стимулює популяції регуляторних Т-клітин (M. Ahmadzadeh і інш., Blood, 2006 p., т. 107, с. 2409-14), що ослабляє бажану імуностимуляцію. У цей час численні дані доклінічних досліджень підтверджують цю ідею. Зокрема, експерименти на мишачих моделях показують, що первинна активність введеного IL-2 *in vivo* являє собою гомеостатичне розмноження натуральних регуляторних Т-клітин.

45 Розроблено декілька стратегій для послаблення токсичних ефектів лікування IL-2. Деякі з цих стратегій ґрунтуються на використанні мутованих варіантів IL-2, призначених для збільшення здатності цієї молекули передавати сигнал, головним чином, через рецептор, що має високу спорідненість (альфа-, бета- і гамма-ланцюги), а не через рецептор, що має проміжну спорідненість (бета- і гамма-ланцюги). Основна ідея полягає в тому, щоб активувати передачу сигналу в Т-клітинах замість передачі сигналів в NK-клітинах, які вважаються відповідальними за токсичні ефекти, що спостерігаються. Цьому напрямку роботи відповідають наступні винаходи: патент США № 7186804, патент США № 7105653, патент США № 6955807, патент США № 5229109 і патентна заявка США № 20050142106. Важливо зазначити, що жоден з даних винаходів не стосується мутантів IL-2, які виявляють вищу терапевтичну ефективність, ніж нативний IL-2 *in vivo*, на основі своєї зниженої здатності стимулювати натуральні регуляторні Т-клітини.

Інші мутовані варіанти IL-2 створені з метою збільшення їх фармакологічної активності, наприклад, шляхом поліпшення укладання або збільшення тривалості існування в крові. Крім інших, цьому напрямку роботи відповідають наступні винаходи: патент США № 4959314, патент

США № 5116943 і патент США № 4853332. Знов жоден з цих мутеїнів не виявляє зменшення здатності активувати регуляторні Т-клітини і не виявляє вищу терапевтичну ефективність.

Нарешті, потрібно згадати, що в літературі опубліковані численні пропозиції лікарських засобів (R. J. Kreitman, *Curr. Pharm. Des.*, 2009 p., т. 15, с. 2652-64; M. X. Litzinger, R. Fernando, T. J. Curiel, T. J. Grosenbach, J. Schlom і C. Palena, *Blood*, 2007 p., т. 110, с. 3192-201; M. A. Morse, A. C. Hobeika, T. Osada, D. Serra, D. Niedzwiecki, H. K. Lysterly і T. M. Clay, *Blood*, 2008 p., т. 112, с. 610-8; S. Onizuka, I. Tawara, J. Shimizu, S. Sakaguchi, T. Fujita і E. Nakayama, *Cancer Res.* 1999 м., т. 59, с. 3128-33; S. A. Quezada, K. S. Peggs, M. A. Curran і J. P. Allison, *J. Clin. Invest.*, 2006 p., т. 116, с. 1935-45), які повинні модулювати або зменшувати активність регуляторних Т-клітин *in vivo*. Ці лікарські засоби були досліджені на піддослідних тваринах або навіть на пацієнтах з метою безпосереднього лікування раку або посилення ефекту вакцин. Крім того, опубліковані деякі повідомлення, в яких запропоновано модулювати активність IL-2 в певних моноклональних антитілах (O. Boyman, M. Kovar, M. P. Rubinstein, C. D. Surh і J. Sprent, *Science*, 2006 p., т. 311, с. 1924-1927; O. Boyman і інш., *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2006 p., т. 6, с. 1323-31; D. Kamimura і інш., *J. Immunol.*, 2006 p., т. 177, с. 306-14; M. Murakami, A. Sakamoto, J. Bender, J. Kappler і P. Marrack, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2002 p., т. 99, с. 8832-7; J. T. Tomala, H. Chmelova, T. Mrkvan, B. Rihova і M. Kovar, *J. Immunol.*, 2009 p., т. 183, с. 4904-4912), щоб активувати кращі або більш ефективні імунні відповіді. Наскільки відомо авторам даного винаходу, однак, в літературі відсутні основані на мutowаних варіантах IL-2 повідомлення, що показують можливість отримання вищої терапевтичної ефективності за рахунок зменшення здатності стимулювати натуральні регуляторні Т-клітини.

Суть винаходу

Даний винахід стосується отримання мutowаних варіантів IL-2, які виявляють вищу терапевтичну ефективність, ніж нативний IL-2, в моделях, придатних для трансплантації мишачих пухлин.

Ці мутеїни відрізняються тим, що вони є частковими агоністами активності IL-2 і вибрані внаслідок своєї особливо низької здатності стимулювати натуральні регуляторні Т-клітини (Т CD4+CD25+FoxP3+) *in vitro* і/або *in vivo*. Терапевтична ефективність цих мутеїнів *in vivo* забезпечує практичне вирішення задачі поліпшення лікування злоякісних пухлин за допомогою IL-2. Зокрема, ці мутеїни відкривають шлях до подолання обмежень, що спостерігаються в лікуванні нативним IL-2, які виникають внаслідок того, що вони сприяють розмноженню натуральних регуляторних Т-клітин *in vivo*. Даний винахід стосується поліпептидів, які мають спільну первинну послідовність з IL-2 людини, за винятком декількох амінокислот, які піддалися мутаціям. Ці мутації приводять до істотного зменшення здатності даних поліпептидів стимулювати *in vitro* і *in vivo* регуляторні Т-клітини (Т CD4+CD25+FoxP3+) і додають IL-2 вищу ефективність в лікуванні придатних для трансплантації пухлин мишей. Даний винахід також включає терапевтичні застосування цих мutowаних варіантів індивідуально або в поєднанні з вакцинами для лікування захворювань, таких як рак або інфекції, де має значення активність регуляторних Т-клітин (Treg). Даний винахід забезпечує істотне поліпшення сучасних стратегій імунотерапії на основі IL-2, в тому числі в безпосередньому лікуванні раку і в поєднанні з різними вакцинами. Зокрема, заміна нативного IL-2 мutowаними варіантами, описаними в цьому документі, запобігає розмноженню регуляторних Т-клітин, які помітно зменшують бажані терапевтичні ефекти.

Докладний опис винаходу

Отримання поліпептидних аналогів IL-2

Даний винахід стосується поліпептидів, що містять в ланцюгу від 100 до 500 амінокислотних залишків, переважно 140 амінокислотних залишків, і їх ефективна молекулярна маса становить щонайменше 15000. Ці поліпептиди зберігають високу міру ідентичності послідовності з нативним IL-2, яка складає більше ніж 90 %. Відносно своєї послідовності, вони містять від 3 до 6 мутацій в порівнянні з нативним IL-2. У даних положеннях ці поліпептиди є мutowаними, включаючи амінокислотні залишки, відмінні від амінокислотних залишків, що займають відповідні положення в нативному IL-2. Амінокислоти, які замінюють вихідні амінокислотні залишки, вибирають таким чином, що вони мають фізико-хімічні властивості, значно відмінні від властивостей вихідних амінокислот, замінюючи полярні залишки неполярними, незаряджені залишки зарядженими, великі залишки малими, кислотні залишки основними, крім інших змін.

Поліпептиди згідно з даним винаходом можуть називатися, крім іншого, термінами "імунотерапевтичні поліпептиди", "аналоги IL-2" або "мутеїни IL-2". Ці поліпептиди побудовані на основі тривимірної структури рецепторного комплексу IL-2 (є в суспільній базі даних PDB), і містять мутації, головним чином, в положеннях IL-2, відповідних амінокислотам, на які значною мірою впливає розчинник, і які є у високій мірі стійкими в IL-2 різних видів (послідовності

отримані з швейцарської бази даних білків Swissprot). Амінокислоти вищезазначеного типу, що знаходяться під впливом розчинника, визначають, використовуючи біоінформаційне програмне забезпечення для візуалізації білкових структур, таке як RASMOL, SwissPDBviewer або інше. Збережені положення в послідовності IL-2 визначали, використовуючи біоінформаційне програмне забезпечення для множинної модифікації послідовності, наприклад, Fasta, ClusterW або інше.

Поліпептиди згідно з даним винаходом можна отримувати, використовуючи різноманітні стратегії, в тому числі шляхом синтезу білка. Їх можна також отримувати, використовуючи генно-інженерні технології, наприклад, шляхом їх експресії в бактеріях, таких як кишкові палички (*E. coli*) або інші бактерії, а також в клітинах ссавців, таких як клітини NS0 або інші клітини ссавців. Точкові мутації в певних положеннях можна також отримувати, використовуючи методи точково-спрямованого мутагенезу за допомогою аналізу з полімеразною ланцюговою реакцією (PCR).

Несподівано автори даного винаходу виявили істотну перевагу цих мутеїнів в порівнянні з традиційним використанням нативного IL-2. Дану перевагу являє собою їх підвищена ефективність в лікуванні пухлин, зумовлена їх здатністю перешкоджати розмноженню регуляторних Т-клітин.

Вибір поліпептидних аналогів IL-2 з точки зору біологічної активності

Поліпептиди згідно з даним винаходом вибирають, враховуючи наступні властивості:

1) Агоністична дія нативного IL-2. Дану властивість можна оцінювати безпосередньо шляхом дослідження *in vitro* проліферації ліній клітин, залежних від IL-2, таких як CTLL2 або Kitt225, або шляхом дослідження сумішей Т-лімфоцитів миші і/або людини. Ці мутеїни повинні мати питому стимулюючу активність, що є в 5-50 разів меншою, ніж активність нативного IL-2 в даних дослідженнях.

2) Втрата здатності, в порівнянні з нативним IL-2, стимулювати *in vitro* і/або *in vivo* популяції регуляторних Т-клітин. Дану властивість можна оцінювати, наприклад, досліджуючи здатність мутеїнів згідно з даним винаходом, в порівнянні зі здатністю нативного IL-2, безпосередньо індукувати розмноження Т-клітин CD4+CD25+, виділених у не підданих експериментам мишей, використовуючи *in vitro* антитіло анти-CD3. Його можна також дослідити, вводячи мишам внутрішньоперитонеально або підшкірно ці мутеїни або нативний IL-2 протягом п'яти діб і оцінюючи вплив на розмноження або збільшення швидкості проліферації популяцій регуляторних Т-клітин (TCD4+CD25+FoxP3+). Активність мутованого IL-2 відносно клітин Treg повинна бути щонайменше в 1000 разів нижчою, ніж у нативного IL-2 в цих дослідженнях.

3) Збільшення терапевтичного ефекту на піддослідних тваринах в порівнянні з нативним IL2. Дану властивість можна оцінювати, наприклад, порівнюючи протипухлинний або протиметастатичний ефект мутеїнів і нативного IL-2 як монотерапію на моделях придатних для трансплантації пухлин (наприклад, меланоми B16). Його можна також оцінювати через потенційний ефект клітинної і/або гуморальної відповіді на вакцину, що досліджується. Мутеїни повинні виявляти вищу терапевтичну ефективність, ніж нативний IL-2, в дозах, що містять рівну сумарну масу білків IL-2 і мутеїну.

Даний винахід стосується, зокрема, мутеїнів, представлених в таблиці 1. Ці мутеїни містять множину заміщень амінокислот, які надають їм вищезазначених властивостей.

Таблиця 1

Модифіковані мутеїни, що мають три основні властивості, описані в даному патенті. Мутації представлені згідно з нумерацією IL-2 людини

Мутації
R38K, F42I, Y45N, E62L, E68V
R38K, F42Q, Y45E, E68V
R38A, F42I, Y45N, E62L, E68V
R38K, F42K, Y45R, E62L, E68V
R38K, F42I, Y45E, E68V
R38A, F42A, Y45A, E62A

Даний винахід також включає додаткові модифікації відносно класу вищезазначених мутеїнів IL-2 і, зокрема, відносно тих, які описані в таблиці 1. Вони зроблені, щоб посилити їх

спорідненість до певних компонентів рецептора IL-2, але без впливу або навіть поліпшення його агоністичної природи, яка не стимулює регуляторні Т-клітини, або щоб поліпшити їх фармакодинаміку *in vivo*: збільшення періоду напіввиведення або зменшення їх інтерналізації Т-клітинами. Ці додаткові мутації можна отримувати шляхом раціонального проектування, використовуючи біоінформаційні засоби або застосовуючи комбінаторні молекулярні бібліотеки різного характеру (бібліотеки фагів, бібліотеки експресії генів в дріжджах або бактеріях). У ще одному аспекті даний винахід стосується злитого білка, що містить які-небудь з описаних вище імуномодуючих поліпептидів в поєднанні з білком-носієм. Білок-носіє може являти собою альбумін або Fc-область імуноглобулінів людини.

Терапевтичне застосування поліпептидного аналога IL-2

Даний винахід також включає фармацевтичні композиції, що містять як активний інгредієнт мутеїн IL-2 і його аналоги, описані засобами даного винаходу, і їх потенційні терапевтичні застосування для посилення натуральної або індукованої вакцинами імунної відповіді у випадку захворювань, таких як рак або хронічні інфекції, де регуляторні Т-клітини мають особливе значення.

Для його терапевтичного застосування поліпептид згідно з даним винаходом потрібно вводити страждаючому на захворювання пацієнту незалежно або в поєднанні з іншими поліпептидами або іншими речовинами, які сприяють його терапевтичній дії або посилюють її. Спосіб даного введення може являти собою будь-який спосіб введення, описаний на сучасному рівні техніки для парентерального застосування лікарських засобів. Переважно введення потрібно здійснювати внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно або безпосередньо в пухлину.

Поліпептиди, описані в цьому документі, можна також вводити як частину фармацевтичної композиції, яку використовують для лікування раку і хронічних інфекційних захворювань або для посилення клітинної і/або гуморальної відповіді на вакцини, як заміна нативного IL2. Поліпептиди згідно з даним винаходом можна використовувати в поєднанні з вакцинами для лікування раку або з вакцинами для профілактики інфекційних захворювань, де мають значення регуляторні Т-клітини.

Для отримання бажаного терапевтичного ефекту поліпептид згідно з даним винаходом потрібно вводити в досить високих дозах, щоб забезпечувати його концентрацію в периферичному лімфатичному вузлі або в периферичній зоні, що стосується захворювання, що досліджується в інтервалі концентрацій, при яких мутеїн виявляє імуностимулюючий ефект. Таким чином, дозу, що розглядається, потрібно регулювати залежно від типу захворювання, що досліджується, і способу введення. Наприклад, у випадку лікування пухлини дозу потрібно встановлювати для створення концентрації мутеїну всередині пухлини і/або в локорегіонарному лімфатичному вузлі на такому рівні, щоб забезпечувати стимуляцію протипухлинної імунної відповіді. Інтервал доз для дослідження може складати від сотень мікрограмів до сотень міліграмів на дозу. Для застосувань, в яких мутеїн замінює традиційне лікування нативним IL-2, доза мутеїну, що використовується, повинна мати меншу або еквівалентну активність (що визначається в ході аналізу з використанням лінії клітин CTLL2) в порівнянні з активністю нативного IL-2, що використовується традиційно.

Число введень, що використовується, також потрібно встановлювати відповідно до біологічного розподілу мутеїну, що досліджується. Як правило, вищезазначені ефективні рівні потрібно підтримувати протягом від 2 до 30 діб підряд. Потрібно відмітити, наприклад, що якщо мутеїн поєднується з білком-носієм, то частоту його введення необхідно встановлювати відповідним чином. Для застосувань, в яких замінюють нативний IL-2, схема введення мутеїну може бути аналогічною схемі, яку використовують в традиційному лікуванні.

Терапевтичну дію потрібно розуміти як повне або часткове припинення симптомів захворювання. У випадку раку критерій припинення (ремісії) захворювання являє собою, крім інших, зменшення об'єму пухлини або збільшення часу до рецидиву.

Поліпептиди згідно з даним винаходом є особливо корисними для лікування пухлин, таких як меланоми і ниркові пухлини.

Короткий опис креслень

Фіг. 1. Отримання мутеїну. а) Експресія мутеїну в штамі BL21DE3 *E. coli*, що визначається методом електрофорезу в поліакриламідному гелі, що містить додецилсульфат натрію (SDS-PAGE): смуга 1 являє собою суму білків штаму BL21DE3, негативний контроль експресії; смуги 2 і 3 являють собою два приклади рівнів експресії, що досягаються в даному штамі; стрілка показує лінію, відповідну мутеїну. б) Зворотно-фазова хроматограма, що представляє основну заключну стадію очищення білка, стрілка показує пік, відповідний білку, що розглядається. в) Очищення мутеїну, що визначається хроматографією в SDS-PAGE: смуга 1 являє собою

результати процесу виділення внутрішньоклітинного тільця; смуга 2 являє собою мутеїн, отриманий після очищення методом зворотно-фазової хроматографії.

Фіг. 2. Дослідження агоністичної природи мутеїну IL-2. а) Вимірювання методом проточної цитометрії здатності мутеїну прикріплюватися до поверхні клітин лінії CTLL2. Як IL-2, так і мутеїн визначали, використовуючи антитіломаскуючий імуоферментний аналіз з анти-6His. б) Графік представляє здатність мутеїну індукувати проліферацію залежної від IL-2 лінії Т-клітин CTLL2 в порівнянні з нативним IL-2. Проліферацію вимірювали шляхом введення МТТ.

Фіг. 3. Мутеїн не індукує *in vitro* проліферацію регуляторних Т-клітин. а) Графік проточної цитометрії, що показує чистоту популяції клітин CD3+CD4+CD25+, виділеної з лімфатичних вузлів миші лінії C57BL/6. б) Регуляторні Т-клітини стимулювали *in vitro* маскуюче антитіло анти-CD3, і в них вводили нативний IL-2 в концентрації 0,5 нг/мл або мутеїн в концентрації 32 нг/мл протягом 72 годин; графік представляє число живих клітин, виявлених після кожної обробки, в порівнянні з контрольним дослідженням, в якому цитокін не вводили. Вибрані концентрації відповідають концентрації, в якій кожна молекула індукує однакову проліферацію клітин лінії CTLL2.

Фіг. 4. Оцінка ефекту лікування мутеїном на проліферацію клітинних популяцій. а) Кількісне визначення відносної маси селезінки мишей, яким вводили мутеїн протягом п'яти діб. Маса селезінки мишей, що отримували лікування, статистично перевищувала масу селезінки мишей контрольної групи. Використали непараметричний аналіз Краскела-Уолліса (Kruskal-Wallis) і множинне порівняння Данна (Dunn). б) Вимірювання популяції Т-клітин CD8+; графік представляє процентні частки даної популяції.

Фіг. 5. Мутеїн є більш ефективним, ніж нативний IL-2, для скорочення метастаз в експериментальній метастатичній моделі меланоми лінії MB16F0. а) Представницькі фотографії легенів для кожного виду лікування. б) Кількісне визначення легеневих метастаз в кожній групі.

Фіг. 6. Лікування поєднанням мутеїну і вакцини OVA/VSSP потенціює протипухлинний ефект вакцини. Маючим пухлини мишам вводили вакцину OVA/VSSP індивідуально або в поєднанні з мутеїном. Графік представляє криві зростання пухлин, причому група, якій вводили вказане поєднання, показує статистично більш значне зменшення пухлин в порівнянні з контрольною групою.

Приклади

Приклад 1. Проектування мутеїнів IL-2

Мутеїни проектували обчислювальним шляхом, використовуючи біоінформаційні методи, на основі структури IL-2 людини, описаній в банку даних білків PDB (Protein Data Bank), і амінокислотних послідовностей IL-2 різноманітних видів, які представлені в базі даних Swissprot. Деякі мутеїни проектували, включаючи від 3 до 6 мутацій (вводячи неконсервативні амінокислотні заміщення) у відкритих для розчинника висококонсервативних залишках. Ці мутеїни піддавали експресії в *E. coli* з конструкції на основі плазмідного вектора pET28a, що включає цільову послідовність з шести гістидинових залишків на амінному кінці. Мутеїни очищали зворотно-фазовою хроматографією (фіг. 1), і отримували високу чистоту (більше 95 %). Отримані мутеїни вибирали згідно з їх властивостями в експериментальних дослідженнях *in vitro* і *in vivo*, щоб продемонструвати три основних властивості, представлені в описі даного винаходу. З всіх спроектованих мутеїнів таблиця 1 описує набір певних мутацій, які забезпечують бажану властивість для агоністів активності IL-2 без відчутної стимуляції регуляторних Т-клітин і демонструють вищу терапевтичну ефективність в порівнянні з IL-2 в лікуванні придатних для трансплантації мишачих пухлин. Таблиця 2 представляє інші спроектовані мутеїни, які не виявляли бажаних властивостей.

Таблиця 2

Спроектовані мутеїни, що не мають основних властивостей, описаних в даному патенті. Мутації представлені згідно з нумерацією IL-2 людини

Мутації
Q22V, Q126A, I129D, S130G
L18N, Q126Y, S130R
Q13Y, Q126Y, I129D, S130R
L18N, Q22V, T123A, I129D, S130R
R38A, F42A, Q126Y, I129D
Q126Y, I129D, E62L, E68V

Приклад 2. Демонстрація агоністичного характеру спроектованих мутеїнів IL-2

Фіг. 2 ілюструє, як представлені в таблиці 1 мутеїни прикріплюються до компонентів рецептора IL-2 на поверхні клітин лінії CTLL2 (фіг. 2a). Спроектовані мутеїни прикріплюються до клітин лінії CTLL2, які, як відомо, містять на своїй поверхні рецептори для IL-2, що мають як високу спорідненість, так і проміжну спорідненість. Зв'язування, виявлене в даних дослідженнях, виявляється аналогічним зв'язуванню, отриманому з нативним IL-2. Фіг. 2b ілюструє здатність представлених в таблиці 1 мутеїнів стимулювати ріст клітин лінії CTLL2 (фіг. 2b). Ці мутеїни поводяться як часткові агоністи активності IL-2 в даному дослідженні. Їх питома активність нижче від 5 до 50 разів, ніж активність нативного IL-2.

Приклад 3. Вплив мутеїнів IL-2 на регуляторні Т-клітини

Описані в таблиці 1 мутеїни виявляють дуже низьку здатність стимулювати регуляторні Т-клітини *in vitro* (фіг. 3). Як представлено на даному кресленні, нативний IL-2 при цьому здатний індукувати сильну проліферацію регуляторних Т-клітин (Т CD4+CD25+FoxP3+), стимульованих прикріпленням до чашки антитілом анти-CD3. Описані в таблиці 1 мутеїни в масових концентраціях, що значно перевищують концентрації нативного IL-2, не стимулювали регуляторні Т-клітини. Крім того, необхідно зазначити, що описані вище результати є дійсними, навіть якщо кількість мутеїну, що використовується, збільшують в такій мірі, щоб використовувати кількість, еквівалентну по активності нативному IL-2, в дослідженні проліферації клітин лінії CTLL2. Описані в таблиці 1 мутеїни, як правило, виявляють здатність стимулювати регуляторні Т-клітини, яка щонайменше в 1000 разів нижча, ніж здатність нативного IL-2.

Приклад 4. Дослідження імуностимулюючої активності спроектованих мутеїнів *in vivo*

Описані в таблиці 1 мутеїни виявляють підвищену імуностимулюючу активність *in vivo*. Фіг. 4a і b представляють, що мутеїни індукують збільшення селезінки в більшій мірі, ніж нативний IL2, при дослідженні мишей, що не були в експерименті після внутрішньоперитонеального введення двох доз на добу, що містять 20 мкг мутеїну, протягом п'яти діб. Ця стимуляція відповідає чистому збільшенню популяції ефекторних клітин, таких як Т-лімфоцити CD8+. На основі даних спостережень можна зробити висновок, що введення цих мутеїнів не стимулює розмноження регуляторних Т-клітин (Т CD4+CD25+FoxP3+), на відміну від стимуляції, що спостерігається у випадку нативного IL2 (фіг. 4c і d).

Приклад 5. Вимірювання терапевтичної ефективності мутеїнів у випадку мишачої моделі придатних для трансплантації пухлин

Доведена підвищена терапевтична ефективність спроектованих мутеїнів у випадку мишачої моделі придатних для трансплантації пухлин. Описані в таблиці 1 мутеїни виявляють підвищену ефективність для лікування легеневих метастаз меланоми MB16 в мишачій моделі. Фіг. 5 представляє, що після внутрішньоперитонеального введення двох доз на добу, що містять 20 мкг описаних в таблиці 1 мутеїнів, протягом п'яти діб спостерігався сильний протиметастатичний ефект, який був відсутній в групах, що отримували еквівалентні дози нативного IL-2.

Приклад 6. Вимірювання здатності мутеїну потенціювати дію протипухлинної вакцини

Доведена здатність спроектованих мутеїнів потенціювати дію протипухлинної вакцини. Використали модель первинної пухлини з клітинами лінії EG7, причому лінія пухлинних клітин була генетично модифікована для експресії антигену OVA. Мишей, які мають пухлини, імунізували антигеном OVA, активованим VSSP, використаним індивідуально або в поєднанні з

мутеїном. Фіг. 6 представляє, що зменшення росту пухлин відбувалося в більшій мірі у випадку мишей, яким вводили дане поєднання, ніж у випадку мишей, яким вводили тільки вакцину.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

```

<110> Центр молекулярної імунології
<120> Прохідні поліпептиди IL-2 з агоністичною активністю
        для лікування раку і хронічних інфекцій.
<130> 402010CU00
<140> CU/P/2010/216
<141> 2010-11-12
<160> 6
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 133
<212> PRT
<213> E. coli

<400> 1

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

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

Asn Pro Lys Leu Thr Lys Met Leu Thr Ile Lys Phe Asn Met Pro Lys
35          40          45

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

Pro Leu Glu Val 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 Ser Gln Ser Ile
115         120         125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 2
<211> 133
<212> PRT
<213> E. coli

```

<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 Lys Met Leu Thr Gln Lys Phe Glu 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 Val 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 Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 3

<211> 133

<212> PRT

<213> E. coli

<400> 3

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 Ala Met Leu Thr Ile Lys Phe Asn Met Pro Lys
35 40 45

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

Pro Leu Glu Val 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 Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 4
<211> 133
<212> PRT
<213> E. coli

<400> 4

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

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

Pro Leu Glu Val 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 Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 5
<211> 133
<212> PRT
<213> E. coli

<400> 5

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 Lys Met Leu Thr Ile Lys Phe Glu 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 Val 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 Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 6

<211> 133

<212> PRT

<213> E. coli

<400> 6

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 Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys
35 40 45

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

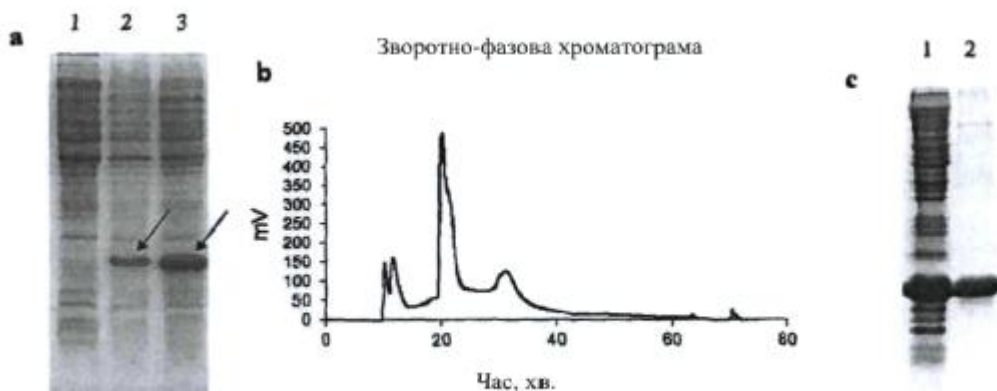
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

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

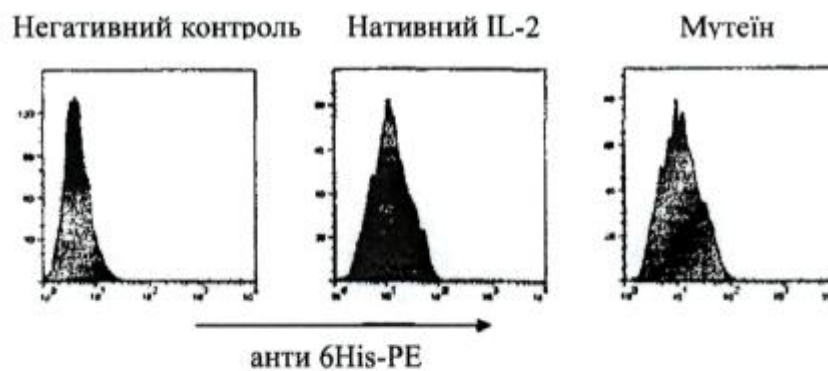
Ile Ser Thr Leu Thr
130

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Поліпептид, агоністичний відносно IL-2 і такий, що характеризується 95 % гомологією з послідовністю нативного IL-2 людини, де поліпептид вибраний з групи, яка складається з (I) поліпептиду, який містить мутації R38K, F42I, Y45N, E62L, E68V, (II) поліпептиду, який містить мутації R38K, F42Q, Y45E, E68V, (III) поліпептиду, який містить мутації R38A, F42I, Y45N, E62L, E68V, (IV) поліпептиду, який містить мутації R38K, F42K, Y45R, E62L, E68V, (V) поліпептиду, який містить мутації R38K, F42Q, Y45E, E68V, (VI) поліпептиду, який містить мутації R38A, F42A, Y45A, E62A.
- 10 2. Поліпептид за п. 1, де введені нові мутації, які збільшують його спорідненість до зв'язування з різними компонентами IL-2.
3. Злитий білок, що містить імуномодулюючий поліпептид за п. 1, зв'язаний з білком-носієм.
- 15 4. Злитий білок за п. 3, де білок-носіє являє собою альбумін.
5. Злитий білок за п. 3, де білок-носіє являє собою Fc-область імуноглобулінів людини.
6. Фармацевтична композиція, що використовується в лікуванні раку і хронічних інфекційних захворювань і яка характеризується тим, що вона містить поліпептид за п. 1 як активний інгредієнт.
- 20 7. Фармацевтична композиція, що використовується в лікуванні раку і хронічних інфекційних захворювань, яка містить злитий білок за будь-яким з пп. 3-5 як активну основу.
8. Поліпептид за п. 1 для виготовлення лікарського засобу, який модулює імунну систему.
9. Поліпептид за п. 1 для виготовлення лікарського засобу, що використовується в лікуванні хронічних захворювань.
- 25 10. Поліпептид за п. 1 для виготовлення лікарського засобу, що використовується в лікуванні раку.
11. Поліпептид за п. 1 для виготовлення лікарського засобу, що використовується в лікуванні хронічних інфекційних захворювань.



a



b

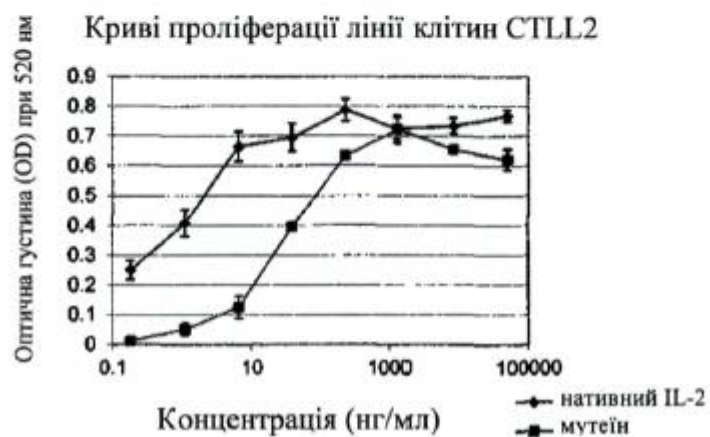
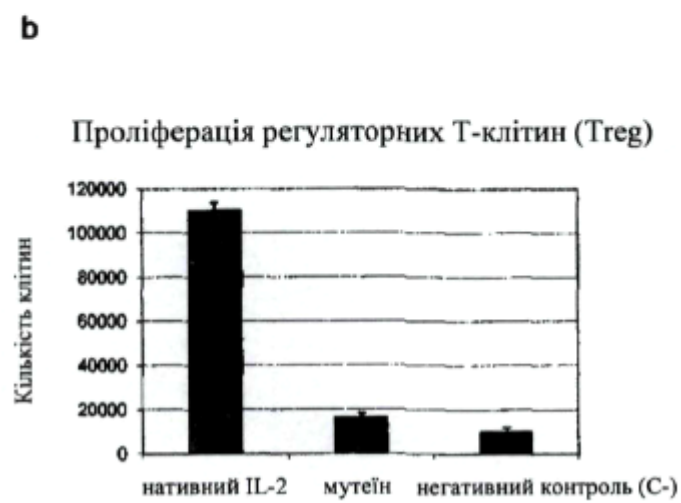
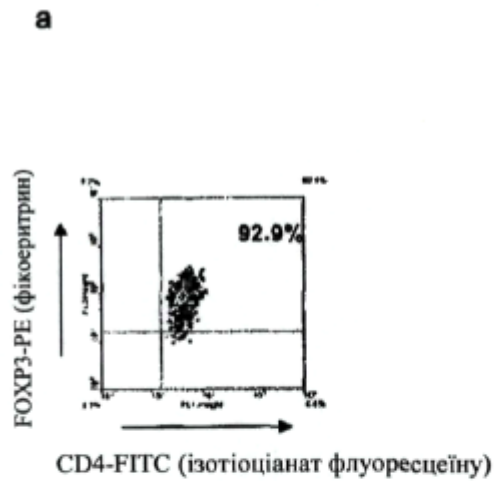
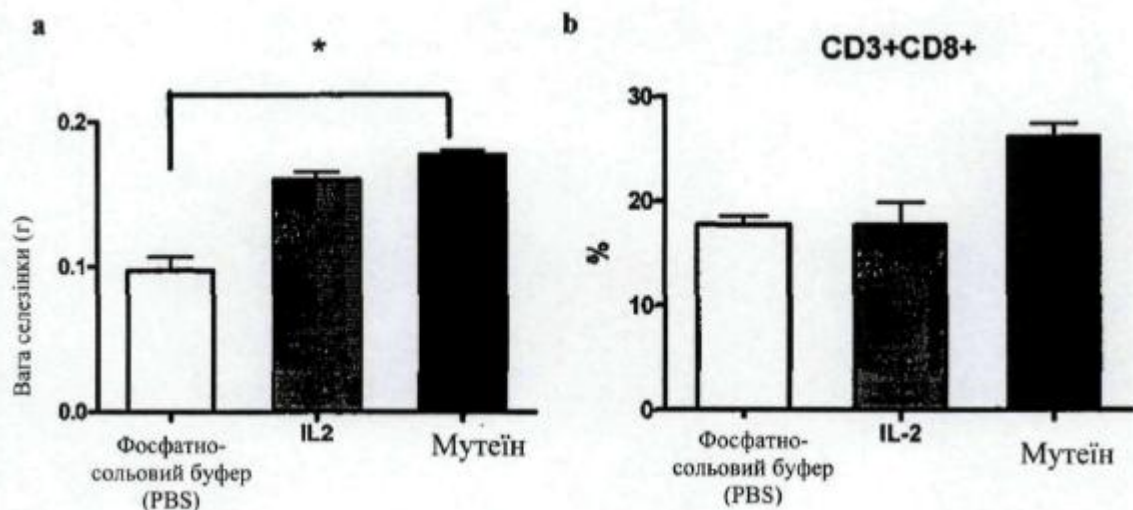


Fig. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

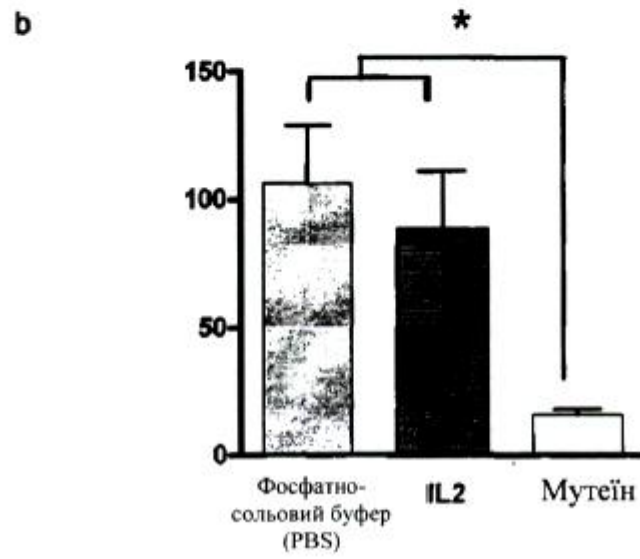
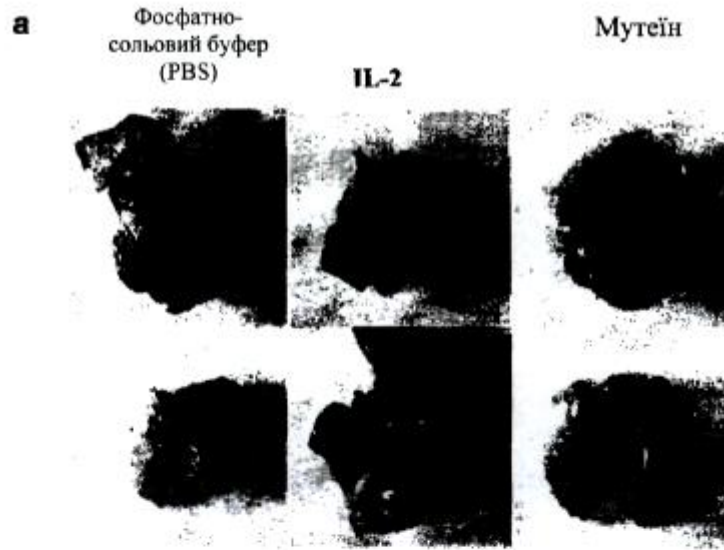
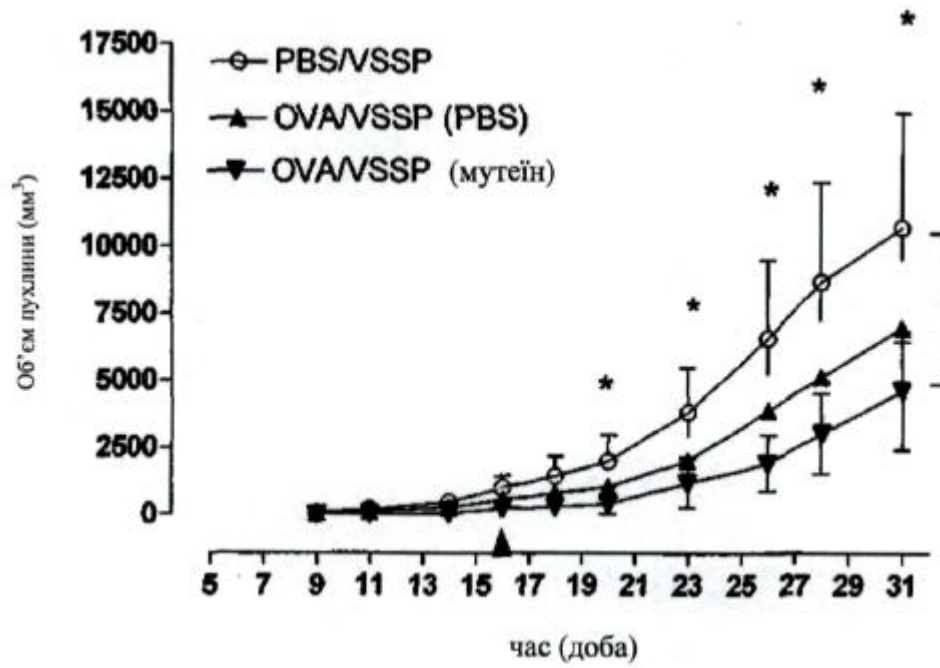


Fig. 5



Фіг. 6

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601