



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102099** (13) **C2**

(51) МПК (2013.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61P 37/00

A61P 37/06 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2010 14444**
(22) Дата подання заявки: **28.04.2009**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.06.2013**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **10 2008 023 820.1**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **08.05.2008**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **DE**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.03.2011, Бюл.№ 5**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.06.2013, Бюл.№ 11**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/EP2009/003076, 28.04.2009**

(72) Винахідник(и):
**Паульзен Даніела (DE),
Бруннер Ніна (DE),
Брей Дороті (GB)**
(73) Власник(и):
**АЙКУРІС ГМБХ & КО. КГ,
Friedrich-Ebert-Strasse 475, D-42117
Wuppertal, Germany (DE)**
(74) Представник:
**Петров Андрій Володимирович, реєстр.
№139**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 9960128 A1, 25.11.1999
US 6348192 B1, 19.02.2002
MATTHEWS L ET AL: "BAY 50-4798, a novel, high-affinity receptor-specific recombinant interleukin-2 analog, induces dose-dependent increases in CD25 expression and proliferation among unstimulated, human peripheral blood mononuclear cells in vitro" CLINICAL IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, US LNKD- DOI:10.1016/J.CLIM.2004.07.009, Bd. 113, Nr. 3, 1. Dezember 2004 (2004-12-01), Seiten 248-255

(54) ЗАСІБ, ПРИЗНАЧЕНИЙ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ Й/АБО ПРОФІЛАКТИКИ АУТОІМУННОГО ЗАХВОРЮВАННЯ Й ДЛЯ УТВОРЕННЯ РЕГУЛЯТОРНИХ Т-КЛІТИН

(57) Реферат:

Винахід стосується засобу, призначеного для лікування й/або профілактики аутоімунного захворювання, засобу, призначеного для утворення регуляторних Т-клітин (T_{Reg}) у живому організмі, й способів застосування заявлених засобів.

UA 102099 C2

Даний винахід відноситься до засобу, призначеному для лікування й/або профілактики аутоімунного захворювання, засобу, призначеному для утворення регуляторних Т-клітин (T_{Reg}) в організмі, і до різних способів, у яких застосовують засоби, запропоновані у винаході.

5 Аутоімунні захворювання характеризуються надлишковою реакцією імунної системи на ендогенну тканину. Імунна система помилково розпізнає ендогенну тканину як чужорідні тіла, які підлягають знищенню. Це приводить до серйозних запальних реакцій, що ушкоджують органи, в яких це має місце.

Важливу роль у розпізнаванні розходжень між ендогенними й екзогенними структурами грають Т-лімфоцити або Т-клітини, які «навчаються» у тимусі зв'язуватися («причалувати») 10 тільки з ендогенними молекулами клітинної поверхні, так званими молекулами головного комплексу гістосумісності (ГКГ), і у результаті бути толерантними до ендогенних структур. Ці процеси позначають як «клональна делеція» і «клональна селекція». У процесі початкової селекції у тимусі виживають тільки ті Т-клітини, які мають здатність розпізнавати молекули ГКГ на мембранах ендогенних клітин, однак при цьому їхнє зв'язування не є настільки сильним, щоб 15 воно могло приводити до активації Т-клітин. Всі Т-клітини, які не можуть зв'язуватися або розпізнавати ендогенні молекули ГКГ, елімінуються. При клональній делеції, що також має місце у тимусі, відбувається елімінація тих Т-клітин, які можуть «безпомилково» розпізнавати молекули ГКГ і мають здатність до сильного зв'язування з ендогенними молекулами ГКГ, у результаті чого вони можуть активуватися, що може приводити зрештою до деструкції 20 ендогенних клітин. Цей процес являє собою один із механізмів, які має імунна система, призначених для захисту «свого» і знищення «чужого» (екзогенного).

При аутоімунних захворюваннях поведження групи Т-клітин стає аномальним. Крім того, що вони ще зберігають функціональну здатність здійснювати захист від екзогенних молекул і організмів, вони здобувають також здатність атакувати ендогенну структуру. Органи або 25 тканини сприймаються як екзогенні. Це може мати різні наслідки: якщо вражаються життєво важливі структури, то аутоімунне захворювання може приводити до фатального кінця. Імунна система направляє свою захисну дію на ці структури, запускаються клітинні, а також гуморальні захисні реакції й утворюються аутоантитіла, у результаті чого з часом уражені органи припиняють свою функцію. Найбільше часто відбувається ослаблення імунної системи й 30 організм стає чутливим до всіх типів хвороб. У деяких обставинах порушується також розпізнавання екзогенних структур і у результаті більше не може ефективно запобігати поширення перероджених ракових клітин, і уражений організм стає більше чутливим до інфекційних хвороб. У процесі розвитку захворювання клітини імунної системи руйнують ендогенні структури, у той час як механізми відновлення організму намагаються у міру 35 можливості здійснювати регенерацію ушкоджених частин органа. Як правило, без лікування ця помилкова атака захисної системи триває протягом всього життя або аж до повного руйнування структури-мішені.

Незважаючи на інтенсивні дослідження, точні причини аутоімунних захворювань поки залишаються неясними. Відомі гіпотези базуються на припущенні, що аутоімунні захворювання 40 виникають у результаті генетичної схильності, наприклад, пов'язані з присутністю молекул ГКГ певних типів, у сполученні зі зовнішніми стимулами. Якщо в організмі ураженого індивідуума присутні зазначені генетично обумовлені фактори, а також якщо вони мають місце у сполученні з наявністю несприятливих факторів навколишнього середовища, таких як сильний стрес, інфекції, вагітність тощо, то це може приводити до виникнення аутоімунних захворювань.

45 Імунна система складається з різних клітин, які мають здатність знищувати інфекційні агенти, які можуть впроваджуватися в організм. Механізм імунної відповіді включає активацію спеціалізованих клітин і придбання ефекторних функцій, таких як цитотоксичність певних Т-клітин, які експресують так званий трансмембранний глікопротеїн CD8, і які тому позначають як CD8⁺ - Т-клітини.

50 Регуляторні Т-клітини (T_{Reg}), які раніше позначали також як супресорні Т-клітини, являють собою спеціалізовану підгрупу Т-клітин. їм властива функція придушення активації імунної системи й, як наслідок вони мають здатність регулювати ауто толерантність (толерантність до «свого») імунної системи. У результаті у здоровому організмі вони перешкоджають виникненню аутоімунних захворювань. Описано різні популяції T_{Reg} , включаючи популяції, які експресують 55 білки CD4, CD25 і Foxp3, і які позначають як CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітини. Крім того, відомі T_{Reg} , які експресують CD4 і Foxp3, але не експресують CD25, так звані CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ - Т-клітини.

У Lan зі співавторами («Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity», Autoimmun. Rev. 4(6), 2005, сс. 351-363) описана мишача модель з використанням якої встановлено, що виснаження регуляторних CD4⁺CD25⁺ - Т-клітин приводить до спонтанного 60 розвитку аутоімунних захворювань.

У Chatila T. A. («Role of regulatory T cells in human diseases», 116(5), 2006, сс. 949-959) наведені дані про те, що вроджений дефіцит регуляторних $CD4^+CD25^+$ - Т-клітин через мутацію у гені, що кодує білок Foxp3, сприяє розвитку аутоімунних захворювань.

Відомий огляд, що стосується регуляторних Т-клітин, у журналі «Nature Immunology», що опублікований у березні 2005 р.

Аутоімунні захворювання лікують залежно від ураженого органа. При цьому основним принципом етіотропної терапії є придушення активності імунної системи шляхом введення імунодепресантів, наприклад, кортизону. Ці субстанції характеризуються безліччю системних побічних дій і взаємодій, у зв'язку з чим намагалися зробити спроби створення нових лікарських засобів, що мають здатність специфічно впливати на механізми, які беруть участь у прояві захворювання. Прикладами таких лікарських засобів є наталізумаб і інфліксимаб. Наталізумаб являє собою моноклональне антитіло й виборчий інгібітор IgG4, молекули адгезії, яка локалізована на поверхні лейкоцитів. Наталізумаб інгібує міграцію лейкоцитів до вогнища запалення і його застосовують для лікування надзвичайно агресивних форм пов'язаного з утворенням бляшок прогресуючого розсіяного склерозу. Інфліксимаб являє собою химерне моноклональне антитіло до фактора некрозу пухлини α ($TNF\alpha$), що відіграє основну роль в аутоімунних запальних реакціях. Інфліксимаб застосовують при ревматоїдному артриті, хворобі Крона, хворобі Бехтерева й псоріазі.

Ehrenstein зі співавторами («Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti- $TNF\alpha$ therapy», J. Exp. Med., т. 200, №. 3, 2004, сс. 277-285), продемонстрували, що моноклональне антитіло до $TNF\alpha$, тобто інфліксимаб, може підвищувати ефективність лікування ревматоїдного артриту.

Аналогічне припущення висловлене Nadkarni зі співавторами («Anti- $TNF\alpha$ therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via $TGF-\beta$ », JEM, т. 204, 2007, сс. 33-39).

Bresson зі співавторами запропонували лікування діабету типу I шляхом спільного введення специфічного антитіла до $CD3\epsilon$ і пептиду проінсуліну.

Vandenbark зі співавторами («Therapeutic vaccination with a trivalent T-cell receptor (TCR) peptide vaccine restores deficient FoxP3 expression and TCR recognition in subjects with multiple sclerosis», Immunology, т. 123, 2008, сс. 66-78) описали поліпшення контролю автореактивної відповіді при розсіяному склерозі після вакцинації пацієнтів певними TCR-пептидами.

Хоча зазначені нові субстанції мають дуже специфічну дію, при їхньому застосуванні можуть виникати серйозні побічні дії, наприклад, можливе виникнення прогресуючої мультифокальної лейкоенцефалопатії. Із цієї причини всього лише через 3 місяці після його першої реєстрації у США наталізумаб був знову вилучений з продажу. Вартість цих нових активних субстанцій є дуже високою. У цей час вартість 300 мг наталізумабу становить порядку 2000.00 євро. Вартість 200 мг інфліксимабу приблизно 1700.00 євро.

З урахуванням вищесказаного завданням даного винаходу було створення нової фармацевтичної композиції, призначеної для лікування й/або профілактики аутоімунного захворювання, що максимально позбавлена недоліків, відомих у даній області. Зокрема, пропонується фармацевтична композиція, яка відрізняється гарною переносимістю й низькою токсичністю.

Ще одним завданням даного винаходу є створення засобу, призначеного для утворення регуляторних Т-клітин (T_{Reg}) в організмі.

Ці проблеми вирішуються за допомогою мутеїну людського інтерлейкіну 2 (мутеїн hIL-2) або його ділянки або фрагмента, який пронумерований відповідно до hIL-2 дикого типу й має амінокислотну заміну щонайменше в одному з положень 20, 88 або 126.

При створенні винаходу знезацька було встановлено, що зазначений мутеїн hIL-2 або його ділянка має високий терапевтичний потенціал, який можна використовувати для лікування й профілактики аутоімунних захворювань. Так, наприклад, при створенні винаходу вдалося продемонструвати на різних експериментальних препаратах, що мутеїн hIL-2 вибірково індукуює утворення в організмі регуляторних Т-клітин, таких як $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ і $CD4^+CD25^+Foxp3^+$.

При створенні винаходу знезацька було встановлено, що мутеїн hIL-2, запропонований у винаході, характеризується істотно більше високою активністю у відношенні регуляторних Т-клітин, ніж hIL-2 дикого типу. Це найбільше яскраво проявляється при застосуванні у високих концентраціях.

Відносно мутеїну hIL-2, запропонованого у винаході, у WO 99/60128 описано, що він зв'язується з більшої афінністю з трьохланцюговим рецептором IL-2 ($IL-2R\alpha\beta\gamma$), ніж з дволанцюговим рецептором IL-2 ($IL-2R\beta\gamma$). При створенні даного винаходу вперше встановлено, що у порівнянні з hIL-2 дикого типу мутеїн hIL-2, запропонований у винаході, індукуює, але, як

зненацька було встановлено при створенні винаходу, має також здатність підсилювати утворення регуляторних Т-клітин, у яких відсутня α -субодиниця рецептора IL-2 (CD25) (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺). Зазначена субпопуляція бере участь також у придушенні активації імунної системи й у результаті у регуляції ауто толерантності імунної системи. У результаті мутеїн hIL-2, запропонований у винаході, характеризується істотно більше високою ефективністю як активна субстанція, призначена для лікування аутоімунних захворювань, ніж hIL-2 дикого типу.

При створенні винаходу продемонстровано також, що мутеїн hIL-2 індукує утворення CD8-позитивних регуляторних Т-клітин, таких як CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ і CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (дані не представлені), які відіграють вирішальну роль у придушенні аутоімунних захворювань.

Крім того, мутеїн hIL-2, запропонований у винаході, має додаткову перевагу у порівнянні з hIL-2 дикого типу, оскільки він вибірково активує Т-клітини на відміну від природних клітин-кіллерів (NK-клітини), і у результаті характеризується зниженим профілем токсичності й підвищеним терапевтичним індексом. У результаті мутеїн hIL-2, запропонований у винаході, істотно краще переноситься, ніж hIL-2 дикого типу (див. WO 99/60128).

Крім того, з урахуванням цитотоксичності CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺ - Т-клітин, при створенні винаходу вперше зненацька був встановлено, що на відміну від hIL-2 дикого типу мутеїн hIL-2, запропонований у винаході, не робить вплив або робить лише невеликий вплив на проліферацію CD8-позитивних цитотоксичних Т-клітин, які позначають також як «несенсибілізовані, центральні клітини пам'яті, недиференційовані (клітини-попередники)» і «остаточно диференційовані» CD8-Т-клітини. Це є перевагою, оскільки вважається, що цитотоксичні CD8⁺ - Т-клітини можуть бути відповідальними за стійкі хронічні запальні процеси при аутоімунних захворюваннях (ер. Liu та ін., Multiple Sclerosis, 13, 2007, с. 149 і Haeghele та ін., Neuroimmunol, 183, 2007, с. 168). Таким чином, у порівнянні з hIL-2 дикого типу мутеїн hIL-2, запропонований у винаході, додатково перешкоджає інтенсифікації цієї запальної реакції, яка викликається CD8⁺ - Т-клітинами, що є ще однією його перевагою з позицій переносимості.

При створенні винаходу встановлено також, що мутеїн hIL-2, запропонований у винаході, може стимулювати також антигенспецифічну активність імунних клітин. Перевагою цього є те, що за допомогою мутеїну hIL-2 вибірково стимулюють специфічні для захворювання імунні клітини й тим самим обмежують системну дію імунної терапії. У результаті при введенні мутеїну hIL-2 запобігають також індукцію інших захворювань.

Крім того, за допомогою мишачої моделі цукрового діабету типу I при створенні винаходу було встановлено також, що шляхом обробки мутеїном hIL-2, запропонованим у винаході, можна попереджати виникнення аутоімунного захворювання.

Таким чином, повністю вирішене завдання, покладене в основу винаходу.

Відповідно до винаходу під людським інтерлейкіном 2 «дикого типу» (hIL-2 дикого типу) мають на увазі поліпептид або білок, амінокислотна послідовність якого складається з 133 амінокислот, які присутні у людському IL-2, що зустрічається у природних умовах (без сигнального пептиду, що складається з додаткових 20 амінокислот на N-кінці). hIL-2 дикого типу можна експресувати як у природних умовах, так і одержувати методом рекомбінації. Амінокислотна послідовність hIL-2 дикого типу описана у Fujita та ін., PNAS USA 80, 1983, сс. 7437-7441, як у вигляді послідовності, що включає додатковий N-кінцевий метіонін, що обов'язково повинен бути присутнім, коли білок експресують в *E. coli* у вигляді внутрішньоклітинної фракції, так і у вигляді послідовності без N-кінцевого метіоніну. Амінокислотна послідовність hIL-2 дикого типу описана у прикладеному переліку послідовностей у вигляді SEQ ID No. 1. Нуклеотидна послідовність кДНК, яка кодує hIL-2, описана у прикладеному переліку послідовностей у вигляді SEQ ID No. 2.

Відповідно до винаходу під «мутеїном» людського інтерлейкіну 2 (мутеїн hIL-2) мають на увазі поліпептид або білок, в якому у порівнянні з hIL-2 дикого типу здійснені певні заміни. Ідентифікація положень, в яких здійснені заміни, заснована на положеннях амінокислот у послідовності hIL-2 дикого типу, в якості якої можна застосовувати, наприклад, SEQ ID No. 1. Таким чином, аланін (А) локалізований у положенні 1, пролін (Р) у положенні 2, треонін (Т) у положенні 133 тощо. Залишок аспарагінової кислоти (D) у положенні 20 («D20») можна замінювати, наприклад, на залишок ізолейцину (I) або гістидину (H), одержуючи тим самим мутеїни IL-2, які позначають як hIL-2-D20I і hIL-2-D20H відповідно.

Очевидно, що у мутеїні hIL-2, запропонованому у винаході, можна здійснювати заміни у декількох із зазначених положень 20, 88 або 126, одержуючи у результаті комбіновані мутанти, які особливо придатні для лікування аутоімунного захворювання або для індукції регуляторних Т-клітин.

Відповідно до винаходу мутеїн hIL-2 може являти собою також модифікований поліпептид, наприклад, глікозилований мутеїн hIL-2. Глікозиловані мутеїни hIL-2 описані, наприклад, у заявках на патент США 09/310026 і 10/051657, які включені у даний опис як посилання.

Відповідно до винаходу під «ділянкою» або «фрагментом» мутеїну hIL-2 мають на увазі поліпептид, в якому у порівнянні з мутеїном hIL-2 відсутня(і) одна або декілька амінокислот на N- і/або C-кінці, але який все ще має достатню біологічну активність мутеїну hIL-2, що дозволяє застосовувати його відповідно до винаходу для лікування й/або профілактики аутоімунних захворювань. Зазначена активність розглядається як достатня, якщо ділянка або фрагмент має активність, що становить щонайменше 50%, переважно щонайменше 60%, більше переважно щонайменше 70%, більше переважно щонайменше 80%, більше переважно щонайменше 90% і найбільше переважно щонайменше 95% від активності мутеїну hIL-2, відносно індукції регуляторних Т-клітин. Активність мутеїну hIL-2 можна легко оцінювати методами, відомими фахівцеві у даній області. Такий метод описаний, наприклад, у WO 99/60128, приклади 3-5. Зазначена публікація включена у даний опис як посилання.

Відповідно до винаходу переважно, якщо заміни у зазначених положеннях не являють собою консервативні заміни, при яких одну амінокислоту замінюють на іншу амінокислоту, що має подібні біохімічні властивості.

Так, є кращим, щоб заміна у положенні 20 не являла собою заміну аспарагінової кислоти (D) на глутамінову кислоту (E). Переважно, щоб заміна у положенні 88 не являла собою заміну аспарагіну (N) на аланін (A), пролін (P), гліцин (G), глутамін (Q), серин (S) або треонін (T). Крім того, переважно, щоб заміна у положенні 126 не являла собою заміну глутаміну (Q) на аланін (A), пролін (P), гліцин (G), аспарагін (N), серин (S) або треонін (T). Ці заміни не змінюють або лише незначно змінюють біологічну активність у порівнянні з активністю hIL-2 дикого типу.

Крім того, кращим є, якщо у зазначених положеннях не здійснюють заміни, інтродукуючих сайти міжмолекулярних перехресних зв'язків або «неправильних» зв'язків за допомогою дисульфідних містків. Тому заміна у мутеїні hIL-2, запропонованому у винаході, у положенні 20 переважно не являє собою заміну аспарагінової кислоти (D) на аргінін (R), аспарагін (N), аспарагінову кислоту (D), цистеїн (C), глутамінову кислоту (E), гліцин (G), лейцин (L), лізин (K), фенілаланін (F), пролін (P), треонін (T) або триптофан (W). Заміна у положенні 88 переважно не являє собою заміну аспарагіну (N) на аспарагінову кислоту (D), цистеїн (C), глутамін (Q), триптофан (W) або пролін (P). Заміна у положенні 126 переважно не являє собою заміну глутаміну (Q) на аланін (A), гістидин (H), триптофан (W), цистеїн (C), глутамін (Q), глутамінову кислоту (E) або лізин (K).

Мутеїн hIL-2, запропонований у винаході, можна одержувати будь-яким прийнятним методом, відомим у даній області. Такі методи передбачають конструювання послідовності ДНК, що кодує мутеїн IL-2, запропонований у винаході, і яка, наприклад, включає нуклеотидну послідовність, представлену у SEQ ID No. 2, і експресію цієї послідовності у прийнятному хазяїні. Цей метод дозволяє одержувати мутеїни, запропоновані у винаході, у рекомбінантній формі. Однак мутеїн, запропонований у винаході, можна одержувати також хімічним синтезом і методом рекомбінантної ДНК. Одержання мутеїну, запропонованого у винаході, докладно описане у WO 99/60128, варіанти здійснення винаходу 1 і 2, які включені у даний опис як посилання.

Найбільше кращий відповідно до винаходу мутеїн hIL-2, в якому у положенні 88 аспарагін (N) замінений на аргінін (R) (ML-2-N88R), доступний фахівцеві у даній області за назвою BAY50-4798 (див. Shanafelt та ін., «A T-cell-selective interleukin 2 mutein exhibits potent antitumor activity and is well tolerated in vivo», Nat. Biotechnol., т. 18, 2000, сс. 1197-1202). Амінокислотна послідовність hIL-2-N88R описана у прикладеному переліку послідовностей у вигляді SEQ ID No. 3.

При створенні винаходу знезацька було встановлено, що у даній області відсутні відомості про таку активність мутеїну IL-2.

Так, у WO 99/60128 описаний мутеїн hIL-2-N88R, що може вибірково активувати Т-клітини на відміну від природних клітин-кіллерів і має здатність зменшувати утворення метастазів у легені.

У WO 02/00243 описана стабільна, що містить гістидин, вільна від альбуміну препаративна форма мутеїну hIL-2-N88R.

В US 2002/0164300 описаний глікозилований варіант мутеїну hIL-2-N88R.

Застосування мутеїну hIL-2, запропонованого у винаході, для цілеспрямованого лікування й/або профілактики аутоімунних захворювань або для виборчої активації регуляторних Т-клітин в організмі раніше не було описано й воно не є очевидним, виходячи з існуючого рівня техніки.

Навіть для людського IL-2 дикого типу відсутні відповідні відомості.

Van der Vliet зі співавторами («Effects of the administration of high-dose interleukin-2 on immunoregulatory cell subsets in patients with advanced melanoma and renal cell cancer», Clin. Cancer Res., т. 13, 2007, сс. 2100-2108) продемонстрували, що при введенні IL-2 у високих дозах його терапевтична ефективність відносно лікування пухлин знижується.

Ahmadzadeh і Rosenberg («IL-2 administration increases CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients», Blood, т. 107, 2006, сс. 2409-2414) запропонували здійснювати підвищення терапевтичної ефективності людського IL-2 дикого типу у відношенні пацієнтів, що мають пухлини, шляхом елімінації у пацієнтів регуляторних Т-клітин. Однак від цього підходу запропоновано відмовитися у зв'язку з його не перспективністю (див. Powell та ін., «Inability to mediate prolonged reduction of regulatory T cells after transfer of autologous CD25-depleted PBMC and interleukin-2 after lymphodepleting chemotherapy», J. Immunother., т. 30, 2007, сс. 438-447).

Antony і Restifo («CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells, immunotherapy of cancer, and interleukin-2», J. Immunother., т. 28, 2005, сс. 120-128), вказали на ще меншу перспективність IL-2 в якості імунотерапевтичного агента й навіть припустили, що введення IL-2 може індукувати аутоімунітет.

Knoechel зі співавторами («Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen», JEM, т. 202, 2005, сс. 1375-1386) висловили аналогічний погляд і навіть запропонували використовувати антагоніст IL-2, тобто інгібітор механізмів IL-2, для лікування ранньої фази аутоімунних захворювань.

Таким чином, з існуючого рівня техніки не є очевидним рішення, запропоноване у винаході.

Так, при створенні винаходу було встановлено також, що терапевтичну дію мутеїну hIL-2 можна змінювати залежно від показання й застосовуваної концентрації. Застосування hIL-2 у високих концентраціях може виявитися доцільним для лікування аутоімунних захворювань, але протипоказане для лікування пухлинних захворювань.

Застосування, запропоноване у винаході, є кращим, якщо використовують наступні заміни: аспарагін у положенні 88 заміняють на аргінін (hIL-2-N88R) або на гліцин (hIL-2-N88G), або на ізолейцин (hIL-2-N88I); і/або використовують наступні заміни: аспарагінову кислоту у положенні 20 заміняють на гістидин (hIL-2-D20H) або на ізолейцин (hIL-2-D20I), або на тирозин (hIL-2-D20Y); або використовують наступну заміну: глутамін у положенні 126 заміняють на лейцин (hIL-2-Q126L).

Перевага такого підходу полягає у тому, що застосовують мутеїн hIL-2, запропонований у винаході, відмітною ознакою якого є його здатність специфічно вибірково активувати Т-клітини на відміну від природних клітин-кіллерів, і тому він має високий терапевтичний потенціал і низьку токсичність. Ці властивості кращих мутеїнів hIL-2, запропонованих у винаході, описані у WO 99/60128, що включена у даний опис як посилання.

Відповідно до винаходу є кращим, якщо мутеїн hIL-2 або його фрагмент несуть щонайменше одну додаткову амінокислотну заміну у будь-якому положенні крім положень 20, 88 або 126, у результаті чого зазначений мутеїн hIL-2, що має додаткову заміну, або зазначена(ий) його ділянка або фрагмент, що має додаткову заміну, має амінокислотну послідовність, яка ідентична щонайменше на 80%, переважно на 85%, більше переважно на 90%, більше переважно на 95%, найбільше переважно на 99% амінокислотній послідовності мутеїну hIL-2 або його ділянки або фрагмента, що не має додаткових замін у порівнянні з hIL-2 дикого типу за винятком заміни щонайменше в одному з положень 20, 88 або 126.

Перевагою такого підходу є можливість одержання альтернативних первинних структур, які у деяких випадках легше синтезувати, ніж мутеїн hIL-2, що, крім заміни щонайменше в одному з положень 20, 88 або 126, повністю відповідає hIL-2 дикого типу. Для одержання поліпептиду, що має біологічну активність мутеїну hIL-2 або його ділянки, і відповідно лікарського засобу, призначеного для лікування й/або профілактики аутоімунного захворювання, не є абсолютно необхідним одержувати поліпептид, амінокислотна послідовність якого ідентична на 100% амінокислотній послідовності мутеїну hIL-2 або його ділянки, запропонованого у винаході. Навпаки, достатнім є наявність відповідного високого відсотка ідентичності, якщо пов'язана з цим помірна втрата активності є припустимою, але переважно зберігається щонайменше 50, 60, 70, 80, 90, 95 або 99% активності. Зазначені величини ідентичності відносяться до ділянки мутеїну hIL-2, запропонованого у винаході, що складається з ≥ 10 амінокислот. Ступінь гомології можна легко визначати за допомогою методів, відомих фахівцеві у даній області, наприклад, шляхом аналізу з використанням програми BLAST або модуля MegAlign програми Lasergene фірми DNASTar Inc.

Відповідно до винаходу кращим є також, якщо додаткова амінокислотна заміна у кожному з положень крім положень 20, 88 або 126 являє собою консервативну амінокислотну заміну.

Перевага такого підходу полягає у тому, що одержують додаткові варіанти мутеїну hIL-2, запропонованого у винаході, які характеризуються досить високою активністю, що дозволяє застосовувати їх для лікування й/або профілактики аутоімунних захворювань або для індукції регуляторних Т-клітин в організмі. Фахівцям у даній області відомо, що консервативні заміни не роблять ніякого впливу або роблять лише незначний вплив на вторинну або третинну структуру мутеїну. Зазначені консервативні заміни включають заміни, описані Dayhoff у «The Atlas of Protein Sequence and Structure», т. 5, вид-в Natl. Biomedical Research. Наприклад, амінокислоти, які належать до однієї з наступних груп, можна замінювати одна на одну, тобто використовувати для консервативної заміни:

- аланін (A), пролін (P), гліцин (G), аспарагін (N), серин (S), треонін (T);
- цистеїн (C), серин (S), тирозин (Y), треонін (T);
- валін (V), ізолейцин (I), лейцин (L), метіонін (M), аланін (A), фенілаланін (F);
- лізин (K), аргінін (R), гістидин (H);
- фенілаланін (F), тирозин (Y), триптофан (W), гістидин (H); і
- аспарагінова кислота (D), глютамінова кислота (E).

Засіб, запропонований у винаході, призначений для індукції утворення регуляторних Т-клітин в організмі, переважно являє собою фармацевтичну композицію, що містить фармацевтично прийнятний носій.

Перевага такого підходу полягає у тому, що засіб уже має форму, придатну для безпосереднього введення в організм, переважно у людський організм.

Фармацевтично прийнятні носії добре відомі у даній області (див. Row та ін., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5-е вид., вид-в Pharmaceutical Press and American Pharmacists' Association, 2006; Bauer та ін., Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1999). Найбільше краща препаративна форма описана у WO 02/00243, що включена у даний опис як посилання. Ця препаративна форма не містить альбумін і стабілізацію мутеїну hIL-2 або його ділянки здійснюють за допомогою гістидину. Переважно кінцевий лікарський засіб містить наступні компоненти у зазначених концентраціях: мутеїн hIL-2 або його ділянка = 0,1-5 мг/мл; гістидин = 0,08-1,6 мас.%; NaCl = 0-0,9 мас.%; сахароза = 1-10 мас.%; гліцин = 0-0,3 мас.%, і має значення pH, що становить приблизно 5-6,5.

Відповідно до конкретного варіанта здійснення винаходу фармацевтична композиція містить також імунодепресант.

З урахуванням високої ефективності мутеїну hIL-2, запропонованого у винаході, саму фармацевтичну композицію можна застосовувати для монотерапії як єдиний засіб для лікування й/або профілактики аутоімунних захворювань. Такий препарат, призначений для монотерапії, містить мутеїн hIL-2, запропонований у винаході, в якості єдиної активної субстанції. У цьому контексті фармацевтично прийнятні носії, розчинники (буфери, вода тощо), добавки тощо не відносяться до активних субстанцій.

Перевага такого підходу полягає у тому, що терапевтичний індекс лікарського засобу, запропонованого у винаході, додатково підвищують шляхом включення стандартного імунодепресанта.

Переважно імунодепресант вибирають з групи, що включає глюкокортикоїд, у тому числі декортин, преднізол; азатіоприн; циклоспорин А; мікофенолята мофетил; такролімус; глобулін до Т-ліфоцитів, антитіла до CD3, включаючи муромонаб; антитіла до CD25, включаючи базиликсимаб і даклізумаб; антитіла до TNF- α , включаючи інфліксимаб і адаліумаб; азатіоприн; метотрексат; циклоспорин; сиролімус; еверолімус; фінголімод; селлцепт (CellCept); міфортік і циклофосфамід.

Перевага такого підходу полягає у тому, що застосовують імунодепресант, для якого продемонстрована терапевтична активність при аутоімунних захворюваннях і використання якого є досить розповсюдженим у даній області.

Крім того, переважно, якщо аутоімунне захворювання вибирають з групи, що включає: цукровий діабет типу I, ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, хронічний гастрит, хвороба Крона, базедова хвороба, хвороба Бехтерева, псоріаз, важка псевдопаралітична міастенія, аутоімунний гепатит, APECED (аутосомальна поліендокринопатія-кандидоз-ектодермальна дистрофія), синдром Черджа-Стросс, неспецифічний виразковий коліт, гломерулонефрит, синдром Гійєна-Барре, тироїдит Хашімото, ліхен-склероз, системну червону вовчанку, PANDAS (педіатричний аутоімунний нейропсихічний розлад), ревматичну лихоманку, саркоїдоз, синдром Шегрена, синдром «негнучкої людини», склеродерму, грануломатоз Вегенера, вітіліго, аутоімунну ентеропатію, синдром Гудпасчера, дерматоміозит, поліміозит, аутоімунну алергію, астму й аутоімунну реакцію після трансплантації органів.

Перевага такого підходу полягає у тому, що одержують лікарський засіб, який можна застосовувати для лікування й/або профілактики найбільше важливих аутоімунних захворювань.

5 Наступним об'єктом даного винаходу є фармацевтична композиція, призначена для лікування й/або профілактики аутоімунного захворювання, що містить мутеїн hIL-2, запропонований у винаході, або його фрагмент.

Особливості й переваги, а також визначення понять, які описані відносно застосування, запропонованого у винаході, відносяться також до фармацевтичної композиції, запропонованої у винаході.

10 Наступним об'єктом даного винаходу є засіб, призначений для утворення регуляторних Т-клітин (T_{Reg}) в організмі, що містить мутеїн hIL-2, запропонований у винаході, або його фрагмент.

Переваги й особливості, а також визначення понять, які описані відносно застосування, запропонованого у винаході, відносяться також до засобу, запропонованому у винаході.

15 Іншими об'єктами даного винаходу є способи, призначені для лікування й/або профілактики аутоімунного захворювання організму й для утворення регуляторних Т-клітин (T_{Reg}) в організмі, кожний з яких полягає у тому, що здійснюють наступні стадії, на яких: (а) створюють мутеїн людського інтерлейкіну 2 (мутеїн hIL-2) або його фрагмент, (б) вводять мутеїн hIL-2 або його фрагмент в організм і (в) при необхідності повторюють стадії (а) і (б), при цьому мутеїн hIL-2 або його фрагмент являє собою мутеїн hIL-2, запропонований у винаході, або його фрагмент.

Організм переважно являє собою ссавець, більше переважно людський організм.

Особливості й переваги, а також визначення понять, які описані відносно застосування, запропонованого у винаході, відносяться також до вищевказаних способів, запропонованих у винаході, призначених для лікування й/або профілактики аутоімунного захворювання в організмі й для утворення регуляторних Т-клітин (T_{Reg}) в організмі.

25 Наступним об'єктом даного винаходу є спосіб утворення регуляторних Т-клітин (T_{Reg}) *in vitro*, який полягає у тому, що здійснюють наступні стадії, на яких: (а) створюють мутеїн людського інтерлейкіну 2 (мутеїн hIL-2) або його фрагмент, (б) приводять у контакт мутеїн hIL-2 або його фрагмент із моноклеарними клітинами периферичної крові (PBMC) і (в) при необхідності повторюють стадії (а) і (б), при цьому мутеїн hIL-2 або його фрагмент являє собою мутеїн hIL-2, запропонований у винаході, або його фрагмент.

Приведення у контакт hIL-2 або його фрагмента з PBMC можна здійснювати у будь-якому середовищі, придатному для культивування PBMC.

Особливості й переваги, а також визначення понять, які описані відносно застосування, запропонованого у винаході, відносяться також до вищевказаного способу, запропонованому у винаході, призначеному для утворення регуляторних Т-клітин (T_{Reg}) *in vitro*.

Наступним об'єктом даного винаходу є спосіб лікування й/або профілактики аутоімунного захворювання в організмі, який полягає у тому, що здійснюють наступні стадії, на яких: (а) створюють мутеїн людського інтерлейкіну 2 (мутеїн hIL-2) або його фрагмент, (б) приводять у контакт мутеїн hIL-2 або його фрагмент із моноклеарними клітинами периферичної крові (PBMC), отриманими з першого організму, (в) інкубують мутеїн hIL-2 або його фрагмент із PBMC для одержання клітинної популяції, що містить регуляторні Т-клітини (T_{Reg}), і (г) інтродують клітинну популяцію у другий організм, при цьому мутеїн hIL-2 або його фрагмент являє собою мутеїн hIL-2, запропонований у винаході, або його фрагмент.

45 Перший організм і другий організм переважно мають ідентичну групу крові, особливо переважно, якщо перший і другий організми є ідентичними організмами або індивідуумами.

Перевага даного винаходу полягає у тому, що при інтродукції або реінфузії клітинної популяції не виникають небажані імунні реакції на клітини, і тому для способу характерні дуже незначні побічні дії.

50 Особливості й переваги, а також визначення понять, які описані відносно застосування, запропонованого у винаході, відносяться також до вищевказаного способу, запропонованому у винаході, призначеному для лікування й/або профілактики аутоімунного захворювання організму.

Очевидно, що особливості, зазначені вище, і ті, які будуть пояснені нижче, без відхилення від обсягу даного винаходу можна використовувати не тільки у конкретному зазначеному сполученні, але й в інших комбінаціях або індивідуально.

Нижче винахід пояснений більше детально на основі конкретних прикладів, які дані тільки для ілюстрації варіантів здійснення винаходу й не обмежують обсяг винаходу. При цьому зроблене посилання на прикладені креслення, на яких показане:

на фіг. 1 - результати досліджень на здорових людях, які свідчать про те, що hIL-2-N88R при його застосуванні у дозах, рівних або більше низьких, ніж дози пролейкіну, індукує збільшення кількості регуляторних $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ - Т-клітин більшою мірою;

на фіг. 2 - результати досліджень на здорових людях, які свідчать про те, що hIL-2-N88R при його застосуванні у дозах, рівних або більше низьких, ніж дози пролейкіну, індукує збільшення кількості регуляторних $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ - Т-клітин більшою мірою;

на фіг. 3 - результати досліджень на страждаючих меланомою пацієнтах, які свідчать про те, що hIL-2-N88R при його застосуванні у дозах, рівних або більше низьких, ніж дози пролейкіну, індукує збільшення кількості регуляторних $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ - Т-клітин більшою мірою;

на фіг. 4 - результати досліджень на страждаючих меланомою пацієнтах, які свідчать про те, що hIL-2-N88R при його застосуванні у дозах, рівних або більше низьких, ніж дози пролейкіну, індукує збільшення кількості регуляторних $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ - Т-клітин більшою мірою;

на фіг. 5 - результати досліджень на страждаючих розсіяним склерозом пацієнтах, які свідчать про те, що hIL-2-N88R при його застосуванні у дозах, рівних або більше низьких, ніж дози пролейкіну, індукує збільшення кількості регуляторних $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ - Т-клітин більшою мірою;

на фіг. 6 - результати досліджень на страждаючих розсіяним склерозом пацієнтах, які свідчать про те, що hIL-2-N88R при його застосуванні у дозах, рівних або більше низьких, ніж дози пролейкіну, індукує збільшення кількості регуляторних $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ - Т-клітин більшою мірою;

на фіг. 7 - результати досліджень на страждаючих розсіяним склерозом пацієнтах, які свідчать про те, що hIL-2-N88R при його застосуванні у дозах, рівних або більше низьких, ніж дози пролейкіну, індукує збільшення кількості цитотоксичних $CFSE_{low}/CD3^+CD8^+CD45RO^+$ - Т-клітин у меншому ступені;

на фіг. 8 - результати досліджень на здорових людях, які свідчать про те, що hIL-2-N88R при його застосуванні у дозах, рівних або більше низьких, ніж дози пролейкіну індукує збільшення кількості цитотоксичних $CFSE_{low}/CD3^+CD8^+CD45RO^+$ - Т-клітин у меншому ступені;

на фіг. 9 - результати досліджень на мишачій моделі діабету типу I, які свідчать про те, що hIL-2-N88R у порівнянні з hIL-2 дикого типу обумовлює більше підвищення вмісту (у відсотках) $FoxP3^+$ -клітин у популяції $CD4^+$ -клітин (А). Крім того, зазначені $CD4^+FoxP3^+$ -клітини характеризуються більше високим рівнем експресії CD25 (Б);

на фіг. 10 - результати досліджень на мишачій моделі діабету типу I, які свідчать про те, що hIL-2-N88R на відміну від hIL-2 дикого типу попереджає розвиток діабету.

Варіанти здійснення винаходу

1. Матеріал і методи

1.1 Виділення PBMC з суцільної крові для застосування в аналізах *in vitro*

Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) з організмів здорових індивідуумів, пацієнтів, що страждають меланомою або пацієнтів, що страждають розсіяним склерозом (РС), виділяють з крові з використанням середовища для поділу лімфоцитів (Histopaque, фірма Sigma Aldrich). Для цієї мети дві пробірки з кров'ю (7 або 10 мл), отриманої з організму одного й того ж здорового індивідуума або пацієнта, переносять у стерильну 50-мілілітрову пробірку й доводять об'єм до 30 мл за допомогою середовища RPMI 1640 (фірма InVitrogen, № 14190-69). Потім 30 мл розведеної крові нашаровують на 15 мл розчину з безперервним градієнтом щільності (щільність = 1,077; Histopaque, фірма Sigma Aldrich, № 10771).

Після центрифугування при 400 g протягом 40 хв при 20°C без струшування збирають два «кільця, що містять лейкоцити» і переносять у стерильну 50-мілілітрову пробірку й відмивають двічі забуференим фосфатом фізіологічним розчином (ЗФР; фірма InVitrogen, № 14190-169). У випадку забруднення еритроцитами здійснюють лізис RBC («еритроцити»); до клітинного дебрису додають 2 мл розчину для лізису RBC і здійснюють інкубацію протягом 2 хв при обережному перемішуванні при кімнатній температурі з наступною процедурою відмивання з використанням більшого обсягу повного середовища (RPMI 1640 з 10% фетальної телячої сироватки).

Кількість живих лейкоцитів визначають шляхом фарбування методом виключення трипанового синього (фірма InVitrogen, № 15250-061) і з використанням гемоцитометра (FisherBioblock A2759B).

1.2 Мічення з використанням флуоресцентної мітки CFSE

Після підрахунку клітини відмивають двічі ЗФР і ресуспендують у ЗФР у концентрації 1×10^6 клітин/мл. Додають CFSE (фірма InVitrogen, № C1157) у кінцевій концентрації 0,5 мкМ. Після 10-хвилинної інкубації у темряві при 37°C мічені за допомогою CFSE клітини відмивають тричі

свіжим повним середовищем при 4°C і ресуспендують у повному середовищі у концентрації 1×10^6 клітин/мл для посіву.

1.3 Стимуляція PBMC in vitro

5 PBMC або залишають без стимуляції, або стимулюють hIL-2 дикого типу (пролейкін) або hIL-2-N88R (BAY 50-4798; лот № PR312C008) з додаванням пулу синтетичних пептидів, які одержують зі специфічних для меланоми білків gp100, TRP-2, MART-1 і тирозинази або з білка MOG, специфічного для розсіяного склерозу (РС), кожний пептид додають у кінцевій концентрації 2,5 мкм (пептид, специфічний для меланоми) або 30 мкг/мл (пептид, специфічний для РС), або без додавання зазначеного пулу пептидів.

10 Додають стимулятор і пептид, одержуючи 23 наступних варіанта:

Таблиця 1

Варіанти стимуляції PBMC

Варіант	Стимулятор	Кінцева концентрація	
1	hIL-2-N88R (BAY 50-4798; №PR312C008)	10^{-11} М	без додавання пептидів
2	hIL-2-N88R (BAY 50-4798; №PR312C008)	10^{-11} М	з додаванням пептидів
3	ML-2-N88R (BAY 50-4798; №PR312C008)	10^{-9} М	без додавання пептидів
4	ML-2-N88R (BAY 50-4798; №PR312C008)	10^{-9} М	з додаванням пептидів
5	ML-2-N88R (BAY 50-4798; №PR312C008)	10^{-8} М	без додавання пептидів
6	hIL-2-N88R (BAY 50-4798; №PR312C008)	10^{-8} М	з додаванням пептидів
7	hIL-2-N88R (BAY 50-4798; №PR312C008)	10^{-7} М	без додавання пептидів
8	hIL-2-N88R (BAY 50-4798; №PR312C008)	10^{-7} М	з додаванням пептидів
9	hIL-2-N88R (BAY 50-4798; №PR312C008)	10^{-6} М	без додавання пептидів
10	ML-2-N88R (BAY 50-4798; №PR312C008)	10^{-6} М	з додаванням пептидів
11	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10^{-11} М	без додавання пептидів
12	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10^{-11} М	з додаванням пептидів
13	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10^{-9} М	без додавання пептидів
14	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10^{-9} М	з додаванням пептидів
15	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10^{-8} М	без додавання пептидів
16	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10^{-8} М	з додаванням пептидів
17	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10^{-7} М	без додавання пептидів
18	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10^{-7} М	з додаванням пептидів
19	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10^{-6} М	без додавання пептидів
20	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10^{-6} М	з додаванням пептидів
21	ФГА	5 мкг/мл	
22	без стимуляції		
23	тільки пептид		з додаванням пептидів

Потім клітини культивують протягом 6 днів при 37°C в атмосфері, що містить 5% CO₂.

1.4 Аналіз проліферації й фенотипування з використанням проточного цитометра FC500

15 Фарбування клітин флуоресцентноміченими антитілами до розташованих на клітинній поверхні молекул-маркерів дозволяє вивчати проліферацію певних підгруп лімфоцитів (клітини

пам'яті й маркери активації, див. таблицю 2). Імунофарбування з використанням мічених флуорохромом (PE: фікоеритрин, ECD: PE-техаський червоний, APC: алофікоціанін, PC7: PE-Cy7) антитіл здійснюють до початку культивування й після культивування протягом 6 днів з використанням стимуляторів.

- 5 У день 6 перші два фарбування (1 і 1ізо) здійснюють з використанням клітин, не мічених за допомогою CFSE (CFSE: сукцинімідилловий ефір карбоксифлуоресцеїндацетату); інші фарбування здійснюють з використанням мічених за допомогою CFSE клітин.

Таблиця 2

Схема фарбування PBMC

	PE	ECD	APC	PC7
1	CD25	CD45	Foxp3	CD4
1ізо	CD25	CD45	щурячий IgG2a	CD4
2	CD127	CD45	CD25	CD4
3	CD3	CD45	CD25	CD8
4	CD16		CD56	CD3
5	CCR7	CD3	CD45RA	CD4
6	CCR7	CD3	CD45RA	CD8
7	CD8	CD3	CD45RO	CD4
	PE	ECD	APC	PC7
	PE	ECD	APC	PC7
1	CD25	CD3	Foxp3	CD4
1ізо	CD25	CD3	щурячий IgG2a	CD4
2	CD8	CD3	CD25	CD4
3	CCR7	CD3	CD45RA	CD4
4	CD8	CD3	CD45RO	CD4

- 10 CD25-PE, Foxp3-APC і щурячий IgG2a-APC одержують від фірми eBiosciences; CD25-APC, CD45RA-APC і CD45RO-APC від фірми BD Biosciences. Всі інші антитіла одержують від фірми Beckman-Coulter, Франція.

1.5 Мишача модель діабету типу I

- 15 12-тижневих мишей лінії NOD («діабет, що не супроводжується ожирінням») обробляють щодня мутеїном hIL-2 або hIL-2 дикого типу. Застосовуваних як негативний контроль тварин обробляють аналогічним чином фізіологічним соляним розчином (соляний розчин). Оброблювані групи складаються з 3-5 тварин. Мишам вводять у дні 0-15 мутеїн hIL-2 або hIL-2 дикого типу у дозі, що становить 5К- або 25К-одиниць. Починаючи від дня 17, кількість інтерлейкіну у групах, оброблених дозою, що становить 5К-одиниць, підвищують до 100К-одиниць (6,112 мкг). Обробку тварин дозою, що становить 25К-одиниць, залишають без змін.
- 20 Введення останньої дози здійснюють у день 31. У паралельному експерименті від дня 0 по день 31 здійснюють обробку фіксованою дозою, що становить 25К-одиниць. Для виявлення діабету здійснюють моніторинг рівнів глюкози у сечі. Збір зразків крові мишей здійснюють у день 17 і день 30. Зразки аналізують за допомогою FACS, використовуючи фарбування антитілами до CD4, до CD25 і до FoxP3, і визначають процентний вміст FoxP3⁺-клітин серед CD4⁺-Т-клітин і середню інтенсивність флуоресценції (MFI), що характеризує експресію CD25 на CD4⁺FoxP3⁺-клітинах.

2. Результати

2.1 Індукція регуляторних Т-клітин за допомогою hIL-2-N88R

- 30 Як прийнятна система in vitro для оцінки впливу мутеїнів, запропонованих у винаході, застосовували мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC). PBMC складаються з Т-клітин (~ 75% CD4⁺- і CD8⁺-позитивних клітин) і В- і NK-клітин (~ 25% позитивних клітин) і тому вони являють собою клітинну популяцію, у достатньому ступені відповідає імунній системі.

- 35 PBMC, отримані з організму 6 здорових індивідумів (10 клітин/мл) стимулювали IL-2 дикого типу (пролейкін) або IL-2-N88R [BAY 50-4798, лот № PR312C008 («BAY №C008»)] у концентраціях від 10⁻¹¹ до 10⁻⁶ М або як позитивний контроль неспецифічним мітогеном фітогемагглютиніном («ФГА») у концентрації 5 мкг/мл або тільки культуральним середовищем («Med»). У день 0 і на шостий день після стимуляції визначали вміст регуляторних

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин у популяції CD3⁺-лімфоцитів. Результати представлені на фіг. 1 і нижче у таблиці 3.

Таблиця 3

Процентний вміст CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин після стимуляції; середні значення, отримані для 6 здорових індивідуумів; С.К.В. - середньоквадратичне відхилення

Варіанти			Середнє значення	С.К.В.
день 0		день 0	1,367	2,060
день 6	hIL-2-N88R (BAY#C008)##1C008)	Med	0,683	0,741
		10 ⁻¹¹ М	1,483	1,017
		10 ⁻⁹ М	1,783	1,153
		10 ⁻⁸ М	3,267	1,596
		10 ⁻⁷ М	6,483	2,642
		10 ⁻⁶ М	5,200	2,375
	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10 ⁻¹¹ М	2,183	1,030
		10 ⁻⁹ М	3,067	1,255
		10 ⁻⁸ М	3,600	1,330
		10 ⁻⁷ М	4,600	1,992
		10 ⁻⁶ М	4,967	2,199
	ФГА	5 мкг/мл	1,400	1,081
	тільки пептиди		1,340	0,680

5 Із цього експерименту випливає, що hIL-2-N88R у концентраціях 10⁻⁷ М і 10⁻⁶ М приводив до значної індукції субпопуляції регуляторних CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин. При цьому індукція виявилася істотно вищою, ніж при стимуляції PBMC за допомогою hIL-2 дикого типу.

З використанням другого препарату досліджували збільшення субпопуляції регуляторних CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин після стимуляції hIL-2-N88R у порівнянні з hIL-2 дикого типу.

10 Результати представлені на фіг. 2 і нижче у таблиці 4.

Таблиця 4

Процентний вміст CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин після стимуляції; середні значення, отримані для 6 здорових індивідуумів

Варіанти			Середнє значення	С.К.В.
день 0		день 0	0,317	0,402
день 6	hIL-2-N88R (BAY#C008)##1C008)	Med	0,133	0,151
		10 ⁻¹¹ М	0,200	0,141
		10 ⁻⁹ М	0,320	0,179
		10 ⁻⁸ М	0,517	0,354
		10 ⁻⁷ М	0,917	0,601
		10 ⁻⁶ М	5,250	3,141
	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10 ⁻¹¹ М	1,000	1,864
		10 ⁻⁹ М	0,717	0,293
		10 ⁻⁸ М	1,000	0,429
		10 ⁻⁷ М	1,433	0,403
		10 ⁻⁶ М	2,533	0,903
	ФГА	5 мкг/мл	0,700	1,715
	тільки пептиди		0,160	0,089

15 І у цьому випадку встановлено також, що стимуляція hIL-2-N88R приводила до значного збільшення субпопуляції регуляторних CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин, при цьому при використанні мутеїну у концентрації 10⁻⁶ М виявлена істотно більше висока стимуляція у порівнянні зі стимуляцією за допомогою hIL-2 дикого типу.

2.2 hIL-2-N88R індукує регуляторні Т-клітини в організмі страждаючих меланомою пацієнтів

- Далі досліджували, чи може мутеїн hIL-2 N88R, запропонований у винаході, стимулювати також антигенспецифічну активність імунних клітин. Для цієї мети PBMC (10 клітин/мл), отримані з організму трьох страждаючих меланою пацієнтів, стимулювали hIL-2-N88R (BAY 50-4798, лот №PR312C008) або hIL-2 дикого типу (пролейкін) у концентраціях від 10^{-11} до 10^{-6} М у присутності асоційованого з меланою пулу пептидів (Pept) або без них з використанням 5 мкг/мл ФГА або тільки культурального середовища. Потім оцінювали субпопуляції регуляторних CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин і CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ - Т-клітин відповідно. Результати представлені на фіг. 3 і у таблиці 5 і на фіг. 4 і у таблиці 6 відповідно.

Таблиця 5

Процентний вміст CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин після стимуляції; середні значення, отримані для трьох страждаючих меланою пацієнтів

Варіанти			Середнє значення	С.К.В.
день 0		день 0	2,800	2,052
день 6	hIL-2-N88R (BAY #C008)	Med	1,133	0,839
		10^{-11} М	1,833	1,185
		10^{-11} М+Pept	2,467	0,666
		10^{-9} М	3,000	1,015
		10^{-9} М+Pept	3,033	0,379
		10^{-8} М	3,600	0,819
		10^{-8} М+Pept	5,567	2,499
		10^{-7} М	6,100	0,458
		10^{-7} М+Pept	6,233	0,058
		10^{-6} М	7,533	2,413
		10^{-6} М+Pept	8,533	3,225
	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10^{-11} М	2,767	0,751
		10^{-11} М+Pept	2,500	0,985
		10^{-9} М	3,333	0,802
		10^{-9} М+Pept	3,433	1,102
		10^{-8} М	4,133	0,862
		10^{-8} М+Pept	3,633	1,002
		10^{-7} М	4,367	1,201
		10^{-7} М+Pept	4,300	0,755
		10^{-6} М	6,667	1,405
		10^{-6} М+Pept	5,600	1,323
	ФГА	5 мкг/мл	1,400	0,346
	тільки пептиди		1,667	1,060

10

Таблиця 6

Процентний вміст CD3⁺CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ - Т-клітин після стимуляції; середні значення, отримані для трьох страждаючих меланою пацієнтів

Варіанти			Середнє значення	С.К.В.
день 0		день 0	0,567	0,643
день 6	hIL-2-N88R (BAY #C008)	Med	0,133	0,231
		10^{-11} М	0,267	0,462
		10^{-11} М+Pept	0,333	0,252
		10^{-9} М	0,300	0,265
		10^{-9} М+Pept	0,500	0,300
		10^{-8} М	0,500	0,265
		10^{-8} М+Pept	0,800	0,700
		10^{-7} М	0,900	0,436
		10^{-7} М+Pept	0,677	0,306
		10^{-6} М	4,100	1,682
		10^{-6} М+Pept	3,200	1,646

Таблиця 6

Процентний вміст CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин після стимуляції; середні значення, отримані для трьох страждаючих меланою пацієнтів

Варіанти		Середнє значення		С.К.В.
hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10 ⁻¹¹ М	0,267	0,208	
	10 ⁻¹¹ М+Pept	0,200	0,100	
	10 ⁻⁹ М	0,967	0,603	
	10 ⁻⁹ М+Pept	0,967	0,451	
	10 ⁻⁸ М	1,633	1,002	
	10 ⁻⁸ М+Pept	1,400	0,624	
	10 ⁻⁷ М	1,400	0,656	
	10 ⁻⁷ М+Pept	1,533	0,702	
	10 ⁻⁶ М	2,733	1,861	
	10 ⁻⁶ М+Pept	2,600	1,473	
	ФГА	5 мкг/мл	0,000	0,000
тільки пептиди			0,200	0,100

У цьому експерименті встановлено, що введення hIL-2-88R приводить також до значного збільшення регуляторних Т-клітин у страждаючих меланою пацієнтів. У цьому випадку встановлено, що при використанні мутеїну у концентраціях 10⁻⁷ М і 10⁻⁶ М субпопуляція CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин і при використанні мутеїну у концентрації 10⁻⁶ М субпопуляція CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин виявилися істотно більшими, ніж при стимуляції відповідними концентраціями IL-2 дикого типу (пролейкін).

2.3 hIL-2-N88R індукує регуляторні Т-клітини в організмі страждаючих розсіяним склерозом пацієнтів

Далі досліджували, чи може мутеїн hIL-2 N88R, запропонований у винаході, стимулювати також антигенспецифічну активність імунних клітин. Для цієї мети РВМС (10 клітин/мл), отримані з організму двох страждаючих розсіяним склерозом пацієнтів, стимулювали hIL-2-N88R (BAY 50-4798, лот №PR312C008) або hIL-2 дикого типу (пролейкін) у концентраціях від 10⁻¹¹ до 10⁻⁶ М у присутності асоційованого з розсіяним склерозом пулу пептидів або без них з використанням 5 мкг/мл ФГА або тільки культурального середовища. Потім оцінювали субпопуляції регуляторних CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин і CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин відповідно. Результати представлені на фіг. 5 і у таблиці 7 і на фіг. 6 і у таблиці 8 відповідно.

Таблиця 7

Процентний вміст CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин після стимуляції; середні значення, отримані для двох страждаючих розсіяним склерозом пацієнтів

Варіанти		Середнє значення		С.К.В.
день 0		день 0	0,95	0,21
день 6	hIL-2-N88R (BAY #C008)	Med	3,55	1,91
		10 ⁻¹¹ М	3,8	0,99
		10 ⁻¹¹ М+Pept	4,2	2,40
		10 ⁻⁹ М	6,1	2,40
		10 ⁻⁹ М+Pept	9,05	5,02
		10 ⁻⁸ М	9,75	2,19
		10 ⁻⁸ М+Pept	11,15	3,32
		10 ⁻⁷ М	11,95	5,30
		10 ⁻⁷ М+Pept	9,9	1,70
		10 ⁻⁶ М	7,9	1,41
		10 ⁻⁶ М+Pept	9,3	1,41
	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10 ⁻¹¹ М	6,3	2,55
		10 ⁻¹¹ М+Pept	8,8	4,10
		10 ⁻⁹ М	8,25	0,49
		10 ⁻⁹ М+Pept	8,45	1,20

Таблиця 7

Процентний вміст CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин після стимуляції; середні значення, отримані для двох страждаючих розсіяним склерозом пацієнтів

Варіанти		Середнє значення		С.К.В.
		10 ⁻⁸ М	8,15	2,47
		10 ⁻⁸ М+Pept	9,55	3,04
		10 ⁻⁷ М	8,8	3,39
		10 ⁻⁷ М+Pept	8,8	3,25
		10 ⁻⁶ М	9,45	0,78
		10 ⁻⁶ М+Pept	7,6	1,84
	ФГА	5 мкг/мл	5,5	3,68
	тільки пептиди		3,95	2,19

Таблиця 8

Процентний вміст CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин після стимуляції; середні значення, отримані для двох страждаючих розсіяним склерозом пацієнтів

Варіанти		Середнє значення		С.К.В.
день 0		день 0	0,35	0,35
день 6	hIL-2-N88R (BAY #C008)	Med	0,14	0,14
		10 ⁻¹¹ М	0,28	0,28
		10 ⁻¹¹ М+Pept	0,14	0,14
		10 ⁻⁹ М	0,07	0,07
		10 ⁻⁹ М+Pept	0,07	0,07
		10 ⁻⁸ М	0,28	0,28
		10 ⁻⁸ М+Pept	0,00	0,00
		10 ⁻⁷ М	0,14	0,14
		10 ⁻⁷ М+Pept	0,14	0,14
		10 ⁻⁶ М	4,10	4,10
		10 ⁻⁶ М+Pept	2,90	2,90
	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10 ⁻¹¹ М	0,00	0,00
		10 ⁻¹¹ М+Pept	0,07	0,07
		10 ⁻⁹ М	0,07	0,07
		10 ⁻⁹ М+Pept	0,00	0,00
		10 ⁻⁸ М	0,14	0,14
		10 ⁻⁸ М+Pept	0,14	0,14
		10 ⁻⁷ М	0,28	0,28
		10 ⁻⁷ М+Pept	0,21	0,21
		10 ⁻⁶ М	0,07	0,07
		10 ⁻⁶ М+Pept	0,85	0,85
	ФГА	5 мкг/мл	0,07	0,07
	тільки пептиди		0,07	0,07

У цьому експерименті встановлено, що введення hIL-2-88R приводить також до значного збільшення регуляторних Т-клітин у страждаючих розсіяним склерозом пацієнтів. У цьому випадку встановлено, що при використанні мутеїну у концентраціях 10⁻⁸ М і 10⁻⁷ М субпопуляція CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин і при використанні мутеїну у концентрації 10⁻⁶ М субпопуляція CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ - Т-клітин виявилися істотно більшими, ніж при стимуляції відповідними концентраціями IL-2 дикого типу (пролейкін).

2.4 hIL-2-N88R індукує лише мінімальну проліферацію цитотоксичних CD8⁺ - Т-клітин у пацієнтів, що страждають розсіяним склерозом, і у здорових індивідуумів

Вивчали також стимуляцію цитотоксичних центральних CD8⁺ - Т-клітин пам'яті. Для цієї мети PBMC, отримані з організму здорових індивідуумів або страждаючих розсіяним склерозом пацієнтів, обробляли відповідно до методу, описаному у розділі 2.3. Визначали процентний

вміст CFSElow/CD3⁺CD8⁺CD45RO - Т-клітин. Результати представлені на фіг. 7 і у таблиці 9 і на фіг. 8 і у таблиці 10.

Таблиця 9

Процентний вміст CFSElow/CD3⁺CD8⁺CD45RO - Т-клітин після стимуляції; середні значення, отримані для двох страждаючих розсіяним склерозом пацієнтів

Варіанти		Середнє значення		С.К.В.
день 0		день 0	2,45	1,06
день 6	hIL-2-N88R (BAY #C008)	Med	0,95	0,21
		10 ⁻¹¹ M	1,3	0,57
		10 ⁻¹¹ M+Pept	1,2	1,13
		10 ⁻⁹ M	3,55	2,47
		10 ⁻⁹ M+Pept	0,5	0,14
		10 ⁻⁸ M	3,3	1,41
		10 ⁻⁸ M+Pept	1,2	0,71
		10 ⁻⁷ M	10,5	7,50
		10 ⁻⁷ M+Pept	9,1	0,71
		10 ⁻⁶ M	22,9	9,76
		10 ⁻⁶ M+Pept	1	0,28
	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10 ⁻¹¹ M	5,2	7,35
		10 ⁻¹¹ M+Pept	3,1	0,28
		10 ⁻⁹ M	14,3	15,56
		10 ⁻⁹ M+Pept	19,45	2,90
		10 ⁻⁸ M	36,5	1,98
		10 ⁻⁸ M+Pept	41,85	2,47
		10 ⁻⁷ M	54,8	8,49
		10 ⁻⁷ M+Pept	54,85	12,94
		10 ⁻⁶ M	58,05	1,06
		10 ⁻⁶ M+Pept	98,2	0,85
	ФГА	5 мкг/мл	0,55	0,07
	тільки пептиди		2,45	1,06

Таблиця 10

Відсоток CFSElow/CD3⁺CD8⁺CD45RO - Т-клітин після стимуляції; середні значення, отримані для трьох здорових індивідуумів

Варіанти		Середнє значення		С.К.В.
день 6	hIL-2-N88R (BAY #C008)	Med	0,23	0,23
		10 ⁻¹¹ M	0,27	0,06
		10 ⁻¹¹ M+Pept	1,73	2,23
		10 ⁻⁹ M	0,43	0,23
		10 ⁻⁹ M+Pept	0,80	0,72
		10 ⁻⁸ M	2,13	1,86
		10 ⁻⁸ M+Pept	2,07	1,17
		10 ⁻⁷ M	3,83	4,02
		10 ⁻⁷ M+Pept	5,77	6,30
		10 ⁻⁶ M	17,43	17,31
		10 ⁻⁶ M+Pept	17,87	12,97
	hIL-2 дикого типу (пролейкін)	10 ⁻¹¹ M	1,53	1,23
		10 ⁻¹¹ M+Pept	2,37	2,57
		10 ⁻⁹ M	18,20	23,35
		10 ⁻⁹ M+Pept	16,93	10,96
		10 ⁻⁸ M	43,30	36,72
		10 ⁻⁸ M+Pept	37,80	20,80

Таблиця 10

Відсоток CFSElow/CD3⁺CD8⁺CD45RO - Т-клітин після стимуляції; середні значення, отримані для трьох здорових індивідуумів

Варіанти		Середнє значення	С.К.В.
	10 ⁻⁷ М	38,53	25,53
	10 ⁻⁷ М+Pept	32,37	20,90
	10 ⁻⁶ М	37,93	27,66
	10 ⁻⁶ М+Pept	30,83	21,51
	ФГА	96,07	1,79
	тільки пептиди	1,83	1,59

При дослідженні з використанням крові страждаючих розсіяним склерозом, а також здорових індивідуумів, встановлено, що відмінність від hIL-2 дикого типу обробка за допомогою hIL-2-N88R приводила лише до невеликої проліферації центральних CD8⁺ - Т-клітин пам'яті при всіх вивчених концентраціях.

2.5 Обробка мутеїном hIL-2 перешкоджає розвитку діабету типу I при вивченні на тваринній моделі

У порівнянні з обробкою hIL-2 дикого типу обробка NOD-мишей за допомогою hIL-2-N88R приводила до більше значного підвищення процентного вмісту FoxP3⁺-клітин у популяції CD4⁺-клітин (фіг. 9 (А)). Крім того, для цих CD4⁺FoxP3⁺-позитивних клітин характерний більше високий рівень експресії CD25 (фіг. 9 (Б)). На фіг. 10 продемонстровано, що на відміну від обробки за допомогою hIL-2 дикого типу обробка за допомогою hIL-2-N88R мишей, яких застосовують як модель діабету типу I, перешкоджала розвитку діабету у всіх мишей у групі тварин, яких обробляли мутеїном.

3. Висновок

Експерименти, проведені при створенні винаходу, чітко продемонстрували, що з урахуванням їх здатності здійснювати індукцію регуляторних Т-клітин (T_{Reg}) мутеїни hIL-2, запропоновані у винаході, та їхні ділянки являють собою субстанції, які можна застосовувати для лікування й/або профілактики аутоімунного захворювання або для індукції T_{Reg} в організмі й для утворення T_{Reg} in vitro. При створенні винаходу це продемонстровано не тільки in vitro, але також і in vivo.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> АЙКУРІС ГМБХ & КО. КГ

<120> Засіб, призначений для лікування й/або профілактики аутоімунного захворювання й для утворення регуляторних Т-клітин

<130> 1043P108

<160> 3

<170> PatentIn версія. 2.0

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 2

<211> 465

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatc gcactaagtc ttgcacttgt cacaacacagt	60
gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat	120
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc	180
acattttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa	240
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttactta	300
agaccacagg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa	360
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga	420
tggattacct ttgtcaaag catcatctca aactgactt gataa	465

<210> 3

<211> 133

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220> Мутаген

<223> hIL-2-N88R

<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 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 Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

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

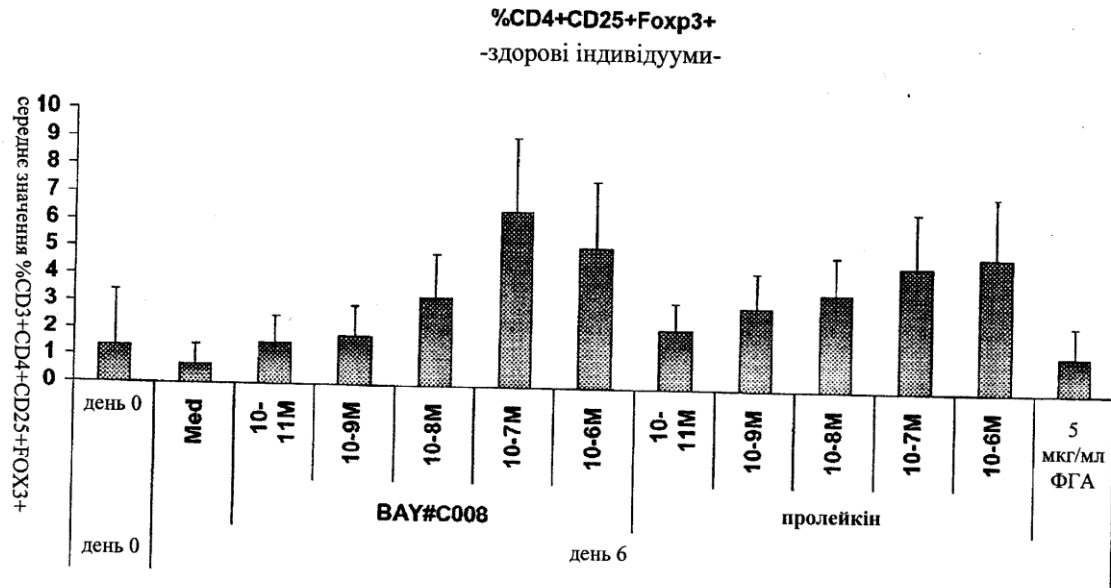
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

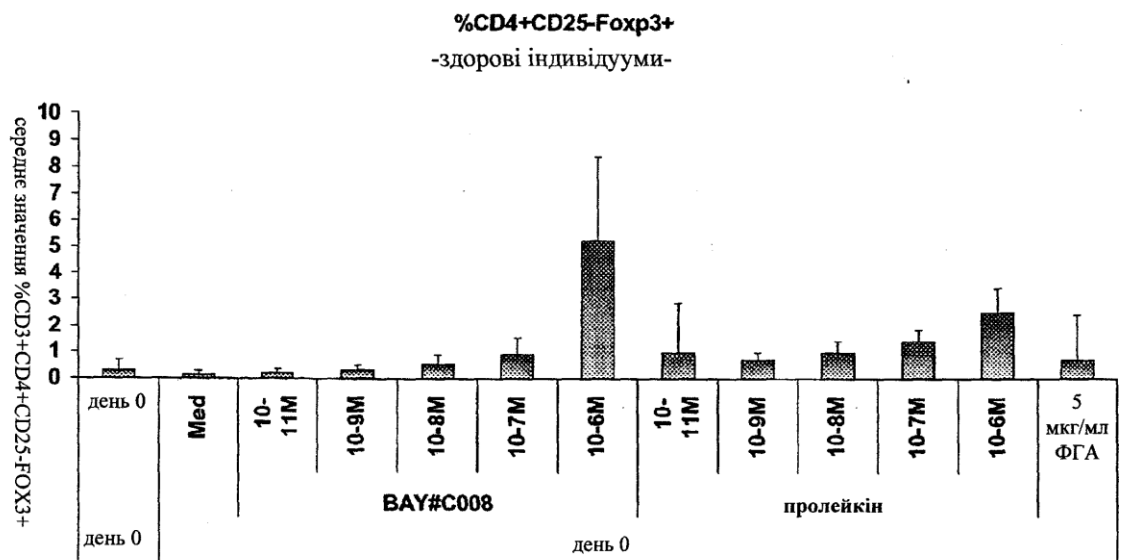
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Застосування мутеїну людського інтерлейкіну-2 (мутеїн hIL-2), який пронумерований відповідно до hIL-2 дикого типу й має амінокислотну заміну щонайменше в одному з положень 20, 88 або 126, для готування лікарського засобу, що призначений для лікування й/або профілактики аутоімунного захворювання, яке **відрізняється** тим, що здійснюють заміну аспарагіну у положенні 88 на аргінін (hIL-2-N88R) або на гліцин (hIL-2-N88G), або на ізолейцин (hIL-2-N88I), що здійснюють заміну аспарагінової кислоти у положенні 20 на гістидин (hIL-2-D20H) або на ізолейцин (hIL-2-D20H), або на тирозин (hIL-2-D20Y), і що здійснюють заміну глутаміну у положенні 126 на лейцин (hIL-2-Q126L).
- 10 2. Застосування за одним із попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб додатково містить імунодепресант.
- 15 3. Застосування за п. 2, яке **відрізняється** тим, що імунодепресант вибраний з групи, що включає: глюкокортикоїд, у тому числі декортин, преднізол; азатіоприн; циклоспорин А; мікофеноляту мофетил; такролімус; глобулін до Т-лімфоцитів, антитіла до CD3, включаючи муромонаб; антитіла до CD25, включаючи базиліксимаб і даклізумаб; антитіла до TNF-α, включаючи інфліксимаб і адаліумаб; азатіоприн; метотрексат; циклоспорин; сиролімус; еверолімус; фінголімод; селлцепт (CellCept); міфортин і циклофосфамід.
- 20 4. Застосування за одним із попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що аутоімунне захворювання вибране з групи, що включає: цукровий діабет типу I, ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, хронічний гастрит, хворобу Крона, базедову хворобу, хворобу Бехтерева,

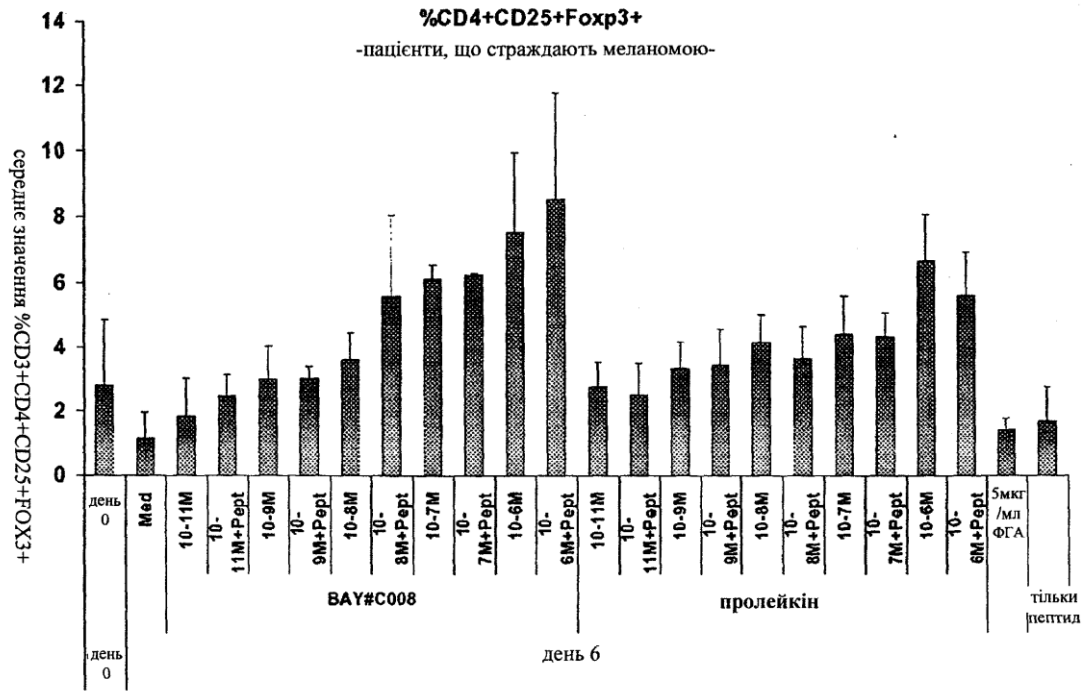
- псоріаз, важку псевдопаралітичну міастенію, аутоімунний гепатит, APECED, синдром Черджа-Стросс, неспецифічний виразковий коліт, гломерулонефрит, синдром Гійєна-Барре, тироїдит Хашімото, ліхен-склероз, системний червоний вовчак, PANDAS, ревматичну лихоманку, саркоїдоз, синдром Шегрена, синдром "негнучкої людини", склеродерму, грануломатоз
- 5 Вегенера, вітіліго, аутоімунну ентеропатію, синдром Гудпасчера, дерматоміозит, поліміозит, аутоімунну алергію, астму й аутоімунну реакцію після трансплантацій органів.
5. Застосування за одним із попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб містить фармацевтично прийнятний носій.
- 10 6. Лікарський засіб, призначений для лікування й/або профілактики аутоімунного захворювання, який **відрізняється** тим, що містить мутеїн hIL-2, призначений для застосування за будь-яким із пп. 1-5.
- 15 7. Застосування мутеїну людського інтерлейкіну-2 (мутеїн hIL-2), який пронумерований відповідно до hIL-2 дикого типу й має амінокислотну заміну щонайменше в одному з положень 20, 88 або 126, для одержання засобу, призначеного для утворення регуляторних Т-клітин (T_{Reg}) у живому організмі, яке **відрізняється** тим, що здійснюють заміну аспарагіну у положенні 88 на аргінін (hIL-2-N88R) або на гліцин (hIL-2-N88G), або на ізолейцин (hIL-2-N88I), що здійснюють заміну аспарагінової кислоти у положенні 20 на гістидин (hIL-2-D20H) або на ізолейцин (hIL-2-D20H), або на тирозин (hIL-2-D20Y), і що здійснюють заміну глутаміну у положенні 126 на лейцин (hIL-2-Q126L).
- 20 8. Застосування за п. 7, яке **відрізняється** тим, що засіб являє собою лікарський засіб і містить фармацевтично прийнятний носій.
9. Застосування за п. 8, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб додатково містить імунодепресант.
- 25 10. Застосування за п. 9, яке **відрізняється** тим, що імунодепресант вибраний з групи, що включає: глюкокортикоїд, у тому числі декортин, преднізол; азатіоприн; циклоспорин А; мікофеноляту мофетил; такролімус; глобулін до Т-лімфоцитів, антитіла до CD3, включаючи муромонаб; антитіла до CD25, включаючи базиліксимаб і даклізумаб; антитіла до TNF- α , включаючи інфліксимаб і адаліумаб; азатіоприн; метотрексат; циклоспорин; сиролімус; еверолімус; фінголімод; селлцепт; міфортин і циклофосфамід.
- 30 11. Засіб, призначений для утворення регуляторних Т-клітин (T_{Reg}) у живому організмі, який **відрізняється** тим, що містить мутеїн hIL-2, призначений для застосування за будь-яким із пп. 7-10.
12. Спосіб утворення регуляторних Т-клітин (T_{Reg}) in vitro, який полягає у тому, що здійснюють наступні стадії, на яких:
- 35 (а) створюють мутеїн людського інтерлейкіну 2 (мутеїн hIL-2),
 (б) приводять у контакт мутеїн hIL-2 із моноклеарними клітинами периферичної крові (PBMC) і
 (в) при необхідності повторюють стадії (а) і (б), який **відрізняється** тим, що мутеїн hIL-2 являє собою мутеїн hIL-2, призначений для застосування за будь-яким із пп. 7-10.



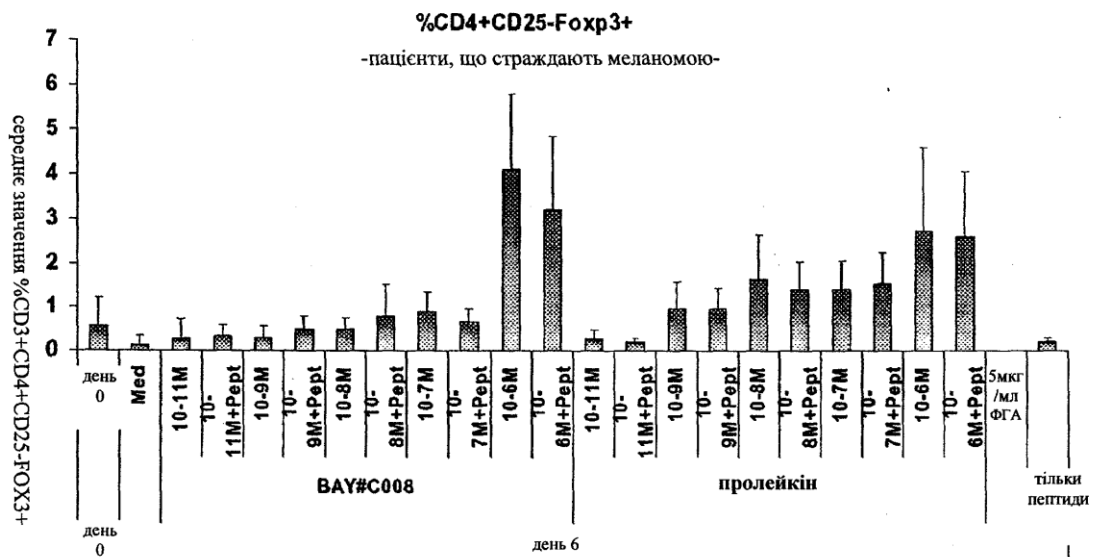
Фіг. 1



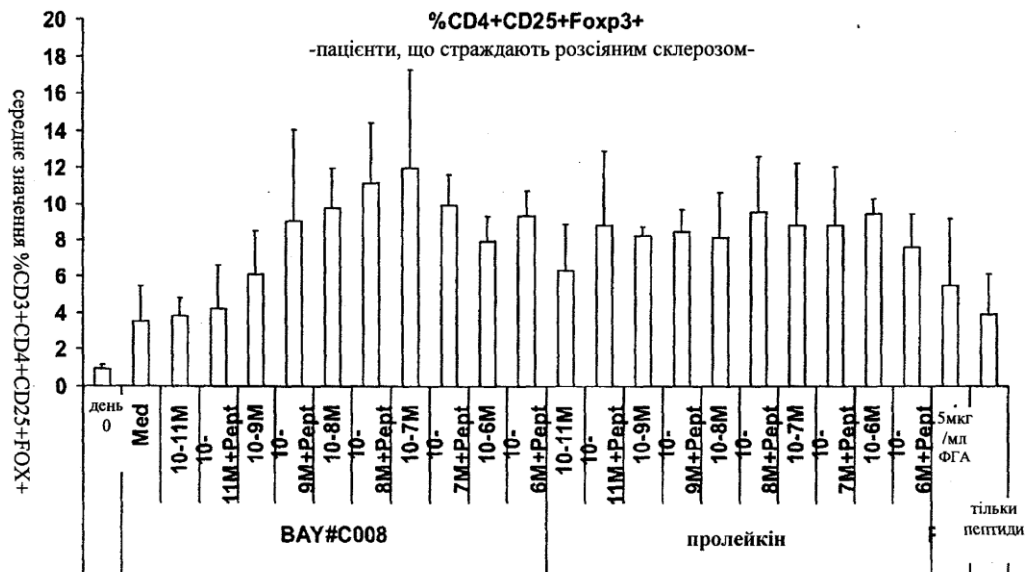
Фіг. 2



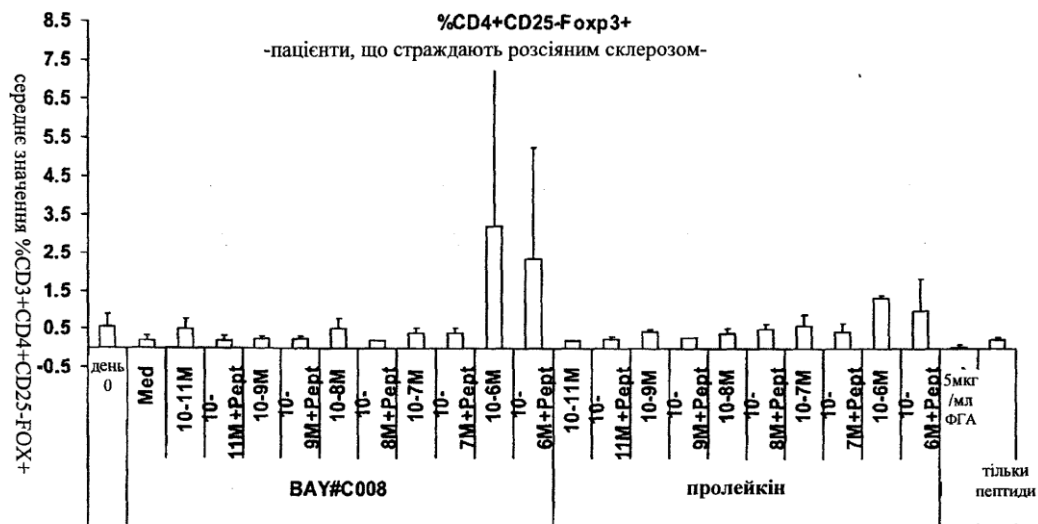
Фіг. 3



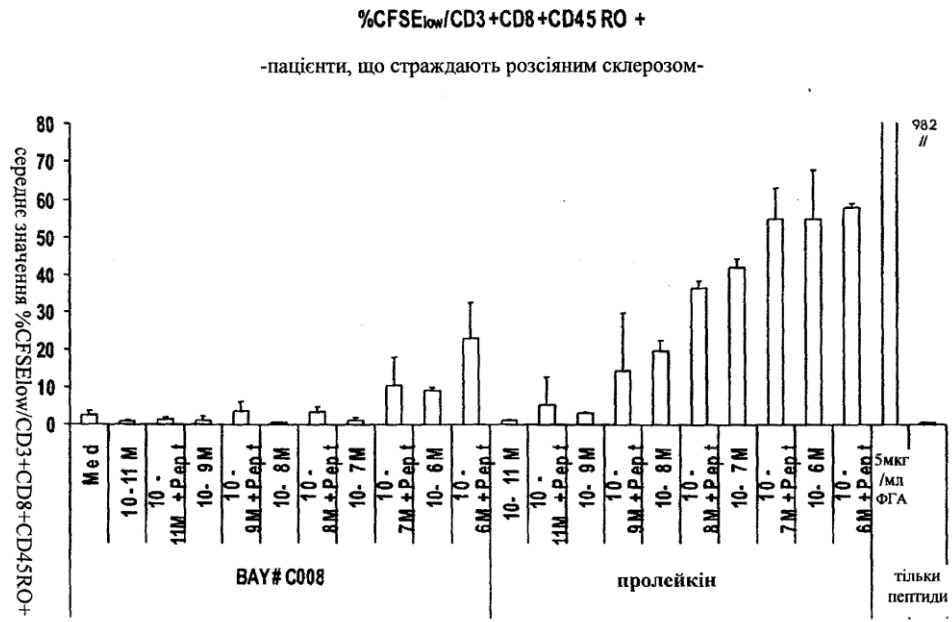
Фіг. 4



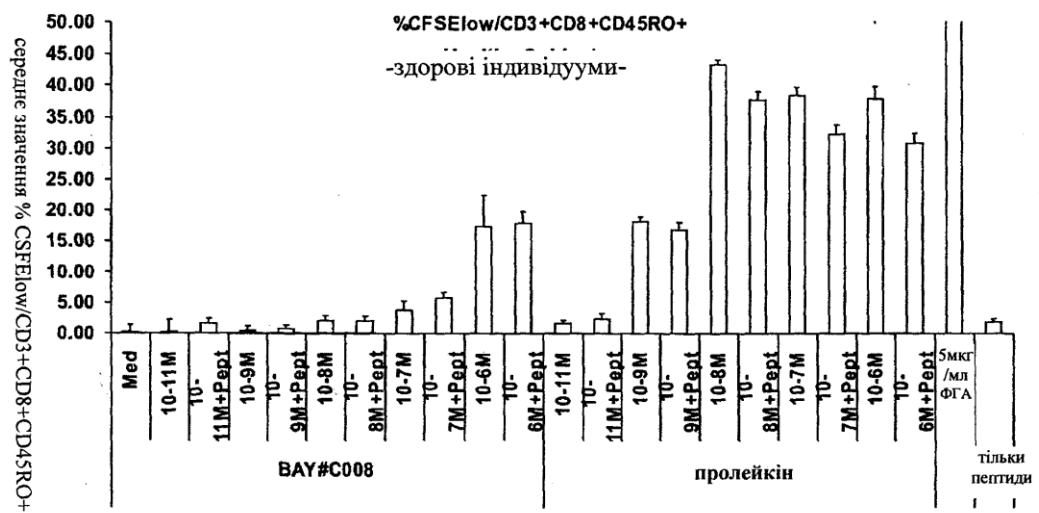
Фіг. 5



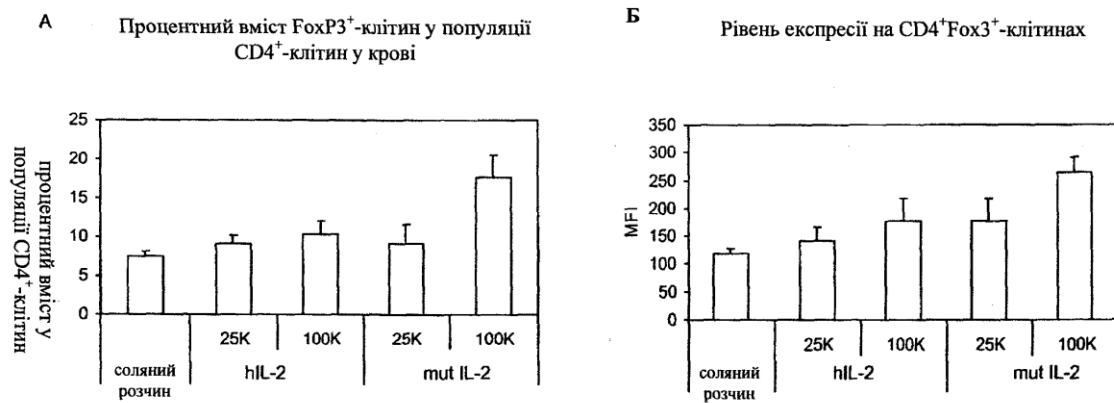
Фіг. 6



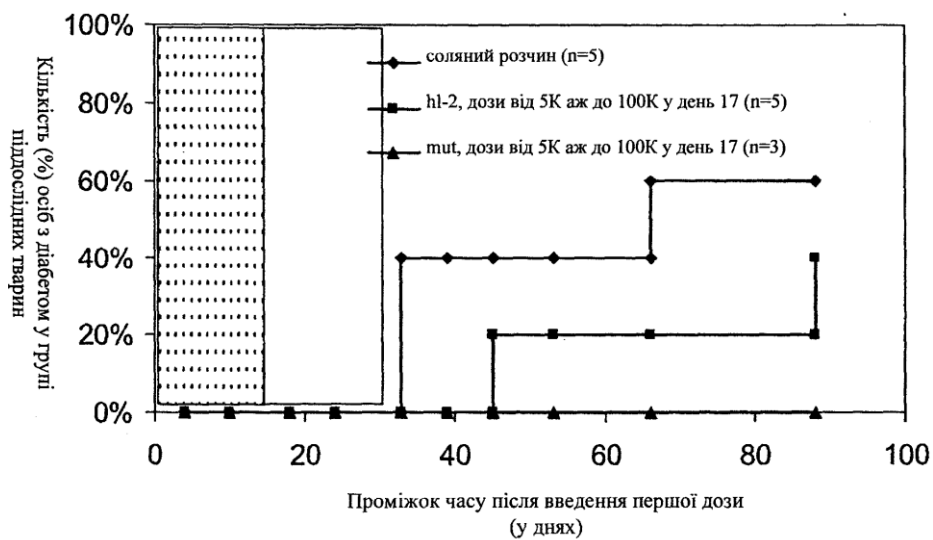
Фіг. 7



Фіг. 8



Фіг. 9



Фіг. 10

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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