

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992765 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.25(22) Дата подачи заявки
2018.05.22(51) Int. Cl. C07K 16/10 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) БЕЛКИ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ С ПРИВИТЫМ ЦИТОКИНОМ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ РАКА

(31) 62/510,533

(32) 2017.05.24

(33) US

(86) PCT/IB2018/053623

(87) WO 2018/215936 2018.11.29

(71) Заявитель:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:

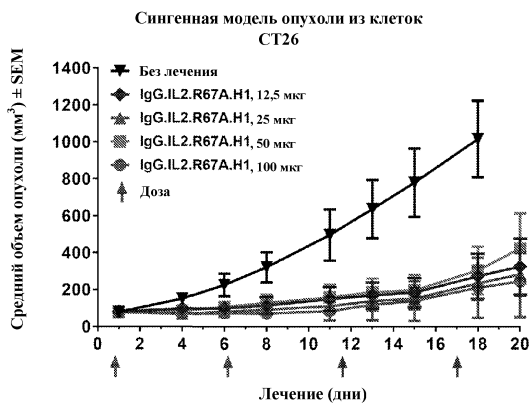
Дин Джонатан, Диаз-Де-Дурана Яйза,
Дидonato Майкл, Филиппи Кристоф,
Спрэггон Глен (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предусмотрен IL2, привитый на последовательности CDR антитела, обладающего предпочтительными терапевтическими профилями по сравнению с молекулами, известными и применяемыми в клинической практике. В частности, предусмотренные композиции белков на основе антител с привитым цитокином обеспечивают увеличение или поддержание уровня CD8+ эффекторных Т-клеток со снижением при этом активности Трег-клеток. Кроме того, в предусмотренных композициях представлены улучшенные период полувыведения, стабильность и возможность производства по сравнению с составами на основе рекомбинантного человеческого IL2, такими как Proleukin®.

IgG.IL2R67A.H1 демонстрирует эффективность в модели из клеток CT26



201992765 A1

201992765

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-560105EA/011

БЕЛКИ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ С ПРИВИТЫМ ЦИТОКИНОМ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ РАКА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] Настоящая заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке на патент США № 62/510533, поданной 24 мая 2017 г., содержание которой тем самым включено посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[002] Настоящее изобретение относится к белкам на основе антител с привитым цитокином, которые связывают низкоаффинный рецептор интерлейкина 2 (IL2), и способам лечения рака.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[003] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и тем самым включен посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 5 апреля 2018 г., имеет название PAT057462-WO-PCТ_SL.txt и имеет размер 69489 байтов.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[004] IL2 впервые был клонирован в 1983 г. (Taniguchi et al., Nature 1983, 302:305-310, Devos et al., Nucleic Acid Res. 1983, 11(13):4307-4323, Maeda et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 1983, 115:1040-1047). Белок IL2 имеет длину 153 аминокислоты с сигнальным пептидом из аминокислот 1-20 и сворачивается в структуру из 4 антипараллельных амфипатических альфа-спиралей (Smith K.A., Science 1988, 240:1169-1176).

[005] IL2 опосредует свой биологический эффект в результате передачи сигнала через высокоаффинный или низкоаффинный рецептор (Kreig et al., PNAS 2010, 107(26):11906-11911). Высокоаффинный рецептор является тримерным, состоящим из IL2-R α (CD25), IL2-R β (CD122) и IL2-R γ (CD132). Низкоаффинный рецептор является димерным, состоящим только из цепей IL2-R β (CD122) и IL2-R γ (CD132). Низкоаффинный рецептор связывает IL2, но с аффинностью, в 10-100 раз меньшей, чем у тримерного высокоаффинного рецептора, что указывает на то, что IL2-R α (CD25) является важным для увеличения аффинности, однако не является компонентом, участвующим в передаче сигнала (Kreig et al., выше). Экспрессия рецепторов IL2 также отличается. Высокоаффинный рецептор IL2 экспрессируется на активированных Т-клетках и CD4⁺/Foxp3⁺ регуляторных Т-клетках (Treg). В отличие от этого, низкоаффинный рецептор IL2 встречается на CD8⁺ эффекторных Т-клетках и естественных клетках-киллерах (NK).

[006] Рекомбинантный IL2 (rhIL2) был изначально одобрен для клинического применения в 1992 г. (Coventry et al., Cancer Mgt Res. 2012 4:215-221). Proleukin® (альдеслейкин) представляет собой модифицированный IL2, который является агликозилированным, не имеет N-концевого аланина и имеет цистеин, замещенный

серином, в положении аминокислоты 125. Proleukin® изначально был показан в качестве терапевтического препарата, применяемого при злокачественной меланоме и почечноклеточной карциноме, однако применялся при других типах рака, таких как колоректальный рак, рак молочной железы, рак легкого и мезотелиома (Coventry, выше). В исследовании, охватывающем 259 пациентов с почечноклеточной карциномой, проведенном с 1986 по 2006 гг., было обнаружено, что у 23 пациентов наблюдался полный ответ, и у 30 наблюдался частичный ответ (Klapper et al., Cancer 2008 113(2):293-301). В целом это составляло суммарную частоту объективного ответа 20%, при этом полная регрессия опухоли наблюдалась у 7% пациентов с почечноклеточным раком (Klapper et al., выше).

[007] Тем не менее, лечение рака с помощью IL2 не обходилось без побочных эффектов. В исследовании с участием 259 пациентов отмечались капиллярная утечка/транссудация, расширение кровеносных сосудов и олигурия. Также имели место инфекции 3 степени и 4 степени, в обоих случаях вследствие использования катетеров, и общая инфекция, связанная с дисфункцией нейтрофилов (Klapper et al., выше). В литературе о Proleukin® отмечено, что Proleukin® был ассоциирован с обострением аутоиммунных заболеваний и воспалительных нарушений, таких как болезнь Крона, склеродермия, тиреоидит, воспалительный артрит, сахарный диабет, окулобульбарная тяжелая миастения, серповидный IgA-гломерулонефрит, холецистит, церебральный васкулит, синдром Стивенса-Джонсона и буллезный пемфигоид.

[008] Обнаружение того, что Treg-клетки конститутивно экспрессировали высокоаффинный рецептор IL2 и в своем выживании и функционировании зависели от IL2, указывало на причину наблюдения данного побочного эффекта (D'Cruz et al., Nat. Immunol. 2005, 6:1152-1159). Это иллюстрирует потребность в терапевтических препаратах на основе IL2 с улучшенными фармакокинетическими свойствами и с избирательностью активации CD8+ Т-клеток посредством низкоаффинного рецептора без активации Treg-клеток посредством высокоаффинного рецептора, поскольку это позволяет лечить рак без нежелательных побочных эффектов, наблюдаемых в случае с Proleukin®.

ОПИСАНИЕ

[009] В настоящем изобретении предусмотрен IL2, привитый на последовательности CDR антитела, обладающего предпочтительными терапевтическими профилями по сравнению с молекулами, известными и применяемыми в клинической практике. В частности, предусмотренные композиции белков на основе антител с привитым цитокином обеспечивают увеличение или поддержание уровня CD8+ эффекторных Т-клеток со снижением при этом активности Treg-клеток. Кроме того, в предусмотренных композициях представлены улучшенные период полувыведения, стабильность и возможность производства по сравнению с составами на основе рекомбинантного человеческого IL2, такими как Proleukin®. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены белки на основе антител с привитым цитокином, которые связываются с низкоаффинным рецептором IL2 и способствуют предпочтительной

передаче сигнала через него при сниженном связывании с высокоаффинным рецептором IL2. Предусмотрены белки на основе антител с привитым цитокином, содержащие (i) последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую вариабельную область тяжелой цепи (VH), и (ii) последовательность легкой цепи иммуноглобулина, содержащую вариабельную область легкой цепи (VL), где молекула IL2 привита на область, определяющую комплементарность (CDR), VH или VL антитела.

[0010] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены белки на основе антител с привитым цитокином, содержащие:

(a) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области, определяющие комплементарность (CDR), HCDR1, HCDR2, HCDR3; и

(b) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую LCDR1, LCDR2, LCDR3;

и

(c) молекулу интерлейкина 2 (IL2), привитую на CDR VH или VL.

[0011] Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий молекулу IL2, привитую на CDR тяжелой цепи.

[0012] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где молекула IL2 привита на область, выбранную из области 1, определяющей комплементарность (HCDR1), области 2, определяющей комплементарность (HCDR2), или области 3, определяющей комплементарность (HCDR3).

[0013] Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий молекулу IL2, привитую на HCDR1.

[0014] Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий молекулу IL2, привитую на CDR легкой цепи.

[0015] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где молекула IL2 привита на область, выбранную из области 1, определяющей комплементарность (LCDR1), области 2, определяющей комплементарность (LCDR2), или области 3, определяющей комплементарность (LCDR3).

[0016] Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий молекулу IL2, содержащую мутацию, которая обеспечивает снижение аффинности молекулы IL2 в отношении высокоаффинного рецептора IL2.

[0017] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует пролиферацию CD8⁺ эффекторных Т-клеток в большей степени, чем рекомбинантный IL2 или Proleukin®.

[0018] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует пролиферацию Treg-клеток в меньшей степени, чем рекомбинантный IL2 или Proleukin®.

[0019] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует пролиферацию NK-клеток в большей степени, чем рекомбинантный IL2 или Proleukin®.

[0020] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где белок на основе

антитела с привитым цитокином характеризуется более длительным периодом полувыведения, чем рекомбинантный IL2 или Proleukin®.

[0021] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где молекула IL2 состоит из SEQ ID NO:4.

[0022] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где молекула IL2 состоит из SEQ ID NO:6.

[0023] Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий тяжелую цепь антитела класса IgG.

[0024] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где IgG выбран из IgG1, IgG2 и IgG4.

[0025] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где специфичность связывания CDR с мишенью снижена на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, или 100% благодаря привитой молекуле IL2.

[0026] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где специфичность связывания CDR с мишенью сохраняется на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, или 100% в присутствии привитой молекулы IL2.

[0027] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где специфичность связывания CDR отличается от специфичности связывания молекулы IL2.

[0028] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где специфичность связывания CDR направлена на мишень, отличную от человеческой.

[0029] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где антиген, отличный от человеческого, представляет собой вирус.

[0030] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где вирус представляет собой респираторно-синцитиальный вирус (RSV).

[0031] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где RSV выбран из RSV подгруппы A и RSV подгруппы B.

[0032] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где часть белка на основе антитела с привитым цитокином, представляющая собой остов антитела, является гуманизированной или человеческой.

[0033] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены белки на основе антител с привитым цитокином, содержащие: (i) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO: 13, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:14, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:15, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит (d) LCDR1 под SEQ ID NO:29, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:30 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:31; или (ii) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO:45, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:46, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:47; и вариабельную область легкой цепи, которая содержит (d) LCDR1 под SEQ ID NO:61, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:62 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:63.

[0034] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены белки на основе антител с привитым цитокином, содержащие: (i) вариабельную область тяжелой

цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO:19, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 35; или (ii) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 51, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 67.

[0035] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где антитело содержит модифицированную Fc-область, соответствующую сниженной эффекторной функции.

[0036] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где модифицированная Fc-область содержит мутацию, выбранную из одной или нескольких из D265A, P329A, P329G, N297A, L234A и L235A.

[0037] Белок на основе антитела с привитым цитокином, где модифицированная Fc-область содержит комбинацию мутаций, выбранную из одной или нескольких из D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A и P329G/L234A/L235A.

[0038] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены белки на основе антител с привитым цитокином, содержащие HCDR1 под SEQ ID NO: 13, HCDR2 под SEQ ID NO:14, HCDR3 под SEQ ID NO:15, LCDR1 под SEQ ID NO:29, LCDR2 под SEQ ID NO:30, LCDR3 под SEQ ID NO:31, модифицированную Fc-область, содержащую мутацию D265A/P329A, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует активацию Treg-клеток в меньшей степени по сравнению с рекомбинантным IL2 или Proleukin®.

[0039] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены белки на основе антител с привитым цитокином, содержащие HCDR1 под SEQ ID NO: 45, HCDR2 под SEQ ID NO:46, HCDR3 под SEQ ID NO:47, LCDR1 под SEQ ID NO:61, LCDR2 под SEQ ID NO:62, LCDR3 под SEQ ID NO:63, модифицированную Fc-область, содержащую мутацию D265A/P329A, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует активацию Treg-клеток в меньшей степени по сравнению с рекомбинантным IL2 или Proleukin®.

[0040] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий: (i) тяжелую цепь под SEQ ID NO:22 и/или легкую цепь под SEQ ID NO:38 или (ii) тяжелую цепь под SEQ ID NO:54 и/или легкую цепь под SEQ ID NO:70.

[0041] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены рекомбинантные клетки-хозяева, подходящие для продуцирования белка на основе антитела с привитым цитокином, содержащие нуклеиновые кислоты, раскрытые в данном документе, кодирующие полипептидные тяжелые и легкие цепи белка и необязательно сигнал секреции.

[0042] Рекомбинантная клетка-хозяин, которая относится к линии клеток млекопитающего.

[0043] Рекомбинантная клетка-хозяин, где линия клеток млекопитающего представляет собой линию клеток CHO.

[0044] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены

фармацевтические композиции, содержащие белок на основе антитела с привитым цитокином, раскрытый в данном документе, и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

[0045] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены способы лечения рака у индивидуума, нуждающегося в этом, включающие введение индивидууму терапевтически эффективного количества белка на основе антитела с привитым цитокином или фармацевтической композиции, раскрытых в данном документе.

[0046] Способ лечения рака, где рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легкого, колоректального рака, рака предстательной железы, рака молочной железы и лимфомы.

[0047] Способ лечения рака, где белок на основе антитела с привитым цитокином или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с другим терапевтическим средством.

[0048] Способ лечения рака, где терапевтическое средство представляет собой другой белок на основе антитела с привитым цитокином.

[0049] Способ лечения рака, где терапевтическое средство представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа.

[0050] Способ лечения рака, где контрольная точка иммунного ответа выбрана из группы, состоящей из: PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM3, CTLA-4, LAG-3, CEACAM-1, CEACAM-5, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR.

[0051] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены способы обеспечения размножения CD8⁺ эффекторных Т-клеток в организме пациента, нуждающегося в этом, включающие введение пациенту белка на основе антитела с привитым цитокином или фармацевтической композиции, раскрытых в данном документе.

[0052] Способ обеспечения размножения CD8⁺ эффекторных Т-клеток, где CD8⁺ эффекторные Т-клетки размножаются, а Treg-клетки не размножаются.

[0053] Способ обеспечения размножения CD8⁺ эффекторных Т-клеток, где CD8⁺ эффекторные Т-клетки размножаются, а NK-клетки не размножаются.

[0054] Способ обеспечения размножения CD8⁺ эффекторных Т-клеток, дополнительно включающий введение ингибитора контрольной точки иммунного ответа.

[0055] Способ обеспечения размножения CD8⁺ эффекторных Т-клеток, где контрольная точка иммунного ответа выбрана из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM3, CTLA-4, LAG-3, CEACAM-1, CEACAM-5, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR.

[0056] В вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены пути применения в лечении рака белка на основе антитела с привитым цитокином, содержащего: (i) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO: 13, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:14, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:15, и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит (d) LCDR1 под SEQ ID NO:29, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:30 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:31; и (ii) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO:45, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:46, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:47; и вариабельную область легкой цепи, которая содержит (d) LCDR1 под SEQ ID NO:61, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:62 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:63, в лечении рака.

[0057] Применение белка на основе антитела с привитым цитокином в лечении рака, где белок на основе антитела с привитым цитокином вводится в комбинации с другим терапевтическим средством.

[0058] Применение белка на основе антитела с привитым цитокином, где терапевтическое средство является антагонистом ингибитора контрольной точки иммунного ответа.

[0059] Применение, где антагонист ингибитора контрольной точки иммунного ответа выбран из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM3, CTLA-4, LAG-3, CEACAM-1, CEACAM-5, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR.

[0060] В определенных вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином содержит Fc-область антитела класса IgG. В конкретных вариантах осуществления иммуноглобулин выбран из Fc-области подкласса IgG1, IgG2 или IgG4. Антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающая молекула необязательно содержат по меньшей мере одну модификацию, которая обеспечивает модулирование (т. е. увеличение или уменьшение) связывания антитела или фрагмента антитела с Fc-рецептором. Тяжелая цепь иммуноглобулина может необязательно содержать модификацию, придающую модифицированную эффекторную функцию. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь иммуноглобулина может содержать мутацию, придающую сниженную эффекторную функцию, выбранную из любой из D265A, P329A, P329G, N297A, D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A, и P329G/L234A/L235A.

[0061] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином также содержит видоизменения в части молекулы, представляющей собой IL2. Видоизменения могут представлять собой единичные изменения аминокислот, единичные делеции аминокислот, множественные изменения аминокислот и множественные делеции аминокислот. Такие изменения в части молекулы, представляющей собой цитокин IL2, могут обеспечивать уменьшение аффинности белка на основе антитела с привитым цитокином к высокоаффинному рецептору IL2.

[0062] Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие по меньшей мере белковую тяжелую цепь и/или легкую цепь белка на основе антитела с привитым цитокином, описанного в данном документе. В другом связанном аспекте предусмотрены клетки-хозяева, которые являются подходящими для продуцирования белка на основе антитела с привитым цитокином, описанного в данном документе. В конкретных вариантах осуществления клетки-хозяева содержат

нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептидную легкую цепь и/или тяжелую цепь белка на основе антитела с привитым цитокином. В еще одном аспекте предусмотрены способы продуцирования белков на основе антител с привитым цитокином, включающие культивирование предусмотренных клеток-хозяев, описанных в данном документе, в условиях, подходящих для экспрессии, образования и секреции белка на основе антитела с привитым цитокином, и извлечение белка на основе антитела с привитым цитокином из культуры. В дополнительном аспекте в настоящем изобретении дополнительно предусмотрены наборы, содержащие белок на основе антитела с привитым цитокином, описанный в данном документе.

[0063] В другом связанном аспекте в настоящем изобретении дополнительно предусмотрены композиции, содержащие белок на основе антитела с привитым цитокином, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие белок на основе антитела с привитым цитокином, для введения индивидууму.

[0064] В другом аспекте предусмотрены способы лечения рака у индивидуума, нуждающегося в этом, включающие введение индивидууму терапевтически эффективного количества белка на основе антитела с привитым цитокином, описанного в данном документе. В дополнительном аспекте предусмотрен белок на основе антитела с привитым цитокином для применения в лечении или профилактике рака у индивидуума.

[0065] В некоторых вариантах осуществления пациент имеет нарушение пролиферации клеток или рак, например, меланому, рак легкого, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак молочной железы и лимфому.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0066] "Антитело" относится к молекуле из семейства иммуноглобулинов, содержащей тетрамерную структурную единицу. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну "легкую" цепь (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа), соединенные с помощью дисульфидной связи. Общеизвестные гены иммуноглобулинов включают в себя гены константных областей κ , λ , α , γ , δ , ϵ и μ , а также огромное количество генов переменных областей иммуноглобулинов. Легкие цепи классифицируют как κ либо λ . Тяжелые цепи классифицируют как γ , μ , α , δ или ϵ , которые в свою очередь определяют классы иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. Антитела могут относиться к любому изотипу/классу (например, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE) или любому подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2).

[0067] Как легкая, так и тяжелая цепи подразделяются на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константный" и "переменный" используются в структурном смысле и функциональном смысле. N-конец каждой цепи определяет переменную (V) область или домен из приблизительно 100-110 или более аминокислот,

несущих основную ответственность за распознавание антигенов. Термины "вариабельная область легкой цепи" (V_L) и "вариабельная область тяжелой цепи" (V_H) соответственно относятся к этим областям легких и тяжелых цепей. При спаривании V_H и V_L друг с другом образуется один антигенсвязывающий участок. Помимо V-областей, как тяжелые цепи, так и легкие цепи содержат константную (C) область или домен. Секретируемая форма C-области иммуноглобулина состоит из трех C-доменов CH1, CH2, CH3, необязательно CH4 (C μ) и шарнирной области. Мембраносвязанная форма C-области иммуноглобулина также имеет мембранные и внутриклеточные домены. Каждая легкая цепь имеет V_L на N-конце, за которой расположен константный домен (C) на ее другом конце. Константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, перемещение через плаценту, связывание с Fc-рецептором, связывание комплемента и т. п. Принято, что номера доменов константной области увеличиваются по мере их удаления от антигенсвязывающего участка или amino-конца антитела. N-конец представляет собой вариабельную область, а на C-конце расположена константная область; CH3- и CL-домены фактически содержат карбоксиконцевые домены тяжелой и легкой цепи соответственно. V_L расположен в одну линию с V_H , а CL расположен в одну линию с первым константным доменом тяжелой цепи. Как используется в данном документе, "антитело" охватывает традиционные структуры антител и видоизменения антител. Таким образом, в объем данной идеи включены белки на основе антител с привитым цитокином, полноразмерные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела и фрагменты таких антител.

[0068] Антитела существуют в виде интактных цепей иммуноглобулинов или в виде ряда хорошо изученных фрагментов антител, образующихся в результате расщепления различными пептидазами. Термин "фрагмент антитела", используемый в данном документе, относится к одной или нескольким частям антитела, в которых сохранены шесть CDR. Таким образом, например, пепсин расщепляет антитело ниже дисульфидных связей в шарнирной области с образованием $F(ab)'_2$, димера Fab' , который как таковой представляет собой легкую цепь, соединенную с V_H -CH1 с помощью дисульфидной связи. $F(ab)'_2$ может быть восстановлен в мягких условиях с разрушением дисульфидной связи в шарнирной области, в результате чего происходит превращение димера $F(ab)'_2$ в мономер Fab' . Мономер Fab' по сути представляет собой Fab с частью шарнирной области (Paul, *Fundamental Immunology* 3d ed. (1993)). Хотя различные фрагменты антител определены с точки зрения расщепления интактного антитела, специалисту в данной области будет понятно, что такие фрагменты можно синтезировать *de novo* химическим путем либо с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Как используется в данном документе, "фрагмент антитела" относится к одной или нескольким частям антитела, полученным посредством модификации целых антител либо синтезированным *de novo* с помощью технологий рекомбинантных ДНК, которые сохраняют специфичность связывания и функциональную активность. Примеры

фрагментов антител включают Fv-фрагменты, одноцепочечные антитела (ScFv), Fab, Fab', Fd (VH- и CH1-домены), dAb (VH и выделенная CDR); а также мультимерные варианты этих фрагментов (например, F(ab')₂) с той же самой специфичностью связывания. Белки на основе антител с привитым цитокином также могут содержать фрагменты антител, необходимые для достижения необходимой специфичности связывания и активности.

[0069] "Fab"-домен, как используется в данном контексте, содержит переменный домен тяжелой цепи, CH1-домен константной области, переменный домен легкой цепи и CL-домен константной области легкой цепи. Взаимодействие доменов стабилизируется с помощью дисульфидной связи между CH1- и CL-доменами. В некоторых вариантах осуществления домены тяжелой цепи в Fab расположены от N-конца к C-концу в порядке VH-CH, и домены легкой цепи в Fab расположены от N-конца к C-концу в порядке VL-CL. В некоторых вариантах осуществления домены тяжелой цепи в Fab расположены от N-конца к C-концу в порядке CH-VH, и домены легкой цепи в Fab расположены в порядке CL-VL. Несмотря на то, что Fab-фрагмент исторически был идентифицирован с помощью расщепления интактного иммуноглобулина папаином, в контексте настоящего изобретения "Fab" в типичном случае образуется рекомбинантным путем с помощью любого способа. Каждый Fab-фрагмент является моновалентным в том, что касается связывания антигена, т. е. он имеет один антигенсвязывающий участок.

[0070] "Домены, определяющие комплементарность" или "области, определяющие комплементарность" ("CDR") взаимозаменяемо относятся к гиперпеременным областям V_L и V_H. CDR представляют собой участок связывания цепей антитела с белком-мишенью, который обладает специфичностью в отношении такого белка-мишени. В каждой человеческой V_L или V_H имеется по три CDR (CDR1-3, пронумерованные последовательно от N-конца), составляющие приблизительно 15-20% от переменных доменов. CDR являются структурно комплементарными эпитопу белка-мишени, и, таким образом, непосредственно отвечают за специфичность связывания. Остальные отрезки в V_L или V_H, так называемые каркасные области (FR), характеризуются меньшей изменчивостью аминокислотной последовательности (Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000).

[0071] Положения CDR и каркасных областей можно определить с помощью различных определений, хорошо известных из уровня техники, например, согласно Kabat, Chothia и AbM (см., например, Kabat et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, Johnson et al., Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature, 342:877-883 (1989); Chothia et al., J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani et al., J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997)). Определения антигенсвязывающих активных центров также описаны в следующих источниках: Ruiz et al., Nucleic Acids Res., 28:219-221 (2000); и Lefranc, M.-P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001); (нумерация ImMunoGeneTics (IMGT)) Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003); MacCallum et al., J. Mol.

Biol., 262:732-745 (1996); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989); Martin et al., Methods Enzymol., 203:121-153 (1991); а также Rees et al., в Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996).

[0072] Согласно Kabat аминокислотные остатки CDR в V_H нумеруются 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); а аминокислотные остатки CDR в V_L нумеруются 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). Согласно Chothia аминокислоты CDR в V_H нумеруются 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); а аминокислотные остатки в V_L нумеруются 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). При объединении определений CDR согласно Kabat и Chothia CDR состоят из аминокислотных остатков 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в человеческой V_H и аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в человеческой V_L .

[0073] "Вариабельная область легкой цепи антитела" или "вариабельная область тяжелой цепи антитела", как используется в данном документе, относится к полипептиду, содержащему соответственно V_L или V_H . Эндогенная V_L кодируется генными сегментами V (вариабельным) и J (соединительным), а эндогенная V_H кодируется V, D (дополнительным) и J. Каждая из V_L или V_H содержит CDR, а также каркасные области (FR). Термин "вариабельная область" или "V-область" взаимозаменяемо относится к тяжелой или легкой цепи, содержащей FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. V-область может быть встречающейся в природе, рекомбинантной или синтетической. В настоящей заявке легкие цепи антител и/или тяжелые цепи антител в отдельных случаях могут совместно называться "цепями антител". Предусмотренная и дополнительно описанная в данном документе "вариабельная область легкой цепи антитела", или "вариабельная область тяжелой цепи антитела", и/или "вариабельная область", и/или "цепь антитела" необязательно содержит полипептидную последовательность цитокина, включенную в CDR.

[0074] С-концевая область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащая, например, CH2- и CH3-домены, в данном документе представляет собой "Fc"-домен. "Fc-область", как используется в данном документе, относится к константной области антитела без учета первого домена константной области иммуноглобулина (CH1). Fc относится к последним двум доменам константной области иммуноглобулина IgA, IgD и IgG, последним трем доменам константной области иммуноглобулина IgE и IgM и гибкой шарнирной области в N-концевом направлении от этих доменов. В случае с IgA и IgM Fc может содержать J-цепь. В случае с IgG Fc содержит C γ 2- и C γ 3-домены иммуноглобулина и шарнирную область между C γ 1 и C γ . В данной области техники следует понимать, что границы Fc-области могут варьироваться, однако, как обычно определяется, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG содержит остатки C226 или P230 на своем карбоксильном конце при использовании нумерации согласно EU-индексу, как изложено в Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.). "Fc-область" может относиться к данной области в выделенном

состоянии или данной области в качестве составной части антитела или фрагмента антитела. "Fc-область" включает в себя встречающиеся в природе аллельные варианты Fc-области, например, по СН2- и СН3-области, в том числе, например, имеющие модификации, которые обеспечивают модулирование эффекторной функции. Fc-области также включают в себя варианты, которые не приводят к изменениям биологической функции. Например, одна или несколько аминокислот удалены с N-конца или C-конца Fc-области иммуноглобулина без существенной потери биологической функции. Например, в определенных вариантах осуществления C-концевой лизин модифицирован, замещен или удален. В конкретных вариантах осуществления один или несколько C-концевых остатков в Fc-области изменены или удалены. В определенных вариантах осуществления один или несколько C-концевых остатков в Fc (например, концевой лизин) удалены. В определенных других вариантах осуществления один или несколько C-концевых остатков в Fc заменены альтернативной аминокислотой (например, концевой лизин замещен). Такие варианты отбирают в соответствии с общими правилами, известными из уровня техники, чтобы оказываемый эффект в отношении активности был минимальным (см., например, Bowie, et al., Science 247:306-1310, 1990). Fc-домен представляет собой часть иммуноглобулина (Ig), которая распознается клеточными рецепторами, такими как FcR, и с которой связывается комплемент-активирующий белок C1q. Нижняя шарнирная область, которая кодируется в 5'-части экзона СН2, обеспечивает гибкость антитела для связывания с FcR-рецепторами.

[0075] "Химерное антитело" представляет собой молекулу антитела, в которой (а) константная область или ее часть изменена, замещена или обменена таким образом, что антигенсвязывающий участок (вариабельная область) связан с константной областью, относящейся к другому или измененному классу, имеющей другую или измененную эффекторную функцию и/или полученной из другого или измененного вида, или с совершенно другой молекулой, которая придает новые свойства химерному антителу, например, ферментом, токсином, гормоном, фактором роста, лекарственным средством и т. д.; или (b) вариабельная область или ее часть изменена, замещена или обменена на вариабельную область, обладающую другой или измененной антигенной специфичностью.

[0076] "Гуманизованное" антитело представляет собой антитело, которое сохраняет реактивность (например, специфичность связывания, активность) антитела, отличного от человеческого, но при этом является менее иммуногенным у людей. Этого можно достичь, например, путем сохранения отличных от человеческих CDR-областей и замещения оставшихся частей антитела человеческими аналогами. См., например, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3):169-217 (1994).

[0077] "Человеческое антитело" включает в себя антитела, имеющие вариабельные области, в которых как каркасные области, так и CDR-области получены из

последовательностей человеческого происхождения. Кроме того, если антитело содержит константную область, то константная область также получена из таких человеческих последовательностей, например, человеческих последовательностей зародышевого типа, или мутантных вариантов человеческих последовательностей зародышевого типа, или антитела, содержащего консенсусные последовательности каркасных областей, полученные в результате анализа последовательностей человеческих каркасных областей, например, как описано в Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296:57-86, 2000. Человеческие антитела могут содержать аминокислотные остатки, которые не кодируются человеческими последовательностями (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматических мутаций *in vivo*, или консервативную замену, которая способствует стабильности или производству).

[0078] Термин "соответствующая человеческая последовательность зародышевого типа" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность или подпоследовательность человеческой вариабельной области, которая обладает наиболее высокой установленной идентичностью аминокислотной последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью или подпоследовательностью вариабельной области в сравнении со всеми другими известными аминокислотными последовательностями вариабельной области, кодируемыми последовательностями генов вариабельной области человеческого иммуноглобулина зародышевого типа. Соответствующая человеческая последовательность зародышевого типа также может относиться к аминокислотной последовательности или подпоследовательности человеческой вариабельной области, характеризующейся наиболее высокой идентичностью аминокислотной последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью или подпоследовательностью вариабельной области в сравнении со всеми другими оцененными аминокислотными последовательностями вариабельной области. Соответствующей человеческой последовательностью зародышевого типа могут быть только каркасные области, только области, определяющие комплементарность, каркасные области и области, определяющие комплементарность, вариабельный сегмент (определенный выше) или другие комбинации последовательностей или подпоследовательностей, которые содержат вариабельную область. Идентичность последовательностей может быть определена с помощью способов, описанных в данном документе, например, путем выравнивания двух последовательностей с помощью BLAST, ALIGN или другого алгоритма выравнивания, известного из уровня техники. Соответствующая человеческая последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность зародышевого типа может характеризоваться по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью вариабельной области.

[0079] Термин "валентность", используемый в данном документе, относится к количеству потенциальных участков связывания мишени в полипептиде. Каждый участок связывания мишени специфично связывает одну молекулу-мишень или специфический участок в молекуле-мишени. Если полипептид содержит более одного участка связывания мишени, то каждый участок связывания мишени может специфично связывать одну и ту же или различные молекулы (например, может связываться с различными молекулами, например, различными антигенами, или различными эпитопами в одной и той же молекуле). Традиционное антитело, например, имеет два связывающих участка и является бивалентным; "тривалентный" и "тетравалентный" относится к присутствию соответственно трех связывающих участков и четырех связывающих участков в молекуле антитела. Белки на основе антител с привитым цитокином могут быть моновалентными (т. е. связывать одну молекулу-мишень), бивалентными или поливалентными (т. е. связывать более одной молекулы-мишени).

[0080] Фраза "специфично связывает" или "специфичность связывания", если она используется в контексте описания взаимодействия между мишенью (например, белком) и белком на основе антитела с привитым цитокином, относится к реакции связывания, которая является определяющей для установления присутствия мишени в неоднородной популяции белков и других биологических веществ, например, в биологическом образце, например, образце крови, сыворотки крови, плазмы крови или ткани. Таким образом, при определенных установленных условиях белок на основе антитела с привитым цитокином с конкретной специфичностью связывания связывается с конкретной мишенью на уровне, в по меньшей мере два раза превышающем фоновый уровень, и по существу не связывается в значительном количестве с другими мишенями, присутствующими в образце. В одном варианте осуществления при установленных условиях белок на основе антитела с привитым цитокином с определенной специфичностью связывания связывается с конкретным антигеном на уровне, в по меньшей мере десять (10) раз превышающем фоновый уровень, и по существу не связывается в значительном количестве с другими мишенями, присутствующими в образце. Для специфичного связывания с белком на основе антитела с привитым цитокином в таких условиях может потребоваться, чтобы белок на основе антитела с привитым цитокином был отобран по его специфичности в отношении конкретного белка-мишени. Как используется в данном документе, специфичное связывание предусматривает белки на основе антител с привитым цитокином, которые избирательно связываются с низкоаффинным рецептором человеческого IL2, и не предусматривает белки на основе антител с привитым цитокином, которые перекрестно реагируют, например, с другими членами суперсемейства рецепторов цитокинов. В некоторых вариантах осуществления отбирают такие белки на основе антител с привитым цитокином, которые избирательно связываются с низкоаффинным рецептором человеческого IL2 и перекрестно реагируют с IL2R, отличным от человеческого (например, с IL2R макака-крабоеда). В некоторых вариантах осуществления отбирают такие привитые белки на основе антител, которые избирательно

связываются с низкоаффинным рецептором человеческого IL2 и реагируют с дополнительной мишенью. Разнообразные форматы можно применять для отбора белков на основе антител с привитым цитокином, которые характеризуются специфической реактивностью в отношении конкретного белка-мишени. Например, твердофазные иммунологические анализы ELISA обычно применяются для отбора антител, характеризующихся специфической иммунореактивностью в отношении белка (см., например, Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), в отношении описания форматов и условий иммунологического анализа, которые можно применять для определения специфической иммунореактивности). Реакция специфического или избирательного связывания в типичном случае будет давать сигнал, в по меньшей мере два раза превышающий фоновый сигнал, и в более типичном случае в по меньшей мере 10-100 раз превышающий фоновый сигнал.

[0081] Термин "равновесная константа диссоциации (K_D , M)" относится к константе скорости диссоциации (k_d , время⁻¹), деленной на константу скорости ассоциации (k_a , время⁻¹, M⁻¹). Равновесные константы диссоциации можно измерить с помощью любого способа, известного из уровня техники. Как правило, белки на основе антител с привитым цитокином будут характеризоваться равновесной константой диссоциации, составляющей менее чем приблизительно 10^{-7} или 10^{-8} M, например, менее чем приблизительно 10^{-9} M или 10^{-10} M, в некоторых вариантах осуществления менее чем приблизительно 10^{-11} M, 10^{-12} M или 10^{-13} M.

[0082] Используемый в данном документе термин "эпитоп" или "связывающая область" относится к домену в белковом антигене, который отвечает за специфичное связывание между CDR антитела и белковым антигеном.

[0083] Используемый в данном документе термин "рецепторсвязывающая область цитокина" относится к домену в части белка на основе антитела с привитым цитокином, представляющей собой привитый цитокин, который отвечает за специфичное связывание между привитым цитокином и его рецептором (например, низкоаффинным рецептором IL2). Существует по меньшей мере одна такая рецепторсвязывающая область цитокина, присутствующая в каждом белке на основе антитела с привитым цитокином, и каждая из связывающих областей может быть идентичной другим или отличаться от других.

[0084] Термин "агонист" взаимозаменяемо относится к антителу, способному активировать рецептор с индукцией полного или частичного рецептор-опосредованного ответа. Например, агонист низкоаффинного рецептора IL2 связывается с низкоаффинным рецептором IL2 и индуцирует IL2-опосредованную внутриклеточную передачу сигнала, активацию клеток и/или пролиферацию CD8⁺ эффекторных Т-клеток и NK-клеток. Агонист, представляющий собой белок на основе антитела с привитым цитокином, стимулирует передачу сигнала через низкоаффинный рецептор IL в некоторых отношениях аналогично нативному лиганду IL2. Связывание IL2 с низкоаффинным рецептором IL2 индуцирует активацию Jak1 и Jak2, что приводит к фосфорилированию STAT5. В некоторых вариантах осуществления агонист, представляющий собой белок на

основе антитела с привитым цитокином, может быть идентифицирован по его способности связываться с низкоаффинным рецептором IL2 и индуцировать фосфорилирование STAT5 и/или пролиферацию CD8⁺ эффекторных Т-клеток или NK-клеток.

[0085] Термины "IL2", или "интерлейкин 2", или "интерлейкин-2", или "IL-2" взаимозаменяемо относятся к члену семейства альфа-спиральных цитокинов, где нативный белок выполняет функции регуляции и поддержания воспалительных процессов. Особенностью IL2 является то, что N- и C-концы расположены вблизи друг от друга в пространстве, что делает белок цитокин IL2 подходящим для прививания на антитело. IL2, содержащий остатки 21-153 полноразмерного нативного человеческого белка, используется в качестве составной части агонистов, представляющих собой белки на основе антител с привитым цитокином. Человеческий IL2, раскрываемый в данном документе, характеризуется по всей своей длине по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:2 и сохраняет предпочтительную агонистическую активность белков на основе антител с привитым цитокином, описанных в данном документе, и он был опубликован под номером доступа в GenBank NP_000577. SEQ ID NO:1 представляет собой последовательность кДНК человеческого IL2. Нуклеиновая кислота человеческого IL2, кодирующая белок IL2, раскрываемый в данном документе, характеризуется по всей своей длине по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:1, и она была опубликована под номером доступа в GenBank NM_000586.

[0086] Термин "белок на основе антитела с привитым цитокином", или "антитело с привитым цитокином", или "привитый" означает, что по меньшей мере один цитокин включен непосредственно в CDR антитела, прерывая последовательность CDR. Цитокин может быть включен в HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3. Цитокин может быть включен в HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3 и включен около N-концевой последовательности CDR или около C-концевой последовательности CDR. Цитокин, включенный в CDR, может нарушать специфичное связывание части антитела с исходным белком-мишенью, или белок на основе антитела с привитым цитокином может сохранять свое специфичное связывание со своим белком-мишенью. Иллюстративные цитокины включают в себя без ограничения IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , TGF- β , TNF- α , и TNF- β . Также можно привить цитокин на конкретную CDR одного "плеча" антитела и привить другой отличный цитокин на CDR другого "плеча" антитела. Например, прививание IL2 на HCDR1 одного "плеча" антитела и прививание IL-7 на LCDR1 другого "плеча" белка на основе антитела с привитым цитокином может обеспечивать создание бифункционального белка на основе антитела с привитым цитокином.

[0087] Термин "выделенный" применительно к нуклеиновой кислоте или белку

означает, что нуклеиновая кислота или белок по сути не содержат других клеточных компонентов, с которыми они связаны в естественном состоянии. Они предпочтительно находятся в однородном состоянии. Они могут находиться в сухом состоянии либо в водном растворе. Чистоту и однородность в типичном случае определяют с помощью методик аналитической химии, таких как электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективная жидкостная хроматография. Белок, который является преобладающим видом молекул, присутствующим в препарате, является по существу очищенным. В частности, выделенный ген отделен от открытых рамок считывания, которые фланкируют ген и кодируют белок, отличный от кодируемого геном, представляющим интерес. Термин "очищенный" означает, что нуклеиновая кислота или белок дают по сути одну полосу в электрофоретическом геле. В частности, это означает, что нуклеиновая кислота или белок являются на по меньшей мере 85% чистыми, более предпочтительно на по меньшей мере 95% чистыми и наиболее предпочтительно на по меньшей мере 99% чистыми.

[0088] Термин "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" относится к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их полимерам в одонитевой или двухнитевой форме. Если специально не ограничено, то данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают свойствами связывания, аналогичными свойствам эталонной нуклеиновой кислоты, и метаболизируются посредством механизма, аналогичного механизму для нуклеотидов, встречающихся в природе. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также косвенно охватывает ее варианты с консервативными модификациями (например, с заменами вырожденными кодонами), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также явно указанную последовательность. В частности, замены вырожденными кодонами можно осуществлять посредством создания последовательностей, в которых в третьем положении одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов произведена замена любым из канонических оснований и/или дезоксиинозиновыми остатками (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

[0089] Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полимеру из аминокислотных остатков. Данные термины применимы к полимерам из аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей аминокислоты, встречающейся в природе, а также к полимерам из аминокислот, встречающихся в природе, и полимеру из аминокислот, не встречающихся в природе.

[0090] Термин "аминокислота" относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично аминокислотам, встречающимся в

природе. Аминокислоты, встречающиеся в природе, представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также такие аминокислоты, которые были впоследствии модифицированы, например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют такую же основную химическую структуру, что и аминокислота, встречающаяся в природе, т. е. имеют α -атом углерода, который связан с атомом водорода, карбоксильную группу, аминогруппу и R-группу, например, к гомосерину, норлейцину, метионинсульфоксиду, метионинметилсульфонию. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же основную химическую структуру, что и аминокислота, встречающаяся в природе. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличающуюся от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют аналогично аминокислоте, встречающейся в природе.

[0091] "Варианты с консервативными модификациями" относятся как к аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновой кислоты. Что касается конкретных последовательностей нуклеиновой кислоты, варианты с консервативными модификациями относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по сути идентичные аминокислотные последовательности, или же, если нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, к по сути идентичным последовательностям. Вследствие вырожденности генетического кода любой указанный белок кодируется большим количеством функционально идентичных нуклеиновых кислот. Например, все из кодонов GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором кодоном задан аланин, кодон может быть изменен на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие варианты нуклеиновой кислоты являются "молчащими вариантами", которые представляют собой одну разновидность вариантов с консервативными модификациями. В данном документе каждая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, также описывает каждый возможный молчащий вариант нуклеиновой кислоты. Специалисту в данной области будет понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, который кодирует полипептид, неявно определен в каждой описанной последовательности.

[0092] Что касается аминокислотных последовательностей, специалисту в данной области будет понятно, что отдельные замены, делеции или добавления в последовательности нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, при которых происходит изменение, добавление или удаление одной аминокислоты или небольшой процентной доли аминокислот в кодируемой последовательности, относятся к "варианту с

консервативной модификацией", если изменение приводит к замене аминокислоты на химически сходную аминокислоту. Таблицы консервативных замен, в которых приведены функционально сходные аминокислоты, хорошо известны из уровня техники. Такие варианты с консервативными модификациями дополняют и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели. Каждая из следующих восьми групп содержит аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T); и 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins (1984)).

[0093] "Процентное значение идентичности последовательностей" определяют путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, при этом для оптимального выравнивания этих двух последовательностей часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т. е. гэпы) по сравнению с эталонной последовательностью (например, полипептидной), которая не содержит добавлений или делеций. Процентное значение рассчитывают путем определения количества положений, в которых в обеих последовательностях встречаются идентичные основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток, с получением количества совпадающих положений, деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процентного значения идентичности последовательностей.

[0094] Термины "идентичный" или "процентная идентичность" применительно к двум или более нуклеиновым кислотам или полипептидным последовательностям относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми последовательностями. Две последовательности являются "по существу идентичными", если две последовательности имеют определенную процентную долю аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т. е. характеризуются по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей в определенной области или, если не указано, во всей последовательности эталонной последовательности) при сравнении и выравнивании для достижения максимального соответствия в окне сравнения или в установленной области при измерении с помощью одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или с помощью выравнивания в ручном режиме и визуального осмотра. В настоящем изобретении предусмотрены полипептиды или полинуклеотиды, которые являются по существу идентичными соответственно полипептидам или полинуклеотидам, приведенным в качестве примера в данном документе (например, переменным областям, приведенным в качестве примера под любой из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:51 или SEQ ID NO:67). Идентичность имеет место в области, имеющей длину по меньшей мере приблизительно 15, 25 или 50

нуклеотидов, или более предпочтительно в области, имеющей длину 100-500 или 1000 или больше нуклеотидов, или по всей длине эталонной последовательности. Что касается аминокислотных последовательностей, идентичность или существенная идентичность может иметь место в области, имеющей длину по меньшей мере 5, 10, 15 или 20 аминокислот, необязательно имеющей длину по меньшей мере приблизительно 25, 30, 35, 40, 50, 75 или 100 аминокислот, необязательно имеющей длину по меньшей мере приблизительно 150, 200 или 250 аминокислот, или по всей длине эталонной последовательности. Что касается более коротких аминокислотных последовательностей, например, аминокислотных последовательностей из 20 или меньшего количества аминокислот, существенная идентичность имеет место, если один или два аминокислотных остатка являются консервативно замененными в соответствии с консервативными заменами, определенными в данном документе.

[0095] При сравнении последовательностей в типичном случае одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости устанавливают координаты подпоследовательностей, и устанавливают программные параметры алгоритма для анализа последовательностей. Можно использовать программные параметры по умолчанию, или можно устанавливать альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает значения процентной идентичности последовательностей для тестируемых последовательностей по сравнению с эталонной последовательностью, исходя из программных параметров.

[0096] "Окно сравнения", как используется в данном документе, включает ссылку на сегмент из любого количества смежных положений, выбранного из группы, состоящей из от 20 до 600, обычно от приблизительно 50 до приблизительно 200, чаще от приблизительно 100 до приблизительно 150, в котором последовательность можно сравнивать с эталонной последовательностью с таким же количеством смежных положений после того, как две последовательности были подвергнуты оптимальному выравниванию. Способы выравнивания последовательностей для целей сравнения хорошо известны из уровня техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для целей сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии Смита-Уотермана, (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482с, с помощью алгоритма выравнивания областей гомологии Нидлмана-Вунша, (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, с помощью способа поиска сходства Пирсона-Липмана, (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, с помощью компьютерных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в составе пакета программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Мэдисон, Висконсин) или с помощью выравнивания в ручном режиме и визуального осмотра (см., например, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (приложение к изданию 1995 г.)).

[0097] Двумя примерами алгоритмов, которые подходят для определения процентной идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны соответственно в Altschul et al. (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 и Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным от Национального центра биотехнологической информации. На первом этапе данный алгоритм предусматривает идентификацию пар последовательностей с высоким баллом сходства (HSP) посредством идентификации коротких слов длиной W в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому пороговому баллу T с положительным значением при выравнивании со словом такой же длины в последовательности из базы данных. T называют пороговым баллом сходства соседних слов (Altschul et al., выше). Эти первоначальные совпадения соседних слов выступают в качестве "затравок" для начала поисков, предназначенных для нахождения более длинных HSP, содержащих их. Совпадения слов продлеваются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока может увеличиваться суммарный балл выравнивания. В случае нуклеотидных последовательностей суммарные баллы рассчитывают с использованием параметров M (поощрительный балл за пару совпадающих остатков; всегда > 0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда < 0). В случае аминокислотных последовательностей для подсчета суммарного балла используют матрицу замен. Продление совпадений слов в каждом направлении останавливается, когда суммарный балл выравнивания уменьшается на величину X относительно своего максимального достигнутого значения; суммарный балл стремится к нулю или ниже вследствие накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательными баллами; или достигается конец любой из последовательностей. Параметры W , T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) в качестве параметров по умолчанию используются длина слова (W), составляющая 11, значение ожидания (E), составляющее 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих нитей. В случае аминокислотных последовательностей в программе BLASTP в качестве параметров по умолчанию используются длина слова, составляющая 3, и значение ожидания (E), составляющее 10, а также матрица замен BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915), число выравниваний (B), составляющее 50, значение ожидания (E), составляющее 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих нитей.

[0098] Алгоритм BLAST также осуществляет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). Одной мерой сходства, предусмотренной в алгоритме BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая указывает на вероятность, с которой совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями возникло случайно. Например, нуклеиновая кислота считается сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при

сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее чем приблизительно 0,2, более предпочтительно менее чем приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно менее чем приблизительно 0,001.

[0099] Показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты или два полипептида являются по существу идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, иммунологически перекрестно реагирует с антителами, выработка которых индуцирована полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид в типичном случае является по существу идентичным второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются по существу идентичными, является то, что две молекулы или их комплементарные цепи гибридизируются друг с другом в жестких условиях, как описано ниже. Еще одним показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются по существу идентичными, является то, что для амплификации последовательности можно использовать одни и те же праймеры.

[00100] Термин "связь" при использовании в контексте описания того, как связывающие области соединены в белке на основе антитела с привитым цитокином по настоящему изобретению, включает в себя все возможные средства для физического связывания данных областей. Большое количество связывающих областей часто связаны с помощью химических связей, таких как ковалентная связь (например, пептидная связь или дисульфидная связь) или нековалентная связь, которая может представлять собой прямую связь (т. е. без линкера между двумя связывающими областями) либо непрямую связь (т. е. с помощью по меньшей мере одной линкерной молекулы между двумя или более связывающими областями).

[00101] Термины "субъект", "пациент" и "индивидуум" взаимозаменяемо относятся к млекопитающему, например, к человеку или отличному от человека млекопитающему-примату. Млекопитающее также может являться лабораторным млекопитающим, например, мышью, крысой, кроликом, хомяком. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее может являться сельскохозяйственным млекопитающим (например, лошадью, овцой, быком, свиньей, верблюдом) или домашним млекопитающим (например, собакой, кошкой).

[00102] Используемые в данном документе термины "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" какого-либо заболевания или нарушения в одном варианте осуществления относятся к уменьшению интенсивности проявлений заболевания или нарушения (т. е. замедлению, или остановке, или ослаблению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом варианте осуществления "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" относятся к облегчению или уменьшению тяжести по меньшей мере одного физического параметра, в том числе таких, которые могут быть неявными для пациента. В еще одном варианте осуществления

"лечить", "осуществление лечения" или "лечение" относится к модулированию заболевания или нарушения физическим путем (например, путем стабилизации явного симптома) либо физиологическим путем (например, путем стабилизации физического параметра) или как тем, так и другим. В еще одном варианте осуществления "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" относится к предупреждению или задержке появления, или развития, или прогрессирования заболевания или нарушения.

[00103] Термин "терапевтически приемлемое количество" или "терапевтически эффективная доза" взаимозаменяемо относится к количеству, достаточному для достижения желаемого результата (т. е. снижения интенсивности воспаления, ингибирования боли, предупреждения воспаления, ингибирования или предупреждения воспалительной реакции). В некоторых вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество не индуцирует или не вызывает нежелательные побочные эффекты. Терапевтически приемлемое количество можно определить, вводя вначале низкую дозу, а затем постепенно увеличивая данную дозу до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект. "Профилактически эффективная доза" и "терапевтически эффективная доза" белка на основе антитела с привитым цитокином IL2 может соответственно обеспечивать предупреждение появления или приводить к уменьшению тяжести симптомов заболевания, в том числе симптомов, ассоциированных с раком и лечением рака.

[00104] Термин "совместное введение" относится к одновременному присутствию двух (или более) активных средств в организме индивидуума. Активные средства, которые вводятся совместно, могут доставляться одновременно или последовательно.

[00105] Используемая в данном документе фраза "состоящий по сути из" относится к родам или видам активных фармацевтических средств, включенных в способ или композицию, а также к любым неактивным носителям или наполнителям для предполагаемой цели применения способов или композиций. В некоторых вариантах осуществления фраза "состоящий по сути из" однозначно исключает включение одного или нескольких дополнительных активных средств, отличных от белка на основе антитела с привитым цитокином IL2. В некоторых вариантах осуществления фраза "состоящий по сути из" однозначно исключает включение большего количества дополнительных активных средств, отличных от белка на основе антитела с привитым цитокином IL2 и второго средства, вводимого совместно.

[00106] Формы существительного единственного числа включают формы множественного числа, если контекст четко не указывает на иное.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00107] Фигура 1 представляет собой таблицу, в которой обобщены иллюстративные белки на основе антител с привитым цитокином IL2 и формы их активности в отношении CD8⁺ эффекторных Т-клеток.

[00108] На фигуре 2 показано, что IgG.IL2R67A.H1 характеризуется более длительным периодом полувыведения, чем Proleukin®. IgG.IL2R67A.H1 характеризуется

периодом полувыведения, составляющим 12-14 часов, как показано на графике, тогда как Proleukin® характеризуется T1/2, составляющим менее 4 часов, и не может быть показан на графике.

[00109] На фигурах 3A-3C продемонстрировано, что IgG.IL2R67A.H1 обеспечивает размножение CD8+ эффекторных Т-клеток более эффективно и с меньшей токсичностью, чем Proleukin® или слитая молекула IL2-Fc, у мышей C57BL/6 в эквивалентной дозе 100 мкг в моменты времени день 4, день 8 и день 11.

[00110] На фигурах 3D-3F продемонстрировано, что IgG.IL2R67A.H1 обеспечивает размножение CD8+ эффекторных Т-клеток более эффективно и с меньшей токсичностью, чем Proleukin® или слитая молекула IL2-Fc, у мышей C57BL/6 в эквивалентной дозе 500 мкг в моменты времени день 4, день 8 и день 11.

[00111] На фигуре 4A показано, что IgG.IL2R67A.H1 обеспечивает избирательное размножение CD8+ эффекторных Т-клеток и лучше переносится, чем Proleukin®, мышами NOD.

[00112] На фигуре 4B показана таблица, в которой отображена увеличенная активность IgG.IL2R67A.H1 и IgG.IL2F71A.H1 в отношении CD8+ эффекторных Т-клеток у мышей NOD.

[00113] На фигуре 5 показан график эффективности IgG.IL2R67A.H1 в качестве средства монотерапии в модели опухоли из клеток CT26.

[00114] На фигуре 6 представлены данные об IgG.IL2R67A.H1 в качестве средства монотерапии либо в комбинации с антителом в мышинной модели меланомы из клеток B16. На графике показано, что IgG.IL2R67A.H1 в комбинации с антителом к TRP1 TA99 является более эффективным, чем TA99 в отдельности, слитая молекула IL2-Fc в отдельности, TA99 совместно со слитой молекулой IL2-Fc. Синергизм наблюдался при использовании TA99 и IgG.IL2R67A.H1 в дозах 100 и 500 мкг.

[00115] На фигуре 7 показан график со значениями, по которым отслеживают активность pSTAT5 в панели человеческих клеток при сравнении IgG.IL2R67A.H1 и IgG.IL2F71A.H1 с Proleukin®.

[00116] На фигуре 8 показан график с данными ELISA, на котором показано, что при прививании IL2 на CDRH1 антитела к RSV (IgG.IL2R67A.H1) связывание с RSV сохраняется. В то же время связывание с RSV снижается, если IL2 привит на CDRL3 или CDRH3. Если IL2 привит на остов другого антитела (Xolair), то связывание с RSV отсутствует.

Белки на основе антител с привитым цитокином, нацеливающиеся на низкоаффинный рецептор IL2

[00117] В данном документе предусмотрены белковые конструкции, содержащие молекулу IL2, привитую на область, определяющую комплементарность (CDR), антитела. Белки на основе антител с привитым цитокином по настоящему изобретению демонстрируют подходящие свойства для применения у людей-пациентов, например, они сохраняют иммуностимулирующую активность, аналогичную таковой у нативного или

рекомбинантного человеческого IL2. В то же время отрицательные эффекты уменьшаются. Например, имеет место меньшая стимуляция Трег-клеток. Другие виды активности и характеристики также продемонстрированы во всем настоящем описании. Таким образом, предусмотрены белки на основе антител с привитым цитокином, обладающие улучшенным терапевтическим профилем по сравнению с ранее известными терапевтическими средствами на основе IL2 и модифицированного IL2, такими как Proleukin®, и способы применения предусмотренных белков на основе антител с привитым цитокином в лечении рака.

[00118] Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены белки на основе антител с привитым цитокином, которые являются агонистами низкоаффинного рецептора IL2, с профилями избирательной активности. Предусмотренные белки на основе антител с привитым цитокином содержат последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина и последовательность легкой цепи иммуноглобулина. Каждая последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и константную область тяжелой цепи (CH), где константная область тяжелой цепи состоит из константных областей CH1, CH2 и CH3. Каждая последовательность легкой цепи иммуноглобулина содержит переменную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи (CL). В каждом привитом белке на основе антитела и цитокина молекула IL2 включена в область, определяющую комплементарность (CDR), VH или VL.

[00119] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином содержит молекулу IL2, включенную в CDR тяжелой цепи. В определенных вариантах осуществления молекула IL2 включена в область 1, определяющую комплементарность, тяжелой цепи (HCDR1). В определенных вариантах осуществления молекула IL2 включена в область 2, определяющую комплементарность, тяжелой цепи (HCDR2). В определенных вариантах осуществления молекула IL2 включена в область 3, определяющую комплементарность, тяжелой цепи (HCDR3).

[00120] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином содержит молекулу IL2, включенную в CDR легкой цепи. В определенных вариантах осуществления молекула IL2 включена в область 1, определяющую комплементарность, легкой цепи (LCDR1). В определенных вариантах осуществления молекула IL2 включена в область 2, определяющую комплементарность, легкой цепи (LCDR2). В определенных вариантах осуществления молекула IL2 включена в область 3, определяющую комплементарность, легкой цепи (LCDR3).

[00121] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином содержит последовательность IL2, включенную в CDR, при этом последовательность IL2 вставлена в последовательность CDR. Вставка может происходить в N-концевой области CDR или возле нее, в срединной области CDR или в C-концевой области CDR или возле нее. В других вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином содержит молекулу IL2, включенную в CDR, при этом

последовательность IL2 не сдвигает рамку считывания последовательности CDR. В других вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином содержит молекулу IL2, включенную в CDR, при этом последовательность IL2 замещает всю последовательность CDR или ее часть. Замещение может происходить в N-концевой области CDR, в срединной области CDR или в C-концевой области CDR или возле нее. Замещение может затрагивать только одну или две аминокислоты последовательности CDR или всю последовательность CDR.

[00122] В некоторых вариантах осуществления молекула IL2 привита непосредственно на CDR без пептидного линкера, без дополнительных аминокислот между последовательностью CDR и последовательностью IL2.

[00123] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антител с привитым цитокином содержат тяжелые цепи иммуноглобулина, представляющие собой тяжелые цепи антитела класса IgG. В определенных вариантах осуществления тяжелая цепь IgG относится к любому из подклассов IgG1, IgG2 или IgG4.

[00124] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антител с привитым цитокином содержат последовательности тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина, выбранные из известной последовательности иммуноглобулина, используемой в клинической практике. В определенных вариантах осуществления белки на основе антител с привитым цитокином содержат последовательности тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина, которые представляют собой гуманизированные последовательности. В других определенных вариантах осуществления белки на основе антител с привитым цитокином содержат последовательности тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина, которые представляют собой человеческие последовательности.

[00125] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антител с привитым цитокином содержат последовательности тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина, выбранные из последовательностей иммуноглобулина зародышевого типа.

[00126] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антител с привитым цитокином содержат последовательности тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина, характеризующиеся специфичностью связывания переменных доменов иммуноглобулина с мишенью, отличной от специфичности связывания молекулы IL2. В некоторых вариантах осуществления специфичность связывания переменного домена иммуноглобулина со своей мишенью сохраняется на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, или 100% в присутствии привитого цитокина. В определенных вариантах осуществления сохраняющаяся специфичность связывания направлена на мишень, отличную от человеческой. В определенных вариантах осуществления сохраняющаяся специфичность связывания направлена на вирус, например, RSV. В других вариантах осуществления специфичность связывания направлена на человеческую мишень, обладающую терапевтической пользой в рамках терапии с помощью IL2. В определенных вариантах осуществления нацеливание

специфичности связывания иммуноглобулина представляет дополнительный терапевтически благоприятный эффект компонента IL2. В определенных вариантах осуществления специфичность связывания иммуноглобулина со своей мишенью представляет синергическую активность с IL2.

[00127] В еще некоторых других вариантах осуществления специфичность связывания иммуноглобулина снижена на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, или 100% в результате прививания молекулы IL2.

[00128] Предусмотренные белки на основе антител с привитым цитокином содержат молекулу IL2, привитую на область, определяющую комплементарность (CDR), VH или VL. В некоторых вариантах осуществления последовательность IL2 характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления молекула IL2 содержит последовательность под SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления молекула IL2 состоит из последовательности под SEQ ID NO:4.

[00129] Предусмотренные белки на основе антител с привитым цитокином содержат молекулу IL2, привитую на область, определяющую комплементарность (CDR), VH или VL. В некоторых вариантах осуществления последовательность IL2 характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления молекула IL2 содержит последовательность под SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления молекула IL2 состоит из последовательности под SEQ ID NO:6.

[00130] В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином придает проиммуномодулирующие свойства, превосходящие свойства человеческого IL2, рекомбинантного человеческого IL2, Proleukin® или IL2, слитого с Fc. Белок на основе антитела с привитым цитокином придает увеличенную активность CD8+ эффекторным Т-клеткам, обеспечивая при этом сниженную активность Treg, по сравнению с человеческим IL2, рекомбинантным человеческим IL2, Proleukin® или IL2, слитым с Fc.

[00131] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антител с привитым цитокином содержат модифицированный иммуноглобулин IgG, имеющий модифицированный Fc, придающий модифицированную эффекторную функцию. В определенных вариантах осуществления модифицированная Fc-область содержит мутацию, выбранную из одной или нескольких из D265A, P329A, P329G, N297A, L234A и L235A. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь иммуноглобулина может содержать мутацию или комбинацию мутаций, придающие сниженную эффекторную функцию, выбранные из любой из D265A, P329A, P329G, N297A, D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A, и P329G/L234A/L235A.

[00132] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антител с

привитым цитокином содержат (i) вариабельную область тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью тяжелой цепи под SEQ ID NO:19, и (ii) вариабельную область легкой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью легкой цепи под SEQ ID NO:35. Цепь иммуноглобулина относится к классу IgG, выбранному из IgG1, IgG2 или IgG4. В определенных вариантах осуществления иммуноглобулин обязательно содержит мутацию или комбинацию мутаций, придающие сниженную эффекторную функцию, выбранные из любой из D265A, P329A, P329G, N297A, D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A, и P329G/L234A/L235A.

[00133] В некоторых вариантах осуществления белки на основе антител с привитым цитокином содержат (i) вариабельную область тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью тяжелой цепи под SEQ ID NO:51, и (ii) вариабельную область легкой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью легкой цепи под SEQ ID NO:67. Цепь иммуноглобулина относится к классу IgG, выбранному из IgG1, IgG2 или IgG4. В определенных вариантах осуществления иммуноглобулин обязательно содержит мутацию или комбинацию мутаций, придающие сниженную эффекторную функцию, выбранные из любой из D265A, P329A, P329G, N297A, D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A, и P329G/L234A/L235A.

Сконструированные и модифицированные белки на основе антител с привитым цитокином

[00134] В определенных вариантах осуществления конструкции на основе антител с привитым цитокином создают посредством прививания последовательности IL2 на CDR-область иммуноглобулинового остова. Как тяжелые, так и легкие цепи иммуноглобулинов получают с целью создания конечных привитых белков на основе антител. Белки на основе антител с привитым цитокином придают предпочтительную терапевтическую активность CD8+ эффекторным Т-клеткам, и белки на основе антител с привитым цитокином характеризуются сниженной активностью Treg по сравнению с нативным или рекомбинантным человеческим IL2 (rhIL2 или Proleukin®) или IL2, слитым с Fc.

[00135] С целью конструирования белков на основе антител с привитым цитокином последовательности IL2, содержащие определенные мутации (SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6), вставляют в CDR-петлю остовного белка, представляющего собой цепь иммуноглобулина. Привитые конструкции можно получить с использованием любой из

разнообразных известных последовательностей иммуноглобулинов, которые использовались в клинических условиях, известных последовательностей иммуноглобулинов, которые находятся в настоящее время на стадии изыскания и/или клинической разработки, последовательностей человеческих антител зародышевого типа, а также последовательностей цепей иммуноглобулинов новых антител. Конструкции получали с помощью стандартных технологий молекулярной биологии путем использования рекомбинантной ДНК, кодирующей соответствующие последовательности. Последовательности IL2 в иллюстративном остоле, называемом GFTX3b, отображены в таблице 2. Точки вставки выбирали таким образом, чтобы они представляли собой срединную точку петли, на основании доступных данных структурного или гомологичного моделирования, но в то же время точки вставки можно скорректировать так, чтобы они находились около N- или C-конца CDR-петли.

[00136] Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены антитела или их фрагменты, которые специфично связываются с низкоаффинным рецептором IL2, содержащие белок IL2, рекомбинантным путем вставленный в гетерологичный белок или полипептид, представляющий собой антитело, с созданием привитых белков. В частности, в настоящем изобретении предусмотрены привитые белки, содержащие антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, описанного в данном документе, или любой другой соответствующий остоновый полипептид антитела (например, иммуноглобулиновый белок, представляющий собой полное антитело, Fab-фрагмент, Fc-фрагмент, Fv-фрагмент, F(ab)2-фрагмент, VH-домен, CDR VH, VL-домен, CDR VL и т. д.) и гетерологичный белок, полипептид или пептид, представляющий собой цитокин, например, IL2. Способы слияния или конъюгирования белков, полипептидов или пептидов с антителом или фрагментом антитела известны из уровня техники. См., например, патенты США №№ 5336603, 5622929, 5359046, 5349053, 5447851 и 5112946; европейские патенты №№ EP 307434 и EP 367166; международные публикации №№ WO 96/04388 и WO 91/06570; Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; и Vil et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341. Кроме того, белки на основе антител с привитым цитокином можно создавать с помощью методик перетасовки генов, перетасовки мотивов, перетасовки экзонов и/или перетасовки кодонов (в совокупности называемых "перетасовкой ДНК"). Перетасовку ДНК можно использовать для получения привитых белковых конструкций и/или для изменения активности антител или их фрагментов (например, антител или их фрагментов с более высокими значениями аффинности и более низкими значениями скорости диссоциации). См., в целом патенты США №№ 5605793, 5811238, 5830721, 5834252 и 5837458; Patten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Narayana, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson, et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76; и Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-313. Антитела или их фрагменты или кодируемые антитела или их фрагменты можно изменять путем воздействия на них случайного мутагенеза с помощью ПЦР с внесением ошибок, случайной вставки нуклеотидов или

других способов до проведения рекомбинации. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент, которые специфично связываются с антигенным белком, представляющим интерес, может быть подвергнут рекомбинации с одним или несколькими компонентами, мотивами, сегментами, частями, доменами, фрагментами и т. д. одной или нескольких гетерологичных молекул цитокинов, например, IL2, для получения белков на основе антител с привитым цитокином, предусмотренных в данном документе.

[00137] Fab антитела содержит шесть CDR-петель - 3 в легкой цепи (CDRL1, CDRL2, CDRL3) и 3 в тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2, CDRH3), которые могут выступать в качестве потенциальных участков вставки белка цитокина. Структурные и функциональные аспекты принимают во внимание с целью определения того, в какую(какие) CDR-петлю(петли) следует вставить цитокин. Поскольку размер и конформация CDR-петель в различных антителах значительно варьируются, оптимальная CDR для вставки может быть определена эмпирически для каждой конкретной комбинации антитело/белок. Кроме того, поскольку белок цитокин будет вставлен в CDR-петлю, это может наложить дополнительные ограничения на структуру белка цитокина, как обсуждается в примере 1.

[00138] CDR цепей иммуноглобулинов определяют с помощью хорошо известных систем нумерации, известных из уровня техники, в том числе описанных в данном документе. Например, CDR были идентифицированы и определены с помощью (1) применения системы нумерации, описанной в Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схемы нумерации "по Kabat"), NIH publication No. 91-3242; и (2) Chothia, см. Al-Lazikani et al., (1997) "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", J.Mol.Biol. 273:927-948. В случае идентифицированных аминокислотных последовательностей CDR, имеющих длину менее 20 аминокислот, одна или несколько консервативных замен аминокислотных остатков могут быть допустимыми, если при этом все еще сохраняются желаемые специфичное связывание и/или агонистическая активность.

[00139] Белок на основе антитела с привитым цитокином также можно получить с использованием антитела, имеющего одну или несколько из последовательностей CDR и/или VH и/или VL, показанных в данном документе (например, в таблице 2), в качестве исходного материала для конструирования модифицированного белка на основе антитела с привитым цитокином, который может иметь измененные свойства по сравнению с исходным привитым белком на основе антитела. В качестве альтернативы, любые известные последовательности антител можно использовать в качестве остова для конструирования модифицированного белка на основе антитела с привитым цитокином. Например, любое известное антитело, используемое в клинической практике, можно использовать в качестве остова исходного материала для получения привитого белка на основе антитела. Известные антитела и соответствующие последовательности

иммуноглобулинов включают в себя, например, паливизумаб, алирокумаб, меполизумаб, нецитумумаб, ниволумаб, динутуксимаб, секукинумаб, эволокумаб, блинатумомаб, пембролизумаб, рамуцирумаб, ведолизумаб, силтуксимаб, обинутузумаб, трастузумаб, раксибакумаб, пертузумаб, белимумаб, ипилимумаб, деносумаб, тоцилизумаб, офатумумаб, канакинумаб, голимумаб, устекинумаб, цертолизумаб, катумаксомаб, экулизумаб, ранибизумаб, панитумумаб, натализумаб, бевацизумаб, цетуксимаб, эфализумаб, омализумаб, тозитумомаб, ибритумомаб тиуксетан, адалимумаб, алемтузумаб, гемтузумаб, инфликсимаб, базиликсимаб, даклизумаб, ритуксимаб, абциксимаб, муромонаб или их модификации. Известные антитела и последовательности иммуноглобулинов также включают в себя последовательности антител зародышевого типа. Последовательности каркасных областей можно получить из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных литературных источников, которые содержат последовательности генов антител зародышевого типа. Например, последовательности ДНК зародышевого типа для генов варибельной области человеческих тяжелой и легкой цепей можно найти в базе данных человеческих последовательностей зародышевого типа "VBase", а также в Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No 91-3242; Tomlinson, I. M., et al., 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798; и Cox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836. В еще некоторых других примерах антитела и соответствующие последовательности иммуноглобулинов из других известных структур, которые могут находиться на стадии раннего изыскания и/или разработки лекарственных средств, можно аналогичным образом адаптировать в качестве исходного материала для конструирования модифицированного белка на основе антитела с привитым цитокином.

[00140] Можно использовать широкий спектр каркасов или остовов антител/иммуноглобулинов при условии, что полученный в результате полипептид содержит по меньшей мере одну связывающую область, которая приспособлена для включения цитокина (например, IL2). Такие каркасы или остовы включают в себя 5 основных идиотипов человеческих иммуноглобулинов или их фрагментов и включают в себя иммуноглобулины от других видов животных, предпочтительно имеющие гуманизированные и/или человеческие составляющие. Специалисты в данной области продолжают проводить изыскание и разработку новых антител, каркасов, остовов и фрагментов.

[00141] Антитела можно создавать с помощью способов, которые известны из уровня техники. Для получения моноклональных антител можно применять любую методику, известную из уровня техники (см., например, Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4:72 (1983); Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96. Alan R. Liss, Inc. 1985). Методики получения одноцепочечных антител (патент США № 4946778) можно адаптировать для получения антител с целью применения в белках на основе антител с привитым цитокином. Кроме того, трансгенных мышей или другие организмы, такие как другие млекопитающие,

можно использовать для экспрессии и идентификации приматизированных или гуманизированных или человеческих антител. В качестве альтернативы, технологию фагового дисплея можно применять для идентификации антител и гетеромерных Fab-фрагментов, которые специфично связываются с выбранными антигенами, для применения в белках на основе антител с привитым цитокином (см., например, McCafferty et al., выше; Marks et al., *Biotechnology*, 10:779-783, (1992)).

[00142] Способы приматизации или гуманизации антител, отличных от человеческих, хорошо известны из уровня техники. Как правило, приматизированное или гуманизированное антитело имеет один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, не относящегося к примату или не относящегося к человеку. Такие аминокислотные остатки, отличные от остатков приматов или отличные от человеческих остатков, часто называют импортированными остатками, которые в типичном случае взяты из импортированного переменного домена. Гуманизацию можно выполнять по сути согласно способу Winter и сотрудников (см., например, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science* 239:1534-1536 (1988), и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)) путем замены соответствующих последовательностей человеческого антитела CDR или последовательностями CDR грызунов. Соответственно, такие гуманизированные антитела представляют собой химерные антитела (патент США № 4816567), в которых существенно меньшая часть, чем интактный человеческий переменный домен, была заменена соответствующей последовательностью из вида, отличного от человека. На практике приматизированные или гуманизированные антитела в типичном случае представляют собой антитела приматов или человеческие антитела, в которых некоторые остатки областей, определяющих комплементарность ("CDR"), и, возможно, некоторые остатки каркасных областей ("FR") заменены остатками из аналогичных участков у вида, из которого они происходят (например, из антител грызунов), для придания специфичности связывания.

[00143] В качестве альтернативы или дополнительно, способ замещения переменной области антитела, отличного от человеческого, человеческой переменной областью в антителе *in vivo* с сохранением тех же или обеспечением лучших характеристик связывания по сравнению с таковыми у антитела, отличного от человеческого, можно использовать для превращения антител, отличных от человеческих, в сконструированные человеческие антитела. См., например, публикацию заявки на патент США № 20050008625, публикацию заявки на патент США № 2005/0255552. В качестве альтернативы, библиотеки человеческих V-сегментов можно создать путем последовательного замещения кассетой, в ходе которого только часть V-сегмента эталонного антитела изначально замещают библиотекой человеческих последовательностей; и идентифицированные человеческие "кассеты", обеспечивающие связывание в окружении остаточных аминокислотных последовательностей эталонного антитела, затем подвергают рекомбинации в ходе второго скрининга библиотек с

созданием полностью человеческих V-сегментов (см. публикацию заявки на патент США № 2006/0134098).

[00144] Различные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты для применения при получении белков на основе антител с привитым цитокином можно получить путем ферментативной или химической модификации интактных антител, или синтезировать *de novo* с помощью технологий рекомбинантной ДНК (например, одноцепочечный Fv), или идентифицировать с помощью библиотек фагового дисплея (см., например, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554, 1990). Например, миниантитела можно получить с помощью способов, описанных в уровне техники, например, Vaughan and Sollazzo, *Comb. Chem. High Throughput Screen* 4:417-30 2001. Биспецифические антитела можно получить с помощью разнообразных способов, включающих в себя прививание гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992). Одноцепочечные антитела можно идентифицировать с помощью библиотек фагового дисплея или библиотек рибосомного дисплея, библиотек перетасованных генов. Такие библиотеки можно сконструировать из синтетических, полусинтетических или нативных и иммунокомпетентных источников. Выбранные последовательности иммуноглобулинов, таким образом, можно использовать при получении белковых конструкций на основе антител с привитым цитокином, предусмотренных в данном документе.

[00145] Антитела, антигенсвязывающие молекулы или белки на основе антител с привитым цитокином для применения в настоящем изобретении дополнительно включают в себя биспецифические антитела. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две различные пары тяжелая/легкая цепь и два различных связывающих участка. Другие антигенсвязывающие фрагменты или части антител включают в себя бивалентные scFv (диатела), биспецифические scFv-антитела, в которых молекула антитела распознает два различных эпитопа, одиночные связывающие домены (dAb) и миниантитела. Выбранные последовательности иммуноглобулинов, таким образом, можно использовать при получении белковых конструкций на основе антител с привитым цитокином, предусмотренных в данном документе.

[00146] Антигенсвязывающие фрагменты антител, например, Fab-фрагмент, scFv, можно применять в качестве строительных блоков для конструирования белков на основе антител с привитым цитокином, и они могут необязательно включать в себя поливалентные форматы. В некоторых вариантах осуществления такие поливалентные молекулы содержат константную область антитела (например, Fc).

[00147] Белки на основе антител с привитым цитокином можно конструировать путем модификации одного или нескольких остатков в одной или обеих переменных областях (т. е. VH и/или VL) антитела, например, в одной или нескольких CDR-областях, и такие адаптированные последовательности VH- и/или VL-областей используются для

прививания цитокина или для подготовки к прививанию цитокина. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно посредством аминокислотных остатков, которые расположены в шести областях, определяющих комплементарность (CDR), тяжелой и легкой цепей. По этой причине аминокислотные последовательности в пределах CDR являются более разнообразными у отдельных антител, чем последовательности за пределами CDR. Поскольку последовательности CDR отвечают за большинство взаимодействий антитело-антиген, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства конкретного антитела, посредством конструирования векторов экспрессии, которые содержат последовательности CDR из конкретного антитела, привитые на последовательности каркасных областей из другого антитела с другими свойствами (см., например, Riechmann, L. et al., 1998 Nature 332:323-327; Jones, P. et al., 1986 Nature 321:522-525; Queen, C. et al., 1989 Proc. Natl. Acad., U.S.A. 86:10029-10033; патент США № 5225539 авторства Winter и патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 авторства Queen et al.). В определенных случаях благоприятным является осуществление мутации остатков в пределах каркасных областей для сохранения или повышения антигенсвязывающей способности антитела (см., например, патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 авторства Queen et al.).

[00148] В некоторых аспектах мутация аминокислотных остатков в CDR1-, CDR2- и/или CDR3-областях VH и/или VL для улучшения таким образом одного или нескольких свойств связывания (например, аффинности) антитела, представляющего интерес, известная как "созревание аффинности", может быть благоприятной, например, для оптимизации связывания антигена антителом с учетом того, что оно представлено в качестве составной части белка с привитым цитокином. Для введения мутации(мутаций) можно осуществлять сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез, и эффект в отношении связывания антитела или другого функционального свойства, представляющего интерес, можно оценивать в анализах *in vitro* или *in vivo*, описанных в данном документе, и/или альтернативных или дополнительных анализах, известных из уровня техники. Можно вводить консервативные модификации. Мутации могут представлять собой замены, добавления или делеции аминокислот. Более того, в типичном случае изменяют не более одного, двух, трех, четырех или пяти остатков в пределах CDR-области.

[00149] Сконструированные антитела или фрагменты антител включают в себя антитела или их фрагменты, в которых были осуществлены модификации остатков каркасных областей в пределах VH и/или VL, например, для улучшения свойств антитела. В некоторых вариантах осуществления такие модификации каркасных областей осуществляют для уменьшения иммуногенности антитела. Например, один подход заключается в изменении одного или нескольких остатков каркасной области на соответствующую последовательность зародышевого типа. Более конкретно, антитело, которое подверглось соматической мутации, может содержать остатки каркасной области,

которые отличаются от последовательности зародышевого типа, из которой происходит антитело. Такие остатки можно идентифицировать посредством сравнения последовательностей каркасных областей антитела с последовательностями зародышевого типа, из которых происходит антитело. Для возвращения последовательностей каркасных областей в их конфигурацию зародышевого типа можно вводить "обратные" соматические мутации с восстановлением последовательности зародышевого типа посредством, например, сайт-направленного мутагенеза. Дополнительная модификация каркасной области предусматривает мутацию одного или нескольких остатков в пределах каркасной области или даже в пределах одной или нескольких CDR-областей для удаления Т-клеточных эпитопов со снижением тем самым потенциальной иммуногенности антитела. Данный подход также называется "деиммунизацией" и более подробно описан в публикации заявки на патент США № 20030153043 авторства Carr et al.

[00150] Константные области антител или фрагментов антител, используемых для получения белка на основе антитела с привитым цитокином, могут в соответствии с необходимостью относиться к любому типу или подтипу и могут быть выбраны так, чтобы они происходили из вида субъекта, подлежащего лечению с помощью способов по настоящему изобретению (например, человека, примата, отличного от человека, или другого млекопитающего, например, сельскохозяйственного млекопитающего (например, лошади, овцы, быка, свиньи, верблюда), домашнего млекопитающего (например, собаки, кошки) или грызуна (например, крысы, мыши, хомяка, кролика)). В некоторых вариантах осуществления антитела, используемые в белках на основе антител с привитым цитокином, сконструированы с целью создания гуманизированных антител или антител Humaneered®. В некоторых вариантах осуществления антитела, используемые в белках на основе антител с привитым цитокином, представляют собой человеческие антитела. В некоторых вариантах осуществления изотип константной области антител представляет собой IgG, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. В определенных вариантах осуществления изотип константной области представляет собой IgG₁. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антител с привитым цитокином содержат IgG. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антител с привитым цитокином содержат Fc IgG1. В некоторых вариантах осуществления белки на основе антител с привитым цитокином содержат Fc IgG2.

[00151] В качестве дополнения или альтернативы к модификациям, осуществляемым в пределах каркасных областей или CDR-областей, антитела или фрагменты антител, используемые при получении белков на основе антител с привитым цитокином, могут быть сконструированы таким образом, чтобы они включали модификации в пределах Fc-области, в типичном случае для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как, например, период полувыведения из сыворотки крови, фиксация комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, антитело, фрагмент антитела или белок на основе антитела с привитым цитокином могут быть

модифицированы химическим путем (например, к антителу могут быть присоединены один или несколько химических фрагментов) или быть модифицированы с изменением характера их гликозилирования, опять-таки для изменения одного или нескольких функциональных свойств белка на основе антитела с привитым цитокином.

[00152] В одном варианте осуществления шарнирную область СН1 модифицируют таким образом, что число цистеиновых остатков в шарнирной области изменяется, например, увеличивается или уменьшается. Например, данный подход дополнительно описан в патенте США № 5677425 авторства Bodmer et al., в котором число цистеиновых остатков в шарнирной области СН1 изменяют, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для увеличения или уменьшения стабильности белка на основе антитела с привитым цитокином. В другом варианте осуществления область Fc-шарнир антитела подвергают мутации для изменения биологического периода полувыведения белка на основе антитела с привитым цитокином. Более конкретно, одну или несколько аминокислотных мутаций вводят в пограничную область между доменами СН2-СН3 фрагмента Fc-шарнир, вследствие чего белок на основе антитела с привитым цитокином характеризуется нарушенным связыванием с белком А стафилококка (SpA) по сравнению со связыванием нативного домена Fc-шарнир с SpA. Данный подход более подробно описан в патенте США № 6165745 авторства Ward et al.

[00153] В настоящем изобретении предусмотрены белки на основе антител с привитым цитокином, которые специфично связываются с низкоаффинным рецептором IL2, которые характеризуются удлиненным периодом полувыведения *in vivo*. В другом варианте осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином модифицируют для увеличения его биологического периода полувыведения. Возможны различные подходы. Белки на основе антител с привитым цитокином, характеризующиеся увеличенным периодом полувыведения *in vivo*, также можно создать путем введения одной или нескольких аминокислотных модификаций (т. е. замен, вставок или делеций) в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно Fc-фрагмент или фрагмент шарнир-Fc-домен). Например, можно вводить одну или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375 авторства Ward. См., например, международную публикацию № WO 98/23289; международную публикацию № WO 97/34631 и патент США № 6277375. В качестве альтернативы, для увеличения биологического периода полувыведения белок на основе антитела с привитым цитокином изменяют в пределах СН1- или CL-области таким образом, чтобы он содержал эпитоп связывания рецептора реутилизации, полученный из двух петель СН2-домена Fc-области IgG, как описано в патентах США №№ 5869046 и 6121022 авторства Presta et al. В еще нескольких других вариантах осуществления Fc-область изменяют путем замещения по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком для изменения эффекторных функций белка на основе антитела с привитым цитокином. Например, одну или несколько аминокислот можно заместить другим аминокислотным остатком таким образом, чтобы белок на основе

антитела с привитым цитокином характеризовался измененной аффинностью в отношении эффекторного лиганда, но сохранял антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность в отношении которого изменяют, может представлять собой, например, Fc-рецептор (FcR) или компонент C1 системы комплемента. Данный подход подробно описан, например, в патентах США №№ 5624821 и 5648260, оба авторства Winter et al.

[00154] В другом варианте осуществления одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков, можно заместить другим аминокислотным остатком таким образом, чтобы белок на основе антитела с привитым цитокином характеризовался измененным связыванием C1q и/или пониженной или устраненной комплементзависимой цитотоксичностью (CDC). Данный подход более подробно описан в патенте США № 6194551 авторства Idusogie et al.

[00155] Белки на основе антител с привитым цитокином, содержащие такие мутации, опосредуют сниженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимую цитотоксичность (CDC) или не опосредуют ее. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки L234 и L235 в константной области IgG1 заменены на Ala234 и Ala235. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток N267 в константной области IgG1 заменен на Ala267.

[00156] В другом варианте осуществления один или несколько аминокислотных остатков изменяют для изменения таким образом способности белка на основе антитела с привитым цитокином к фиксации комплемента. Этот подход дополнительно описан в публикации согласно PCT WO 94/29351 авторства Bodmer et al.

[00157] В еще одном варианте осуществления Fc-область модифицируют для увеличения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для увеличения аффинности белка на основе антитела с привитым цитокином в отношении Fcγ-рецептора посредством модификации одной или нескольких аминокислот. Этот подход дополнительно описан в публикации согласно PCT WO 00/42072 авторства Presta. Более того, связывающие участки на человеческом IgG1 для FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn были картированы, и были описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields, R. L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

[00158] В еще одном варианте осуществления модифицируют характер гликозилирования белка на основе антитела с привитым цитокином. Например, можно получить агликозилированный белок на основе антитела с привитым цитокином (т. е. белок на основе антитела с привитым цитокином, у которого отсутствует гликозилирование). Характер гликозилирования можно изменить, например, для увеличения аффинности антитела в отношении "антигена". Такие модификации углеводов можно осуществлять, например, посредством изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в пределах последовательности антитела. Например, можно произвести одну или несколько аминокислотных замен, которые приводят к устранению одного или нескольких сайтов гликозилирования в каркасных областях вариабельной области с

устранением тем самым гликозилирования в этом сайте. Такое агликозилирование может увеличивать аффинность антитела в отношении антигена. Такой подход подробно описан, например, патентах США №№ 5714350 и 6350861 авторства Co et al.

[00159] В качестве дополнения или альтернативы можно получить белок на основе антитела с привитым цитокином, который характеризуется измененным типом гликозилирования, такой как гипофукозилированный белок на основе антитела с привитым цитокином, имеющий уменьшенное количество фукозильных остатков, или антитело, имеющее увеличенное содержание структур GlcNAc в точках ветвления. Было продемонстрировано, что такой измененный характер гликозилирования увеличивает способность антител к антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Такие модификации углеводов можно осуществлять, например, посредством экспрессии белка на основе антитела с привитым цитокином в клетке-хозяине с измененным аппаратом гликозилирования. Клетки с измененным аппаратом гликозилирования были описаны в уровне техники, и их можно применять в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируются рекомбинантные белки на основе антител с привитым цитокином, с получением таким образом белков на основе антител с привитым цитокином с измененным характером гликозилирования. Например, в EP 1176195 авторства Hang et al. описывается линия клеток с функциональным нарушением гена FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, благодаря чему белки на основе антител с привитым цитокином, экспрессируемые в такой линии клеток, демонстрируют гипофукозилирование. В публикации согласно PCT WO 03/035835 авторства Presta описан вариант линии клеток CHO, клетки Lec13, с пониженной способностью к прикреплению фукозы к углеводам, связанным с Asn(297), что также приводит к гипофукозилированию белков на основе антител с привитым цитокином, экспрессируемых в такой клетке-хозяине (см. также Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). В публикации согласно PCT WO 99/54342 авторства Umana et al. описываются линии клеток, сконструированные для экспрессии гликозилтрансфераз, модифицирующих гликопротеины (например, бета-(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), благодаря чему белки на основе антител с привитым цитокином, экспрессируемые в сконструированных линиях клеток, характеризуются увеличенным содержанием структур GlcNAc в точках ветвления, что приводит к увеличению активности ADCC у антител (см. также Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180).

[00160] В некоторых вариантах осуществления один или несколько доменов или областей белка на основе антитела с привитым цитокином соединены с помощью линкера, например, пептидного линкера, такого как линкеры, хорошо известные из уровня техники (см., например, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Длина пептидного линкера может варьироваться, например, линкер может иметь длину 1-100 аминокислот, в типичном случае линкер имеет длину от пяти до 50 аминокислот, например, имеет длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39,

40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, или 50 аминокислот.

[00161] В некоторых вариантах осуществления П2 привит на последовательность CDR необязательно с одной или несколькими пептидными линкерными последовательностями. В определенных вариантах осуществления один или несколько пептидных линкеров независимо выбраны из последовательности $(\text{Gly}_n\text{-Ser})_m$ (SEQ ID NO: 71), последовательности $(\text{Gly}_n\text{-Ala})_m$ (SEQ ID NO: 72) или любой комбинации последовательностей $(\text{Gly}_n\text{-Ser})_m/(\text{Gly}_n\text{-Ala})_m$ (SEQ ID NO: 71-72), где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 5, а каждое m независимо представляет собой целое число от 0 до 10. Примеры линкеров включают в себя без ограничения линкеры на основе глицина или линкеры Gly/Ser G/S, такие как $(\text{G}_m\text{S})_n$, где n представляет собой положительное целое число, равное 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10, и m представляет собой целое число, равное 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 (SEQ ID NO: 73). В определенных вариантах осуществления один или несколько линкеров содержат повторы G_4S (SEQ ID NO: 74), например, линкер Gly-Ser $(\text{G}_4\text{S})_n$, где n представляет собой положительное число, равное или большее 1 (SEQ ID NO: 74). Например, $n=1, n=2, n=3, n=4, n=5$ и $n=6, n=7, n=8, n=9$ и $n=10$. В некоторых вариантах осуществления Ser может быть замещен Ala, например, в линкерах G/A, таких как $(\text{G}_m\text{A})_n$, где n представляет собой положительное целое число, равное 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10, и m представляет собой целое число, равное 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 (SEQ ID NO: 75). В определенных вариантах осуществления один или несколько линкеров содержат повторы G_4A (SEQ ID NO: 76), $(\text{G}_4\text{A})_n$, где n представляет собой положительное число, равное или большее 1 (SEQ ID NO: 76). Например, $n=1, n=2, n=3, n=4, n=5$ и $n=6, n=7, n=8, n=9$ и $n=10$. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит несколько повторов линкеров. В других вариантах осуществления линкер содержит комбинации и множества из G_4S (SEQ ID NO: 74) и G_4A (SEQ ID NO: 76).

[00162] Другие примеры линкеров включают в себя линкеры, в основе которых лежат гибкие линкерные последовательности, которые встречаются в природе в антителах, для сведения к минимуму иммуногенности, обусловленной линкерами и сочленениями. Например, в молекулярной структуре антитела существует природная гибкая связь между переменным доменом и константным CH1-доменом. Данная природная связь содержит примерно 10-12 аминокислотных остатков, составляемых 4-6 остатками от C-конца V-домена и 4-6 остатками от N-конца CH1-домена. В белках на основе антител с привитым цитокином, например, могут использоваться линкеры, в состав которых включены концевые 5-6 аминокислотных остатков или 11-12 аминокислотных остатков CH1 в качестве линкера. N-концевые остатки CH1-домена, в частности, первые 5-6 аминокислотных остатков, принимают конформацию петли без устойчивой вторичной структуры и, таким образом, могут выступать в качестве гибкого линкера. N-концевые остатки CH1-домена представляют собой природное удлинение переменных доменов, поскольку они представляют собой часть Ig последовательностей, и поэтому в значительной степени сводят к минимуму любую иммуногенность,

потенциально обусловленную линкерами и сочленениями. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит модифицированную пептидную последовательность на основе последовательности шарнирной области.

[00163] Кроме того, белки на основе антител с привитым цитокином могут содержать маркерные последовательности, такие как пептид для облегчения очистки белков на основе антител с привитым цитокином. В предпочтительных вариантах осуществления маркерная аминокислотная последовательность представляет собой гексагистидиновый пептид (SEQ ID NO: 78), такой как, среди прочих, метка, представленная в векторе pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Чатсворт, Калифорния, 91311), многие из которых являются коммерчески доступными. Как описано в Gents et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, например, гексагистидин (SEQ ID NO: 78) обеспечивает удобную очистку привитого белка. Другие пептидные метки, применимые для очистки, включают без ограничения гемагглютининовую ("HA") метку, которая соответствует эпитопу, полученному из белка гемагглютинина вируса гриппа (Wilson et al., 1984, Cell 37:767), и метку "FLAG".

[00164] Антитела также могут быть прикреплены к твердым подложкам, которые являются особенно применимыми для иммунологических анализов или очистки антигенамишени. Такие твердые подложки включают без ограничения стекло, целлюлозу, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен.

Анализы для определения активности белков на основе антител с привитым цитокином

[00165] Анализы для идентификации белков на основе антител с привитым цитокином известны из уровня техники и описаны в данном документе. Агонистические белки на основе антител с привитым цитокином связываются с низкоаффинным рецептором IL2 и способствуют внутриклеточной передаче сигнала, приводящей к пролиферации CD8⁺ эффекторных Т-клеток, а также другим иммуностимулирующим эффектам, индуцируют ее, стимулируют ее.

[00166] Связывание белков на основе антител с привитым цитокином с низкоаффинным рецептором IL2 можно определить с помощью любого способа, известного из уровня техники. Например, связывание с низкоаффинным рецептором IL2 можно определить с помощью известных методик, в том числе без ограничения ELISA, вестерн-блоттинга, поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, на BIAcore) и проточной цитометрии.

[00167] Внутриклеточную передачу сигнала через низкоаффинный рецептор IL2 можно измерить с помощью любого способа, известного из уровня техники. Например, активация низкоаффинного рецептора IL2 с помощью IL2 способствует активации STAT5 и передаче сигнала через него. Способы измерения активации STAT5 являются стандартными в данной области техники (например, определение статуса фосфорилирования белка STAT5, анализы репортерных генов, анализы нисходящей передачи сигнала и т. д.). Активация с участием низкоаффинного рецептора IL2

обеспечивает размножение CD8⁺ эффекторных Т-клеток, так что можно анализировать абсолютное количество CD8⁺ эффекторных Т-клеток или соотношение CD8⁺ эффекторных Т-клеток и Treg. Способы измерения пролиферации клеток являются стандартными в данной области техники (например, анализы включения ³H-тимидина, мечение с помощью CFSE). Способы измерения продуцирования цитокинов хорошо известны из уровня техники (например, анализы ELISA, анализы ELISpot). При выполнении анализов *in vitro* тестируемые клетки или надосадочную жидкость культуры тестируемых клеток, приводимые в контакт с белками на основе антител с привитым цитокином, можно сравнивать с контрольными клетками или образцами надосадочной жидкости культуры контрольных клеток, которые не были приведены в контакт с белком на основе антитела с привитым цитокином и/или которые были приведены в контакт с рекомбинантным человеческим IL2 (например, Proleukin®) или слитой молекулой IL2-Fc.

[00168] Активность белков на основе антител с привитым цитокином также можно измерить *ex vivo* и/или *in vivo*. В некоторых аспектах способы измерения активации STAT5 в различных типах клеток *ex vivo* от животных, которые получали лечение белками на основе антител с привитым цитокином, по сравнению с контрольными животными, которые не получали лечение, и/или животными, которые получали лечение аналогичным образом с помощью Proleukin®, можно применять для демонстрации дифференциальной активности агонистических белков на основе антител с привитым цитокином в разных типах клеток. Предпочтительные белки на основе антител с привитым цитокином обладают способностью обеспечивать активацию и размножение CD8⁺ эффекторных Т-клеток. Например, активацию и размножение CD8⁺ Т-клеток *in vivo* можно измерить с помощью любого способа, известного из уровня техники, например, с помощью проточной цитометрии. Предпочтительные агонистические белки на основе антител с привитым цитокином могут быть терапевтически применимыми для предупреждения, ослабления, облегчения или лечения рака, например, меланомы, рака легкого, колоректального рака, рака предстательной железы, рака молочной железы и лимфомы. Эффективность белков на основе антител с привитым цитокином можно определить путем введения терапевтически эффективного количества белка на основе антитела с привитым цитокином субъекту и сравнения субъекта до и после введения белка на основе антитела с привитым цитокином. Эффективность белков на основе антител с привитым цитокином также можно определить путем введения терапевтически эффективного количества белка на основе антитела с привитым цитокином тестируемому субъекту и сравнения тестируемого субъекта с контрольным субъектом, которому не вводили антитело, и/или сравнения с субъектом, который получал лечение аналогичным образом с помощью Proleukin®.

Полинуклеотиды, кодирующие белки на основе антител с привитым цитокином

[00169] В другом аспекте предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие белковые тяжелые и легкие цепи белков на основе антител с привитым

цитокином. Белки на основе антител с привитым цитокином можно получить с помощью любых способов, известных из уровня техники, в том числе без ограничения рекомбинантной экспрессии, химического синтеза и ферментативного расщепления тетрамерных антител. Рекомбинантная экспрессия может осуществляться в любых подходящих клетках-хозяевах, известных из уровня техники, например, в клетках-хозяевах, представляющих собой клетки млекопитающих, бактериальных клетках-хозяевах, дрожжевых клетках-хозяевах, клетках-хозяевах, представляющих собой клетки насекомых, и т. д.

[00170] В данном документе предусмотрены полинуклеотиды, которые кодируют переменные области, приведенные в качестве примеров под любой из SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:52 и SEQ ID NO:68.

[00171] В настоящем изобретении, таким образом, предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие полипептидные легкие и/или тяжелые цепи белков на основе антител с привитым цитокином, описанных в данном документе, например, полинуклеотиды, кодирующие переменные области или сегменты легкой или тяжелой цепей, содержащие области, определяющие комплементарность, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий переменные области тяжелой цепи, содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:52. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий переменные области легкой цепи, содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO:36 и SEQ ID NO:68.

[00172] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом под SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом под SEQ ID NO:38.

[00173] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом под SEQ ID NO:54. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом, выбранным из SEQ ID

NO:70.

[00174] Полинуклеотиды могут кодировать только последовательность вариабельной области белка на основе антитела с привитым цитокином. Они также могут кодировать как вариабельную область, так и константную область белка на основе антитела с привитым цитокином. Некоторые из полинуклеотидных последовательностей кодируют полипептид, который содержит вариабельные области как тяжелой цепи, так и легкой цепи одного из белков на основе антител с привитым цитокином. Некоторые другие полинуклеотиды кодируют два полипептидных сегмента, которые являются по существу идентичными вариабельным областям тяжелой цепи и легкой цепи соответственно одного из белков на основе антител с привитым цитокином.

[00175] В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты содержат ДНК. В других вариантах осуществления полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты содержат РНК, которая может быть однонитевой или двухнитевой.

[00176] В некоторых вариантах осуществления предусмотрена рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновые кислоты, кодирующие одну или несколько цепей иммуноглобулиновых белков в белке на основе антитела с привитым цитокином и необязательно сигналы секреции. В определенных вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин содержит вектор, кодирующий одну цепь иммуноглобулинового белка и сигналы секреции. В других определенных вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин содержит один или несколько векторов, кодирующих две цепи иммуноглобулиновых белков в белке на основе антитела с привитым цитокином и сигналы секреции. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин содержит один вектор, кодирующий две цепи иммуноглобулиновых белков в белке на основе антитела с привитым цитокином и сигналы секреции. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин содержит два вектора, один из которых кодирует тяжелую цепь иммуноглобулинового белка, а другой кодирует легкую цепь иммуноглобулинового белка в белке на основе антитела с привитым цитокином, при этом каждая из них содержит сигналы секреции. Рекомбинантная клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую или эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин относится к линии эукариотических клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин относится к линии клеток млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления линия клеток-хозяев представляет собой линию клеток СНО для продуцирования антител.

[00177] Кроме того, предусмотрены способы получения белков на основе антител с привитым цитокином. В некоторых вариантах осуществления способ включает стадии (i) культивирования клетки-хозяина, содержащей один или несколько векторов, кодирующих цепи иммуноглобулиновых белков в белке на основе антитела с привитым цитокином, в условиях, подходящих для экспрессии, образования и секреции белка на основе антитела с привитым цитокином, и (ii) извлечения белка на основе антитела с привитым цитокином.

[00178] Полинуклеотидные последовательности можно получить путем твердофазного синтеза ДНК *de novo* или путем ПЦР-мутагенеза существующей последовательности (например, последовательностей, описанных в данном документе), кодирующей полипептидную цепь белка на основе антитела с привитым цитокином. Прямой химический синтез нуклеиновых кислот можно осуществлять с помощью способов, известных из уровня техники, таких как фосфотриэфирный способ из Narang et al., *Meth. Enzymol.* 68:90, 1979; фосфодиэфирный способ из Brown et al., *Meth. Enzymol.* 68:109, 1979; диэтилфосфорамидитный способ из Beaucage et al., *Tetra. Lett.*, 22:1859, 1981; и способ с использованием твердой подложки из патента США № 4458066. Введение мутаций в полинуклеотидную последовательность с помощью ПЦР можно осуществлять согласно описанному, например, в *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., *Nucleic Acids Res.* 19:967, 1991; и Eckert et al., *PCR Methods and Applications* 1:17, 1991.

[00179] Также в настоящем изобретении предусмотрены векторы экспрессии и клетки-хозяева для продуцирования белков на основе антител с привитым цитокином, описанных выше. Различные векторы экспрессии можно использовать для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих полипептидные цепи иммуноглобулинов или их фрагменты в белках на основе антител с привитым цитокином. Для продуцирования иммуноглобулиновых белков в клетке-хозяине, представляющей собой клетку млекопитающего, можно применять как вирусные, так и невирусные векторы экспрессии. Невирусные векторы и системы включают плазмиды, эписомные векторы, в типичном случае с кассетой экспрессии для экспрессии белка или РНК, а также искусственные человеческие хромосомы (см., например, Harrington et al., *Nat Genet.* 15:345, 1997). Например, невирусные векторы, применимые для экспрессии полинуклеотидов и полипептидов, соответствующих белкам на основе антител с привитым цитокином, в клетках млекопитающих (например, человеческих), включают pThioHis A, B и C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B и C (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), векторы на основе MPSV и многочисленные другие векторы, известные из уровня техники, для экспрессии других белков. Применимые вирусные векторы включают векторы на основе ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, векторы на основе SV40, папилломавируса, вируса Эпштейна-Барр НВР, векторы на основе вируса осповакцины и вируса леса Семлики (SFV). См. Brent et al., выше; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807, 1995; и Rosenfeld et al., *Cell* 68:143, 1992.

[00180] Выбор вектора экспрессии зависит от предполагаемых клеток-хозяев, в которых должен экспрессироваться вектор. В типичном случае векторы экспрессии содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидами, кодирующими иммуноглобулиновый белок в белке на основе антитела с привитым цитокином. В

некоторых вариантах осуществления индуцируемый промотор используют для предотвращения экспрессии вставленных последовательностей в условиях, отличающихся от индуцирующих. Индуцируемые промоторы включают, например, арабинозный промотор, *lacZ*, промотор гена металлотioneина или промотор гена белка теплового шока. Культуры трансформированных организмов можно размножать в неиндуцирующих условиях без смещения в популяции в сторону кодирующих последовательностей, продукты экспрессии которых лучше переносятся клетками-хозяевами. Для эффективной экспрессии цепи иммуноглобулина или ее фрагмента в белках на основе антител с привитым цитокином, помимо промоторов, также могут быть необходимы или желательны другие регуляторные элементы. Эти элементы, как правило, включают в себя инициаторный кодон ATG и смежный сайт связывания рибосомы или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии можно повысить путем включения энхансеров, соответствующих применяемой клеточной системе (см., например, Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20:125, 1994; и Bittner et al., *Meth. Enzymol.*, 153:516, 1987). Например, для увеличения экспрессии в клетках-хозяевах, представляющих собой клетки млекопитающих, можно применять энхансер SV40 или энхансер CMV.

[00181] В векторах экспрессии также может быть предусмотрено положение последовательности сигнала секреции для образования белка на основе антитела с привитым цитокином, который экспортируется из клетки и в культуральную среду. В определенных аспектах вставленные последовательности иммуноглобулинов в белках на основе антител с привитым цитокином связываются с сигнальными последовательностями до включения в вектор. Векторы, подлежащие применению для получения последовательностей, кодирующих переменные домены легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов, иногда также кодируют константные области или их части. Такие векторы обеспечивают возможность экспрессии переменных областей в виде привитых белков с константными областями, что таким образом приводит к продуцированию интактных белков на основе антител с привитым цитокином или их фрагментов. В типичном случае такие константные области являются человеческими.

[00182] Клетки-хозяева, несущие и экспрессирующие цепи белка на основе антитела с привитым цитокином, могут быть прокариотическими либо эукариотическими. *E. coli* является одним прокариотическим хозяином, применимым для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие подходящие для применения микроорганизмы-хозяева включают бацилл, таких как *Bacillus subtilis*, и других представителей *Enterobacteriaceae*, таких как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. Для этих прокариотических хозяев также можно создать векторы экспрессии, которые в типичном случае содержат последовательности для контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, точку начала репликации). Кроме того, будет присутствовать любое количество разнообразных хорошо известных промоторов, как, например, лактозная промоторная система, триптофановая (*trp*)

промоторная система, бета-лактамазная промоторная система или промоторная система из фага лямбда. Как правило, промоторы контролируют экспрессию, необязательно с помощью операторной последовательности, и имеют последовательности сайта связывания рибосомы и т. п. для инициации и завершения транскрипции и трансляции. Для экспрессии полипептидов в белках на основе антител с привитым цитокином также можно использовать другие микроорганизмы, такие как дрожжи. Также можно использовать клетки насекомых в комбинации с бакуловирусными векторами.

[00183] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления для экспрессии и продуцирования полипептидов в белках на основе антител с привитым цитокином используются клетки-хозяева, представляющие собой клетки млекопитающих. Например, они могут относиться к любой линии клеток млекопитающего, содержащей экзогенный вектор экспрессии. Они охватывают любые нормальные мортальные или нормальные или аномальные иммортальные клетки животных или человеческие клетки. Например, был разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, в том числе линии клеток CHO, различные линии клеток Cos, клетки HeLa, линии клеток миеломы, трансформированные В-клетки и гибридомы. Применение тканевой культуры клеток млекопитающих для экспрессии полипептидов в общих чертах обсуждается, например, в Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Векторы экспрессии для клеток-хозяев, представляющих собой клетки млекопитающих, могут содержать последовательности для контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49-68, 1986), и необходимые сайты, несущие информацию для процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминации транскрипции. Эти векторы экспрессии обычно содержат промоторы, полученные из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут быть конститутивными, специфичными для типа клеток, специфичными для стадии развития и/или модулируемыми или регулируемыми. Применимые промоторы включают без ограничения промотор гена металлотioneина, конститутивный главный поздний промотор аденовируса, промотор MMTV, индуцируемый дексаметазоном, промотор SV40, промотор polIII MRP, конститутивный промотор MPSV, промотор CMV, индуцируемый тетрациклином (такой как немедленно-ранний промотор CMV человека), конститутивный промотор CMV и комбинации промотор-энхансер, известные из уровня техники.

[00184] Способы введения векторов экспрессии, содержащих полинуклеотидные последовательности, представляющие интерес, варьируются в зависимости от типа клетки-хозяина. Например, трансфекцию с использованием хлорида кальция обычно используют для прокариотических клеток, тогда как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно применять для других клеток-хозяев (см. в общих чертах Sambrook et al., выше). Другие способы включают, например, электропорацию, обработку фосфатом кальция, трансформацию, опосредованную липосомами, инъекцию и

микроинъекцию, баллистические способы, использование вирусом, иммунолипосом, конъюгатов поликатион:нуклеиновая кислота, "голой" ДНК, искусственных вирионов, прививание на структурный белок VP22 вируса герпеса (Elliot and O'Hare, Cell 88:223, 1997), поглощение ДНК, усиленное химическим средством, и трансдукцию *ex vivo*. Чтобы обеспечить длительное получение рекомбинантных белков с высоким выходом, зачастую будет требоваться стабильная экспрессия. Например, линии клеток, которые стабильно экспрессируют цепи иммуноглобулинов в белках на основе антител с привитым цитокином, можно получить с применением векторов экспрессии, раскрытых в данном документе, которые содержат вирусные точки начала репликации или эндогенные экспрессионные элементы и селективируемый маркерный ген. После введения вектора клетки можно оставить расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде перед их переносом на селективную среду. Задачей селективируемого маркера является придание устойчивости к факторам отбора, и его присутствие обеспечивает возможность роста клеток, которые успешно экспрессируют введенные последовательности, в селективной среде. Пролиферацию устойчивых стабильно трансфицированных клеток можно обеспечивать с применением методик культивирования тканей, соответствующих типу клеток.

Композиции, содержащие белки на основе антител с привитым цитокином

[00185] Предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие белок на основе антитела с привитым цитокином, составленные вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтические композиции необязательно дополнительно содержат другие терапевтические средства, которые являются подходящими для лечения или предупреждения указанного нарушения. Фармацевтически приемлемые носители усиливают или стабилизируют композицию или облегчают получение композиции. Фармацевтически приемлемые носители включают растворители, дисперсионные среды, средства для покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие всасывание средства и т. п., которые являются физиологически совместимыми.

[00186] Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить с помощью разнообразных способов, известных из уровня техники. Путь и/или способ введения варьируются в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительно, чтобы введение представляло собой парентеральное введение (например, выбранное из любого из внутривенного, внутримышечного, внутрибрюшинного, интратекального, внутриартериального или подкожного) или введение осуществлялось вблизи участка-мишени. Фармацевтически приемлемый носитель является подходящим для введения посредством любого одного или нескольких из внутривенного, внутримышечного, внутрибрюшинного, интратекального, внутриартериального, подкожного, интраназального, ингаляционного, спинального или эпидермального введения (например, с помощью инъекции). В зависимости от пути введения активное соединение, например, белок на основе антитела с привитым цитокином, может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут

инактивировать соединение. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена для подкожного введения.

[00187] Белок на основе антитела с привитым цитокином в отдельности или в комбинации с другими подходящими компонентами, может быть получен в виде аэрозольных составов (т. е. они могут быть "небулизированными") для введения путем ингаляции. Аэрозольные составы могут быть помещены в приемлемые сжатые пропелленты, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и т. п.

[00188] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является стерильной и жидкой. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством применения покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и посредством применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительным является включение в композицию изотонических средств, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит или сорбит, и хлорида натрия. Длительное всасывание инъекционных композиций может обеспечиваться благодаря включению в композицию средства, которое замедляет всасывание, например, моностеарата алюминия или желатина. В определенных вариантах осуществления композиции могут быть получены для хранения в лиофилизированной форме с использованием соответствующих наполнителей (например, сахарозы).

[00189] Фармацевтические композиции могут быть получены в соответствии со способами, хорошо известными и обычно практикуемыми в данной области техники. Фармацевтически приемлемые носители определяются отчасти конкретной вводимой композицией, а также конкретным способом, применяемым для введения композиции. Соответственно имеется широкое разнообразие подходящих составов фармацевтических композиций. Применимые способы составления белка на основе антитела с привитым цитокином и определения соответствующей дозы и схемы введения доз могут быть найдены, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., University of the Sciences in Philadelphia, Eds., Lippincott Williams & Wilkins (2005); и в Martindale: The Complete Drug Reference, Sweetman, 2005, London: Pharmaceutical Press., а также в Martindale, Martindale: The Extra Pharmacopoeia, 31st Edition., 1996, Amer Pharmaceutical Assn, и Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Фармацевтические композиции предпочтительно изготавливают в соответствии с положениями GMP. В типичном случае в фармацевтических композициях используется терапевтически эффективная доза или эффективная доза белка на основе антитела с привитым цитокином. Белок на основе антитела с привитым цитокином составляют в виде фармацевтически приемлемой лекарственной формы с помощью традиционных способов, известных специалистам в данной области. Режимы дозирования корректируют для обеспечения желаемого ответа (например, терапевтического ответа). При введении терапевтически или профилактически

эффективной дозы можно вводить низкую дозу, а затем постепенно увеличивать ее до тех пор, пока не будет достигнут желаемый ответ при минимальных или отсутствующих нежелательных побочных эффектах. Например, можно вводить одну болюсную дозу, можно вводить несколько разделенных доз в течение некоторого времени, или дозу можно пропорционально снижать или увеличивать в соответствии с потребностями терапевтической ситуации. Особенно предпочтительным является составление композиций для парентерального применения в виде единичной лекарственной формы для удобства введения и однородности дозирования. Единичная лекарственная форма, как используется в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; при этом каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем.

[00190] Фактические уровни дозы активных ингредиентов в фармацевтических композициях можно изменять для того, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа в отношении конкретного пациента, композиции и способа введения, не являясь токсичным для пациента. Выбранный уровень дозы зависит от разнообразных фармакокинетических факторов, в том числе активности конкретных используемых композиций или их сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого соединения, длительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, массы тела, состояния, общего состояния здоровья и анамнеза пациента, получающего лечение, и подобных факторов.

Изделия/наборы

[00191] В некоторых аспектах белок на основе антитела с привитым цитокином предусмотрен в изделии (т. е. в наборе). Предусмотренный привитый белок на основе антитела или цитокина, как правило, находится во флаконе или контейнере. Таким образом, изделие содержит контейнер и этикетку или листок-вкладыш в упаковке на контейнере или вместе с ним. Подходящие контейнеры включают в себя, например, бутылку, флакон, шприц, пакет для раствора и т. д. При необходимости белок на основе антитела с привитым цитокином может находиться в жидкой или высушенной (например, лиофилизированной) форме. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в комбинации с другой композицией является эффективной для получения композиции для лечения, предупреждения и/или облегчения рака. Этикетка или инструкция по применению препарата указывает, что композиция используется для лечения, предупреждения и/или уменьшения интенсивности проявлений рака. Изделия (наборы), содержащие белок на основе антитела с привитым цитокином, описанный в данном документе, необязательно содержат одно или несколько дополнительных средств. В

некоторых вариантах осуществления изделие (набор) содержит белок на основе антитела с привитым цитокином и фармацевтически приемлемый разбавитель. В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином предусмотрен в изделии (наборе) с одним или несколькими дополнительными активными средствами в том же самом составе (например, в виде смесей). В некоторых вариантах осуществления белок на основе антитела с привитым цитокином предусмотрен в изделии (наборе) со вторым или третьим средством в отдельных составах (например, в отдельных контейнерах). В определенных вариантах осуществления изделие (набор) содержит аликвоты белка на основе антитела с привитым цитокином, где аликвота предусматривает одну или несколько доз. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены аликвоты для нескольких введений, при этом дозы являются одинаковыми или разными. В конкретных вариантах осуществления различные режимы введения доз в соответствии с необходимостью предусматривают возрастание или уменьшение дозы. В некоторых вариантах осуществления дозы белка на основе антитела с привитым цитокином и второе средство являются независимо одинаковыми или независимо разными. В определенных вариантах осуществления изделие (набор) содержит дополнительное средство, такое как противоопухолевое средство или молекула, представляющая собой контрольную точку иммунного ответа. Выбор одного или нескольких дополнительных средств будет зависеть от дозы, доставки и болезненного состояния, подлежащего лечению.

Способы лечения и применения композиций для лечения рака

Состояния, подлежащие лечению или предупреждению

[00192] Белки на основе антител с привитым цитокином находят применение в лечении, уменьшении интенсивности проявлений или профилактике рака. В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения рака у индивидуума, нуждающегося в этом, включающие введение индивидууму терапевтически эффективного количества белка на основе антитела с привитым цитокином, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предусмотрен белок на основе антитела с привитым цитокином для применения в качестве терапевтического средства для лечения или профилактики рака у индивидуума. В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая такой белок на основе антитела с привитым цитокином, для применения в лечении или уменьшении интенсивности проявлений рака у индивидуума, нуждающегося в этом.

[00193] Состояния, подлежащие лечению, включают в себя различные раковые показания. При терапевтических целях у индивидуума был диагностирован рак. При превентивных или профилактических целях индивидуум может находиться в состоянии ремиссии при раке или может ожидать появления заболевания в будущем. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет рак, имеет подозрение на наличие рака или находится в состоянии ремиссии при раке. В отношении видов рака, подлежащих лечению белком на основе антитела с привитым цитокином, обычно является благоприятной активация передачи сигнала через низкоаффинные рецепторы IL2, описанная в данном

документе. Раковые показания, подлежащие лечению, включают в себя без ограничения меланому, рак легкого, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак молочной железы и лимфому.

Введение белков на основе антител с привитым цитокином

[00194] Врач или ветеринар может начинать введение доз белка на основе антитела с привитым цитокином, используемого в фармацевтической композиции, с уровней, более низких, чем уровни, необходимые для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект. В целом, эффективные дозы композиций варьируются в зависимости от многих различных факторов, в том числе от конкретного заболевания или состояния, подлежащего лечению, способов введения, участка-мишени, физиологического состояния пациента, того, является ли пациент человеком или животным, других вводимых лекарственных препаратов и того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозы для лечения в типичном случае необходимо подбирать для оптимизации безопасности и эффективности. В случае введения белка на основе антитела с привитым цитокином доза находится в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и чаще от 0,01 до 5 мг/кг массы тела получающего его пациента. Например, дозы могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или находиться в диапазоне 1-10 мг/кг. Введение доз может происходить ежедневно, еженедельно, один раз в две недели, ежемесячно или, при необходимости или при желании, чаще или реже. Иллюстративный режим лечения предусматривает введение один раз в неделю, один раз в две недели, или один раз в месяц, или один раз в 3-6 месяцев.

[00195] Белок на основе антитела с привитым цитокином можно вводить в однократной дозе или дробных дозах. Белок на основе антитела с привитым цитокином обычно вводят несколько раз. Интервалы между отдельными дозами могут составлять, при необходимости или при желании, неделю, две недели, месяц или год. Интервалы также могут быть нерегулярными, на что указывает измерение уровней белка на основе антитела с привитым цитокином в крови у пациента. В некоторых способах дозу корректируют для достижения концентрации белка на основе антитела с привитым цитокином в плазме крови, составляющей 1-1000 мкг/мл, и в некоторых способах 25-300 мкг/мл. В качестве альтернативы, белок на основе антитела с привитым цитокином можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Доза и частота варьируются в зависимости от периода полувыведения белка на основе антитела с привитым цитокином из организма пациента. В целом белки на основе антител с привитым цитокином характеризуются более длительным периодом полувыведения, чем нативный IL2 или рекомбинантные цитокины, такие как Proleukin®. Доза и частота введения могут варьироваться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Как правило, в профилактических путях применения относительно низкую дозу вводят с относительно большими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать

лечение в течение всей своей жизни. Как правило, в терапевтических путях применения иногда необходимо введение относительно высокой дозы с относительно короткими интервалами до тех пор, пока прогрессирование заболевания не ослабеет или не завершится, и предпочтительно до тех пор, пока у пациента не будет наблюдаться частичное или полное уменьшение интенсивности проявлений симптомов заболевания. После этого пациенту можно осуществлять введение согласно профилактическому режиму.

Совместное введение со вторым средством

[00196] Термин "комбинированная терапия" относится к введению двух или более терапевтических средств для лечения терапевтического состояния или нарушения, описанного в настоящем изобретении. Такое введение охватывает совместное введение этих терапевтических средств по существу одновременно, например, в одной капсуле, имеющей фиксированное соотношение активных ингредиентов. В качестве альтернативы, такое введение охватывает совместное введение с использованием нескольких или отдельных контейнеров (например, капсул, порошков и жидкостей) для каждого активного ингредиента. Порошки и/или жидкости могут быть восстановлены или разбавлены до требуемой дозы перед введением. Кроме того, такое введение также охватывает применение каждого типа терапевтического средства последовательным образом приблизительно в одно и то же время либо в разное время. В любом случае режим лечения будет обеспечивать благоприятные эффекты комбинации лекарственных средств при лечении состояний или нарушений, описанных в данном документе.

[00197] Комбинированная терапия может обеспечивать "синергизм" и оказаться "синергической", т. е. эффект, достигаемый при совместном применении активных ингредиентов, превышает сумму эффектов, которые являются результатом применения соединений по отдельности. Синергический эффект может достигаться, если активные ингредиенты: (1) составлены вместе и вводятся или доставляются одновременно в виде комбинированного состава с однократной дозой; (2) доставляются по очереди или параллельно как отдельные составы или (3) применяется какой-либо другой режим. При доставке в качестве чередующейся терапии синергический эффект может достигаться, если соединения вводят или доставляют последовательно, например, посредством различных инъекций в отдельных шприцах. Как правило, во время чередующейся терапии эффективные дозы каждого активного ингредиента вводят последовательно, т. е. серийно, тогда как при комбинированной терапии эффективные дозы двух или более активных ингредиентов вводят совместно.

[00198] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения рака путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, белка на основе антитела с привитым цитокином в комбинации с одним или несколькими ингибиторами тирозинкиназы, в том числе без ограничения ингибиторами EGFR, ингибиторами Her2, ингибиторами Her3, ингибиторами IGFR и ингибиторами Met.

[00199] Например, ингибиторы тирозинкиназы включают без ограничения

эрлотиниба гидрохлорид (Tarceva®); линифаниб (N-[4-(3-амино-1H-индазол-4-ил)фенил]-N'-(2-фтор-5-метилфенил)мочевину, также известный как АВТ 869, доступный от Genentech); сунитиниба малат (Sutent®); босутиниб (4-[(2,4-дихлор-5-метоксифенил)амино]-6-метокси-7-[3-(4-метилпиперазин-1-ил)пропокси]хинолин-3-карбонитрил, также известный как SKI-606 и описанный в патенте США № 6780996); дазатиниб (Sprycel®); пазопаниб (Votrient®); сорафениб (Nexavar®); зактому (ZD6474); нилотиниб (Tasigna®); регорафениб (Stivarga®) и иматиниб или иматиниба мезилат (Gilevec® и Gleevec®).

[00200] Ингибиторы рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) включают без ограничения эрлотиниба гидрохлорид (Tarceva®), гефитиниб (Iressa®); N-[4-[(3-хлор-4-фторфенил)амино]-7-[(3"S")-тетрагидро-3-фуранил]окси]-6-хиназолинил]-4-(диметиламино)-2-бутенамид (Tovok®); вандетаниб (Caprelsa®); лапатиниб (Tykerb®); (3R,4R)-4-амино-1-((4-((3-метоксифенил)амино)пирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-ил)метил)пиперидин-3-ол (BMS690514); канертиниба дигидрохлорид (CI-1033); 6-[4-[(4-этил-1-пиперазинил)метил]фенил]-N-[(1R)-1-фенилэтил]-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-амин (AEE788, CAS 497839-62-0); мубритиниб (TAK165); пелитиниб (EKB569); афатиниб (BIBW2992); нератиниб (NKI-272); (3S)-3-морфолинилметилловый сложный эфир N-[4-[[1-[(3-фторфенил)метил]-1H-индазол-5-ил]амино]-5-метилпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-6-ил]-карбаминовой кислоты (BMS599626); N-(3,4-дихлор-2-фторфенил)-6-метокси-7-[[3α,5β,6α)-октагидро-2-метилциклопента[с]пиррол-5-ил]метокси]-4-хиназолинамин (XL647, CAS 781613-23-8) и 4-[4-[[1-[(1R)-1-фенилэтил]амино]-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-6-ил]-фенол (PKI166, CAS 187724-61-4).

[00201] Антитела к EGFR включают без ограничения цетуксимаб (Erbix®); панитумумаб (Vectibix®); матузумаб (EMD-72000); нимотузумаб (hR3); залутумумаб; TheraCIM h-R3; MDX0447 (CAS 339151-96-1) и ch806 (mAb-806, CAS 946414-09-1).

[00202] Ингибиторы человеческого рецептора эпидермального фактора роста 2 (рецептора HER2) (также известного как Neu, ErbB-2, CD340 или p185) включают без ограничения трастузумаб (Herceptin®); пертузумаб (Omnitarg®); нератиниб (NKI-272, (2E)-N-[4-[[3-хлор-4-[(пиридин-2-ил)метокси]фенил]амино]-3-циано-7-этоксихинолин-6-ил]-4-(диметиламино)бут-2-енамид, описанный в публикации согласно РСТ № WO 05/028443); лапатиниб или лапатиниба дитозилат (Tykerb®); (3R,4R)-4-амино-1-((4-((3-метоксифенил)амино)пирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-ил)метил)пиперидин-3-ол (BMS690514); (2E)-N-[4-[(3-хлор-4-фторфенил)амино]-7-[(3S)-тетрагидро-3-фуранил]окси]-6-хиназолинил]-4-(диметиламино)-2-бутенамид (BIBW-2992, CAS 850140-72-6); (3S)-3-морфолинилметилловый сложный эфир N-[4-[[1-[(3-фторфенил)метил]-1H-индазол-5-ил]амино]-5-метилпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-6-ил]-карбаминовой кислоты (BMS 599626, CAS 714971-09-2); канертиниба дигидрохлорид (PD183805 или CI-1033) и N-(3,4-дихлор-2-фторфенил)-6-метокси-7-[[3α,5β,6α)-октагидро-2-метилциклопента[с]пиррол-5-ил]метокси]-4-хиназолинамин (XL647, CAS 781613-23-8).

[00203] Ингибиторы HER3 включают без ограничения LJM716, MM-121, AMG-

888, RG7116, REGN-1400, AV-203, MP-RM-1, MM-111 и МЕНД-7945А.

[00204] Ингибиторы Met включают без ограничения кабозантиниб (XL184, CAS 849217-68-1); форетиниб (GSK1363089, ранее XL880, CAS 849217-64-7); тивантиниб (ARQ197, CAS 1000873-98-2); 1-(2-гидрокси-2-метилпропил)-N-(5-(7-метоксихинолин-4-илокси)пиридин-2-ил)-5-метил-3-оксо-2-фенил-2,3-дигидро-1H-пиразол-4-карбоксамид (AMG 458); кризотиниб (Xalkori®, PF-02341066); (3Z)-5-(2,3-дигидро-1H-индол-1-илсульфонил)-3-({3,5-диметил-4-[(4-метилпиперазин-1-ил)карбонил]-1H-пиррол-2-ил}метилен)-1,3-дигидро-2H-индол-2-он (SU11271); (3Z)-N-(3-хлорфенил)-3-({3,5-диметил-4-[(4-метилпиперазин-1-ил)карбонил]-1H-пиррол-2-ил}метилен)-N-метил-2-оксоиндолин-5-сульфонамид (SU11274); (3Z)-N-(3-хлорфенил)-3-{{3,5-диметил-4-(3-морфолин-4-илпропил)-1H-пиррол-2-ил}метилен}-N-метил-2-оксоиндолин-5-сульфонамид (SU11606); 6-[дифтор[6-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)-1,2,4-триазоло[4,3-b]пиридазин-3-ил]метил]-хинолин (JNJ38877605, CAS 943540-75-8); 2-[4-[1-(хинолин-6-илметил)-1H-[1,2,3]триазоло[4,5-b]пиразин-6-ил]-1H-пиразол-1-ил]этанол (PF04217903, CAS 956905-27-4); N-((2R)-1,4-диоксан-2-илметил)-N-метил-N'-[3-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)-5-оксо-5H-бензо[4,5]циклогепта[1,2-b]пиридин-7-ил]сульфамид (MK2461, CAS 917879-39-1); 6-[[6-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)-1,2,4-триазоло[4,3-b]пиридазин-3-ил]тио]-хинолин (SGX523, CAS 1022150-57-7) и (3Z)-5-[[2,6-дихлорфенил]метил]сульфонил]-3-[[3,5-диметил-4-[(2R)-2-(1-пирролидинилметил)-1-пирролидинил]карбонил]-1H-пиррол-2-ил]метилен]-1,3-дигидро-2H-индол-2-он (PHA665752, CAS 477575-56-7).

[00205] Ингибиторы IGF1R включают без ограничения BMS-754807, XL-228, OSI-906, GSK0904529A, A-928605, AXL1717, KW-2450, MK0646, AMG479, IMCA12, MEDI-573 и BI836845. Обзор см., например, в Yee, JNCI, 104; 975 (2012).

[00206] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения рака путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, белка на основе антитела с привитым цитокином в комбинации с одним или несколькими ингибиторами нисходящих сигнальных путей FGF, в том числе без ограничения ингибиторами MEK, ингибиторами Vraf, ингибиторами PI3K/Akt, ингибиторами SHP2, а также ингибиторами mTor.

[00207] Например, ингибиторы митоген-активируемой протеинкиназы (MEK) включают без ограничения XL-518 (также известный как GDC-0973, Cas № 1029872-29-4, доступный от ACC Corp.); 2-[(2-хлор-4-йодфенил)амино]-N-(циклопропилметокси)-3,4-дифторбензамид (также известный как CI-1040 или PD184352 и описанный в публикации согласно РСТ № WO2000035436); N-[(2R)-2,3-дигидроксипропокс]-3,4-дифтор-2-[(2-фтор-4-йодфенил)амино]бензамид (также известный как PD0325901 и описанный в публикации согласно РСТ № WO2002006213); 2,3-бис[амино[(2-аминофенил)тио]метилен]бутандинитрил (также известный как U0126 и описанный в патенте США № 2779780); N-[3,4-дифтор-2-[(2-фтор-4-йодфенил)амино]-6-метоксифенил]-1-[(2R)-2,3-дигидроксипропил]циклопропансульфонамид (также известный как RDEA119 или BAY869766 и описанный в публикации согласно РСТ № WO2007014011); (3S,4R,5Z,8S,9S,11E)-14-(этиламино)-8,9,16-тригидрокси-3,4-диметил-

3,4,9,19-тетрагидро-1H-2-бензоксациклотетрадецин-1,7(8H)-дион] (также известный как E6201 и описанный в публикации согласно РСТ № WO2003076424); 2'-амино-3'-метоксифлавоон (также известный как PD98059, доступный от Biaffin GmbH & Co., KG, Германия); вемурафениб (PLX-4032, CAS 918504-65-1); (R)-3-(2,3-дигидроксипропил)-6-фтор-5-(2-фтор-4-йодфениламино)-8-метилпиридо[2,3-d]пиримидин-4,7(3H,8H)-дион (ТАК-733, CAS 1035555-63-5);

пимасертиб (AS-703026, CAS 1204531-26-9) и траметиниба диметилсульфоксид (GSK-1120212, CAS 1204531-25-80).

[00208] Ингибиторы фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) включают без ограничения 4-[2-(1H-индазол-4-ил)-6-[[4-(метилсульфонил)пиперазин-1-ил]метил]тиено[3,2-d]пиримидин-4-ил]морфолин (также известный как GDC 0941 и описанный в публикациях согласно РСТ №№ WO 09/036082 и WO 09/055730); 2-метил-2-[4-[3-метил-2-оксо-8-(хинолин-3-ил)-2,3-дигидроимидазо[4,5-с]хинолин-1-ил]фенил]пропионитрил (также известный как BEZ 235 или NVP-BEZ 235 и описанный в публикации согласно РСТ № WO 06/122806); 4-(трифторметил)-5-(2,6-диморфолинопиримидин-4-ил)пиридин-2-амин (также известный как ВКМ120 или NVP-ВКМ120 и описанный в публикации согласно РСТ № WO2007/084786); тозасертиб (VX680 или МК-0457, CAS 639089-54-6); (5Z)-5-[[4-(4-пиридинил)-6-хинолинил]метилен]-2,4-тиазолидиндион (GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(ацетилокси)-1-[(ди-2-пропениламино)метилен]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-октагидро-11-гидрокси-4-(метоксиметил)-4a,6a-диметилциклопента[5,6]нафто[1,2-с]пиран-2,7,10(1H)-трион (PX866, CAS 502632-66-8) и 8-фенил-2-(морфолин-4-ил)-хромен-4-он (LY294002, CAS 154447-36-6).

[00209] Ингибиторы mTOR включают без ограничения темсиролимус (Torisel®); ридафоролимус (ранее известный как деферолимус, (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-дигидрокси-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-2,3,10,14,20-пентаоксо-11,36-диокса-4-азатрицикло[30.3.1.0^{4,9}]гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-12-ил]пропил]-2-метоксициклогексилдиметилфосфинат, также известный как AP23573 и МК8669 и описанный в публикации согласно РСТ № WO 03/064383); эверолимус (Afinitor® или RAD001); рапамицин (AY22989, Sirolimus®); симапимод (CAS 164301-51-3); (5-{2,4-бис[(3S)-3-метилморфолин-4-ил]пиридо[2,3-d]пиримидин-7-ил}-2-метоксифенил)метанол (AZD8055); 2-амино-8-[*транс*-4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-пиридинил)-4-метилпиридо[2,3-d]пиримидин-7(8H)-он (PF04691502, CAS 1013101-36-4) и N²-[1,4-диоксо-4-[[4-(4-оксо-8-фенил-4H-1-бензопиран-2-ил)морфолиний-4-ил]метокси]бутил]-L-аргинилглицил-L-α-аспартил-L-серин ("L-аргинилглицил-L-α-аспартил-L-серин" раскрыт под SEQ ID NO: 77) в форме внутренней соли (SF1126, CAS 936487-67-1).

[00210] В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения рака путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, белка на основе антитела с привитым цитокином в комбинации с одним или несколькими проапоптотическими

средствами, в том числе без ограничения ингибиторами IAP, ингибиторами Bcl2, ингибиторами MCL1, средствами на основе TRAIL, ингибиторами Chk.

[00211] Например, ингибиторы IAP включают без ограничения NVP-LCL161, GDC-0917, AEG-35156, AT406 и TL32711. Другие примеры ингибиторов IAP включают без ограничения раскрытые в WO04/005284, WO 04/007529, WO05/097791, WO 05/069894, WO 05/069888, WO 05/094818, US2006/0014700, US2006/0025347, WO 06/069063, WO 06/010118, WO 06/017295 и WO08/134679.

[00212] Ингибиторы BCL-2 включают без ограничения 4-[4-[[2-(4-хлорфенил)-5,5-диметил-1-циклогексен-1-ил]метил]-1-пиперазинил]-N-[[4-[[1R)-3-(4-морфолинил)-1-[(фенилтио)метил]пропил]амино]-3-[[(трифторметил)сульфонил]фенил]сульфонил]бензамид (также известный как АВТ-263 и описанный в публикации согласно РСТ № WO 09/155386); тетрокарцин А; антимицин; госсипол ((-)-BL-193); обатоклак; этил-2-амино-6-циклопентил-4-(1-циано-2-этокси-2-оксоэтил)-4Н-хромон-3-карбоксилат (HA14-1); облимерсен (G3139, Genasense®); пептид Вак ВНЗ; (-)-госсиполуксусную кислоту (AT-101); 4-[4-[(4'-хлор[1,1'-бифенил]-2-ил)метил]-1-пиперазинил]-N-[[4-[[1R)-3-(диметиламино)-1-[(фенилтио)метил]пропил]амино]-3-нитрофенил]сульфонил]-бензамид (АВТ-737, CAS 852808-04-9) и навитоклак (АВТ-263, CAS 923564-51-6).

[00213] Агонисты проапоптотических рецепторов (PARA), в том числе DR4 (TRAILR1) и DR5 (TRAILR2), включают без ограничения дуланермин (AMG-951, RhApo2L/TRAIL); мапатумумаб (HRS-ETR1, CAS 658052-09-6); лексатумумаб (HGS-ETR2, CAS 845816-02-6); апомаб (Aromab®); конатумумаб (AMG655, CAS 896731-82-1) и тигатузумаб (CS1008, CAS 946415-34-5, доступный от Daiichi Sankyo).

[00214] Ингибиторы киназ контрольных точек (CHK) включают без ограничения 7-гидроксистауроспорин (UCN-01); 6-бром-3-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)-5-(3R)-3-пиперидинилпиразоло[1,5-а]пиримидин-7-амин (SCH900776, CAS 891494-63-6); N-[(S)-пиперидин-3-ил]амид 5-(3-фторфенил)-3-уреидотиофен-2-карбоновой кислоты (AZD7762, CAS 860352-01-8); 4-[[[(3S)-1-азабицикло[2.2.2]окт-3-ил]амино]-3-(1Н-бензимидазол-2-ил)-6-хлорхинолин-2(1Н)-он (CHIR 124, CAS 405168-58-3); 7-аминодактиномицин (7-AAD), изогранулатимид, дебромгимениалдизин; N-[5-бром-4-метил-2-[(2S)-2-морфолинилметокси]-фенил]-N'-(5-метил-2-пиразинил)мочевину (LY2603618, CAS 911222-45-2); сульфорафан (CAS 4478-93-7, 4-метилсульфинилбутилизотиоцианат); 9,10,11,12-тетрагидро-9,12-эпокси-1Н-дииндоло[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]пирроло[3,4-*i*][1,6]бензодиазацин-1,3(2Н)-дион (SB-218078, CAS 135897-06-2) и TAT-S216A (Sha et al., Mol. Cancer. Ther 2007; 6(1):147-153), а также CBP501.

[00215] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения рака путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, белка на основе антитела с привитым цитокином в комбинации с одним или несколькими ингибиторами FGFR. Например, ингибиторы FGFR включают в себя без ограничения бриваниба аланинат (BMS-582664, (S)-((R)-1-(4-(4-фтор-2-метил-1Н-индол-5-илокси)-5-метилпирроло[2,1-

f][1,2,4]триазин-6-илокси)пропан-2-ил)2-аминопропаноат); варгатеф (BIBF1120, CAS 928326-83-4); довитииниб в форме дилактата (TKI258, CAS 852433-84-2); 3-(2,6-дихлор-3,5-диметоксифенил)-1-{6-[4-(4-этилпиперазин-1-ил)-фениламино]-пиримидин-4-ил}-1-метилмочевину (BGJ398, CAS 872511-34-7); данусертиб (PNA-739358) и (PD173074, CAS 219580-11-7). В конкретном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, конъюгата антитело-лекарственное средство в комбинации с ингибитором FGFR2, таким как 3-(2,6-дихлор-3,5-диметоксифенил)-1-(6((4-(4-этилпиперазин-1-ил)фенил)амино)пиримидин-4-ил)-1-мочевина (также известная как BGJ-398) или 4-амино-5-фтор-3-(5-(4-метилпиперазин-1-ил)-1H-бензо[d]имидазол-2-ил)хинолин-2(1H)-он (также известный как довитииниб или TKI-258), AZD4547 (Gavine et al., 2012, Cancer Research 72, 2045-56, N-[5-[2-(3,5-диметоксифенил)этил]-2H-пиразол-3-ил]-4-(3R,5S)-диметилпиперазин-1-ил)бензамид), понатиниб (AP24534; Gozgit et al., 2012, Mol Cancer Ther., 11; 690-99; 3-[2-(имидазо[1,2-b]пиридазин-3-ил)этинил]-4-метил-N-{4-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]-3-(трифторметил)фенил}бензамид, CAS 943319-70-8).

[00216] Белки на основе антител с привитым цитокином также можно вводить в комбинации с ингибитором контрольной точки иммунного ответа. В одном варианте осуществления белки на основе антител с привитым цитокином можно вводить в комбинации с ингибитором молекулы, представляющей собой контрольную точку иммунного ответа, выбранной из одного или нескольких из PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM3, CTLA-4, LAG-3, CEACAM-1, CEACAM-5, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 или TGFR. В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки иммунного ответа представляет собой антитело к PD-1, где антитело к PD-1 выбрано из ниволумаба, пембролизумаба или пидилизумаба. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела к PD-1 представляет собой ниволумаб. Альтернативные названия ниволумаба включают MDX-1106, MDX-1106-04, ONO-4538 или BMS-936558. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб (регистрационный номер CAS: 946414-94-4). Ниволумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG4, которое специфично блокирует PD1. Ниволумаб (клон 5C4) и другие человеческие моноклональные антитела, которые специфично связываются с PD1, раскрыты в US 8008449 и WO2006/121168.

[00217] В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой пембролизумаб. Пембролизумаб (также называемый ламбролизумабом, MK-3475, MK03475, SCH-900475 или KEYTRUDA[®]; Merck) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4, которое связывается с PD-1. Пембролизумаб и другие гуманизированные антитела к PD-1 раскрыты в Hamid, O. et al. (2013) New England Journal of Medicine 369 (2): 134-44, US 8354509 и WO2009/114335.

[00218] В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой пидилизумаб. Пидилизумаб (CT-011; Cure Tech) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1k, которое связывается с PD1.

Пидилизумаб и другие гуманизированные моноклональные антитела к PD-1 раскрыты в WO2009/101611.

[00219] Другие антитела к PD1 включают AMP 514 (Amplimmune) и, например, антитела к PD1, раскрытые в US 8609089, US 2010/028330 и/или US 2012/0114649 и US2016/0108123.

В некоторых вариантах осуществления белки на основе антител с привитым цитокином можно вводить с антителом к Tim3, раскрытым в US2015/0218274. В других вариантах осуществления белки на основе антител с привитым цитокином можно вводить с антителом к PD-L1, раскрытым в US2016/0108123, Durvalumab® (MEDI4736), Atezolizumab® (MPDL3280A) или Avelumab®.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Создание белков на основе антител с привитым цитокином IL2

[00220] Белки на основе антител с привитым цитокином получали путем встраивания последовательности IL2 в CDR-области различных иммуноглобулиновых остовов, а затем как тяжелые, так и легкие цепи иммуноглобулинов использовали для получения конечных белков на основе антитела и цитокина. Белки на основе антител с привитым цитокином придают предпочтительные терапевтические свойства IL2; в то же время белки на основе антител с привитым цитокином характеризуются сниженными нежелательными эффектами, такими как увеличенная активность Treg-клеток, по сравнению с rhIL2.

[00221] С целью создания белков на основе антител с привитым цитокином последовательности IL2, содержащие мутации (SEQ ID NO:4 или 6), вставляли в CDR-петли остова, представляющего собой цепь иммуноглобулина. Белки на основе антител с привитым цитокином получали с использованием разнообразных известных последовательностей иммуноглобулинов, которые использовали в клинических условиях, а также последовательностей антител зародышевого типа. Последовательности IL2 в иллюстративном остове, называемом GFTX3b, отображены в таблице 2. Точки вставки выбирали таким образом, чтобы они представляли собой срединную точку петли, на основании доступных данных структурного или гомологичного моделирования. Белки на основе антител с привитым цитокином получали с помощью стандартных технологий молекулярной биологии путем использования рекомбинантной ДНК, кодирующей соответствующие последовательности.

[00222] Выбор того, какую CDR выбрать для прививания цитокина, осуществляли на основе параметров необходимых биологических и биофизических свойств и благоприятного профиля разработки. Программное обеспечение для моделирования было лишь частично применимым при предсказании того, какая CDR и какое положение в CDR будут обеспечивать необходимые параметры, поэтому, таким образом, создавали все шесть возможных молекул антител с привитым цитокином и затем оценивали в биологических анализах. При достижении необходимой биологической активности затем определялись с биофизическими свойствами, такими как структурная разрешающая

способность, в отношении того, как молекула антитела с привитым цитокином взаимодействует с соответствующим рецептором цитокина.

[00223] В случае молекул антител с привитым цитокином IL2 изначально определяли структуру антитела-кандидата, рассматриваемого для прививания цитокина. Исходя из указанной структуры, было отмечено, что паратоп находился в крайнем положении N-конца "плеча" антитела, и что цитокин, прививаемый в указанном положении, будет представлять цитокин своему соответствующему рецептору. Благодаря технологии прививания каждый белок на основе антитела с привитым IL2 ограничен CDR-петлей с различной длиной, последовательностью и структурным окружением. Ввиду этого IL2 прививали на все шесть CDR, соответствующих LCDR-1, LCDR-2, LCDR-3 и HCDR-1, HCDR-2 и HCDR-3. Исходя из таблицы на фигуре 1, очевидно, что белки на основе антител с привитым цитокином отличаются по своей активности, включая то, что IL2, привитый на CDR2 легкой цепи (IgG.IL2.L2), не экспрессировался. Также наблюдалось, что молекулы антител с привитым цитокином IL2 с измененной функцией Fc (например, "молчащим" Fc) характеризовались лучшим профилем.

[00224] Была выбрана HCDR-1, поскольку она характеризовалась наилучшей комбинацией свойств (биофизических и биологических), а точечные мутации IL2, которые были включены, обеспечивали усиление желаемых биологических свойств. При выборе точки вставки выбирали структурный центр CDR-петли, поскольку это обеспечивало наличие наибольшего пространства с каждой стороны (линейный размер $3,8\text{\AA}$ x число остатков), и, без ограничения какой-либо теорией, это обеспечивало получение стабильной молекулы, давая возможность IL2 более свободно укладываться независимым образом. Поскольку структура остова GFTX3b для прививания уже была известной, также был известным и структурный центр каждой CDR. Он совпадал с центром последовательности CDR-петли, определенным с использованием формата нумерации по Chothia. Как упоминалось ранее, точку вставки прививаемых молекул IL-2 смещали от центра в направлении N- либо C-концевой части CDR-петли. В то же время смещение IL2 в пределах CDR-петли не обуславливало значительную разницу в биологической активности.

[00225] Подводя итог, следует отметить, что точку вставки в каждой CDR выбирали на структурной основе, исходя из гипотезы, что прививание в CDR будет обеспечивать некоторый уровень стерического несоответствия отдельных субъединиц рецептора IL2. В основе окончательного выбора того, какая CDR для прививания была наиболее эффективной для конкретного цитокина, лежали желаемые биологические и биофизические свойства. Природа рецептора цитокина, взаимодействия цитокин/рецептор и механизм передачи сигнала также играли роль, и этот выбор осуществляли посредством сравнения каждой отдельной молекулы на основе антитела и цитокина по ее соответствующим свойствам.

ТАБЛИЦА 1

| | | |
|-------------|-----------------|-----------------------------------|
| SEQ ID NO:1 | ДНК, кодирующая | AGTTC CCTATCACTCTCTTTAATCACTACTCA |
|-------------|-----------------|-----------------------------------|

| | | |
|-------------|----------------------------|---|
| | IL2 дикого типа | <p>CAGTAACCTCAACTCCTGCCACAATGTACAG GATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGT CTTGCACTTGTCAACAACAGTGCACCTACTT CAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAAC TGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGAT TTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCC AAACTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTT ACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAAC ATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAAC CTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAA GCAAAAACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTT AATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGA ACTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTG TGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGT AGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGT CAAAGCATCATCTCAACACTGACTTGATAAT TAAGTGCTTCCCCTTAAAACATATCAGGCC TTCTATTTATTTAAATATTTAAATTTTATATT TATTGTTGAATGTATGGTTTGCTACCTATTGT AACTATTATTCTTAATCTTAAAACATATAAAT ATGGATCTTTTATGATTCTTTTTTGTAAGCCCT AGGGGCTCTAAAATGGTTTCACTTATTTATC CCAAAATATTTATTATTATGTTGAATGTTAA ATATAGTATCTATGTAGATTGGTTAGTAAAA CTATTTAATAAATTTGATAAATATAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</p> |
| SEQ ID NO:2 | Белок IL2 | <p>MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQL QLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYAD ETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT</p> |
| SEQ ID NO:3 | ДНК, кодирующая мутеин IL2 | <p>CAAGTCACACTGCGTGAAAGCGGCCCTGCC CTGGTCAAGCCCACCCAGACCCTGACCCTGA CCTGCACCTTCTCCGGCTTCAGCCTGGCCCC TACCTCCTCCAGCACCAAGAAAACCCAGCT</p> |

| | | |
|-------------|---|--|
| | | <p>GCAGCTCGAACATCTGCTGCTGGACCTGCAG ATGATCCTGAACGGCATCAACAACACTACAAG AACCCCAAGCTGACCCGGATGCTGACCGCC AAGTTCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAG CTGAAACATCTGCAGTGCCTGGAAGAGGAA CTGAAGCCCCTGGAAGAAGTGCTGAACCTG GCCCAGTCCAAGAACTTCCACCTGAGGCCTC GGGACCTGATCTCCAACATCAACGTGATCGT GCTGGAAGTGAAGGGCTCCGAGACAACCTT CATGTGCGAGTACGCCGACGAGACAGCCAC CATCGTGGAATTTCTGAACCGGTGGATCACC TTCTGCCAGTCCATCATCTCCACCCTGACCT CCACCTCCGGCATGTCCGTGGGCTGGATCCG GCAGCCTCCTGGCAAGGCCCTGGAGTGGCT GGCCGACATTTGGTGGGACGACAAGAAGGA CTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGACC ATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCAAGTG GTGCTGAAAGTGACCAACATGGACCCCGCC GACACCGCCACCTACTACTGCGCCCGGTCCA TGATCACCAACTGGTACTTCGACGTGTGGGG CGCTGGCACCACCGTGACCGTGTCTCT</p> |
| SEQ ID NO:4 | <p>Белок-мутеин IL2, мутантная аминокислота выделена жирным шрифтом и подчеркиванием</p> | <p>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYK NPKLTA<u>ML</u>TFKFYMPKKATELKHLQCLEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII TLT</p> |
| SEQ ID NO:5 | <p>ДНК, кодирующая мутеин IL2</p> | <p>GCCCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAAACCC AGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGGACCT GCAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACACTA CAAGAACCCCAAGCTGACCCGGATGCTGAC CGCCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGCCAC CGAGCTGAAACATCTGCAGTGCCTGGAAGA GGAAGTGAAGCCCCTGGAAGAAGTGCTGAA CCTGGCCCAGTCCAAGAACTTCCACCTGAGG</p> |

| | | |
|-------------|--|--|
| | | CCTCGGGACCTGATCTCCAACATCAACGTGA TCGTGCTGGAAGTGAAGGGCTCCGAGACAA CCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACAG CCACCATCGTGGAATTTCTGAACCGGTGGAT CACCTTCTGCCAGTCCATCATCTCCACCCTG ACC |
| SEQ ID NO:6 | Белок-мутеин IL2, мутантная аминокислота выделена жирным шрифтом и подчеркиванием | APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYK NPKLTRMLT <u>AK</u> FYMPKKATELKHLQCLEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIS TLT |

ТАБЛИЦА 2

| | | |
|-------------------------------|-------|--|
| IgG.IL2R67A.H 1 | | |
| SEQ ID NO:7 (объединенная) | HCDR1 | <u>GFSLAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKN</u> <u>PKLTAMLT</u> <u>FKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEE</u> <u>VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC</u> <u>EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT</u> STSGMSVG |
| SEQ ID NO:8 (объединенная) | HCDR2 | DIWWDDKKDYNPSLKS |
| SEQ ID NO:9 (объединенная) | HCDR3 | SMITNWFYFDV |
| SEQ ID NO:10 (Kabat) | HCDR1 | <u>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKL</u> <u>TAMLT</u> <u>FKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLN</u> <u>LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA</u> <u>DETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT</u> STSGMSVG |
| SEQ ID NO:11 (Kabat) | HCDR2 | DIWWDDKKDYNPSLKS |
| SEQ ID NO:12 (Kabat) | HCDR3 | SMITNWFYFDV |
| SEQ ID NO:13(Chothia) | HCDR1 | <u>GFSLAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKN</u> <u>PKLTAMLT</u> <u>FKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEE</u> <u>VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC</u> <u>EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT</u> STSGM |

| | | |
|---------------------------|---------------------------|---|
| SEQ ID NO:14 (Chothia) | HCDR2 | WWDDK |
| SEQ ID NO:15 (Chothia) | HCDR3 | SMITNWFYFDV |
| SEQ ID NO:16 (IMGT) | HCDR1 | <u>GFSLAPTSSTKKTQLOLEHLLLDLQMLNGINNYKN</u> <u>PKLTAMLTFKFYMPKKATELKHLOCLEEELKPLEE</u> <u>VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC</u> <u>EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSTSGMS</u> |
| SEQ ID NO:17 (IMGT) | HCDR2 | IWWDDKK |
| SEQ ID NO:18 (IMGT) | HCDR3 | ARSMITNWFYFDV |
| SEQ ID NO:19 | VH | <u>QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLAPTSSTKKT</u> <u>QLOLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTAMLTFKFY</u> <u>MPKKATELKHLOCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL</u> <u>RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL</u> <u>NRWITFCQSIISTLTSTSGMSVGVIRQPPGKALEWLAD</u> IWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDP ADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAGTTVTVSS |
| SEQ ID NO:20 | ДНК, кодирую щая VH | CAAGTCACACTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTGGTC AAGCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCT CCGGCTTCAGCCTGGCCCCTACCTCCTCCAGCACCAA GAAAACCCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGGA CCTGCAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACACTACAA GAACCCCAAGCTGACCGCCATGCTGACCTTCAAGTT CTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAACATCT GCAGTGCCTGGAAGAGGAACTGAAGCCCCTGGAAG AAGTGCTGAACCTGGCCCAGTCCAAGAACTTCCACC TGAGGCCTCGGGACCTGATCTCCAACATCAACGTGA TCGTGCTGGAAGTGAAGGGCTCCGAGACAACCTTCA TGTGCGAGTACGCCGACGAGACAGCCACCATCGTGG AATTTCTGAACCGGTGGATCACCTTCTGCCAGTCCAT CATCTCCACCCTGACCTCCACCTCCGGCATGTCCGTG GGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCAAGGCCCTGGAG TGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGACAAGAAGGAC |

| | | |
|--------------|---|--|
| | | <p>TACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCTCC AAGGACACCTCCAAGAACCAAGTGGTGCTGAAAGTG ACCAACATGGACCCCGCCGACACCGCCACCTACTAC TGCGCCCGGTCCATGATCACCAACTGGTACTTCGAC GTGTGGGGCGCTGGCACCACCGTGACCGTGTCTCT</p> |
| SEQ ID NO:21 | Тяжелая цепь | <p><u>QVTLR</u>ESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL<u>APTSSSTKKT</u> <u>QLQLEHLLLDLQ</u>MILNGINNYKNPKLTAMLT<u>FKFY</u> <u>MPKKATELKH</u>LQCLEEELKPLEEVLNLA<u>QSKNFHL</u> <u>RPRDLISNIN</u>VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE<u>EFL</u> <u>NRWITFCQSI</u>ISTLTSTSGMSVGVIRQPPGKALEWLAD IWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDP ADTATYYCARSMITNWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> |
| SEQ ID NO:22 | ДНК, кодирую щая тяжелую цепь | <p>CAAGTCACACTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTGGTC AAGCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCT CCGGCTTCAGCCTGGCCCCTACCTCCTCCAGCACCAA GAAAACCCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGGA CCTGCAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACCTACAA GAACCCCAAGCTGACCGCCATGCTGACCTTCAAGTT CTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAACATCT GCAGTGCCTGGAAGAGGAACTGAAGCCCCTGGAAG AAGTGCTGAACCTGGCCCAGTCCAAGAACTTCCACC TGAGGCCTCGGGACCTGATCTCCAACATCAACGTGA TCGTGCTGGAACCTGAAGGGCTCCGAGACAACCTTCA TGTGCGAGTACGCCGACGAGACAGCCACCATCGTGG AATTTCTGAACCGGTGGATCACCTTCTGCCAGTCCAT CATCTCCACCCTGACCTCCACCTCCGGCATGTCCGTG</p> |

GGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCAAGGCCCTGGAG
TGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGACAAGAAGGAC
TACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCTCC
AAGGACACCTCCAAGAACCAAGTGGTGTGAAAGTG
ACCAACATGGACCCCGCCGACACCGCCACCTACTAC
TGCGCCCGGTCCATGATCACCAACTGGTACTTCGAC
GTGTGGGGCGCTGGCACCACCGTGACCGTGTCTCT
GCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCC
CTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCT
GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGT
GACAGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCTGG
CGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGC
CTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACAGTGCCTTCAA
GCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGA
ACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGG
TGGAGCCTAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTC
CTCCCTGCCCTGCTCCTGAACTGCTGGGCGGCCCTTC
TGTGTTCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTG
ATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGCCGTGTCCCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTC
AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC
AAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTACAACCTCCACC
TACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTC
TCCAACAAGGCCCTGGCCGCCCTATCGAAAAGACA
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAG
GTGTACACCCTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACC
AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGC
TTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTA
ACGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTC
CTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTC
CAAACCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGG
CAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTG
CACAACCACTACACCAGAAAGTCCCTGTCCCTGTCTC
CCGGCAAG

| | | |
|--------------------------------|---------------------------|--|
| SEQ ID NO:23 (объединенная) | LCDR1 | KAQLSVGYMH |
| SEQ ID NO:24 (объединенная) | LCDR2 | DTSKLAS |
| SEQ ID NO:25 (объединенная) | LCDR3 | FQGSGYPFT |
| SEQ ID NO:26 (Kabat) | LCDR1 | KAQLSVGYMH |
| SEQ ID NO:27 (Kabat) | LCDR2 | DTSKLAS |
| SEQ ID NO:28 (Kabat) | LCDR3 | FQGSGYPFT |
| SEQ ID NO:29 (Chothia) | LCDR1 | QLSVGY |
| SEQ ID NO:30 (Chothia) | LCDR2 | DTS |
| SEQ ID NO:31 (Chothia) | LCDR3 | GSGYPF |
| SEQ ID NO:32 (IMGT) | LCDR1 | LSVGY |
| SEQ ID NO:33 (IMGT) | LCDR2 | DTS |
| SEQ ID NO:34 (IMGT) | LCDR3 | FQGSGYPFT |
| SEQ ID NO:35 | VL | DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKAQLSVGYMHWYQQ KPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCFQGSGYPFTFGGGTKLEIK |
| SEQ ID NO:36 | ДНК, кодирую щая VL | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGTCC GCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTGCAAG GCCCAGCTGTCCGTGGGCTACATGCACTGGTATCAG CAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTAC GACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCAGA TTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCTGA CCATCTCCAGCCTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTA |

| | | |
|--------------------------------|--|--|
| | | CTACTGTTTTCAAGGCTCCGGCTACCCCTTCACCTTC GGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG |
| SEQ ID NO:37 | Легкая цепь | DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKAQLSVGYMHWYQQ KPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCFQSGGYPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO:38 | ДНК, кодирую щая легкую цепь | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGTCC GCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTGCAAG GCCAGCTGTCCGTGGGCTACATGCACTGGTATCAG CAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTAC GACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCAGA TTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCTGA CCATCTCCAGCCTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTA CTACTGTTTTCAAGGCTCCGGCTACCCCTTCACCTTC GGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGT GGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGC CTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGG ACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGA GCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCT GCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGA CCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC |
| IgG.II2F71A.H 1 | | |
| SEQ ID NO:39 (объединенная) | HCDR1 | <u>GFSLAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKN</u> <u>PKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLOCLEEELKPLEE</u> <u>VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC</u> <u>EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSTSGMSVG</u> |
| SEQ ID NO:40 (объединенная) | HCDR2 | DIWWDDKKDYNPSLKS |
| SEQ ID NO:41 | HCDR3 | SMITNWFYFDV |

| | | |
|---------------------------|-----------------|---|
| (объединенная) | | |
| SEQ ID NO:42 (Kabat) | HCDR1 | <u>APTSSSTKKTQLOLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL</u> <u>TRMLTAKFYMPKKATELKHLOCLEEELKPLEEVLN</u> <u>LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA</u> <u>DETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSTSGMSVG</u> |
| SEQ ID NO:43 (Kabat) | HCDR2 | DIWWDDKKDYNPSLKS |
| SEQ ID NO:44 (Kabat) | HCDR3 | SMITNWFYFDV |
| SEQ ID NO:45 (Chothia) | HCDR1 | <u>GFSLAPTSSSTKKTQLOLEHLLLDLQMILNGINNYKN</u> <u>PKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLOCLEEELKPLEE</u> <u>VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC</u> <u>EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSTSGM</u> |
| SEQ ID NO:46 (Chothia) | HCDR2 | WWDDK |
| SEQ ID NO:47 (Chothia) | HCDR3 | SMITNWFYFDV |
| SEQ ID NO:48 (IMGT) | HCDR1 | <u>GFSLAPTSSSTKKTQLOLEHLLLDLQMILNGINNYKN</u> <u>PKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLOCLEEELKPLEE</u> <u>VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC</u> <u>EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSTSGMS</u> |
| SEQ ID NO:49 (IMGT) | HCDR2 | IWWDDKK |
| SEQ ID NO:50 (IMGT) | HCDR3 | ARSMITNWFYFDV |
| SEQ ID NO:51 | VH | <u>QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLAPTSSSTKKT</u> <u>QLOLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFY</u> <u>MPKKATELKHLOCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL</u> <u>RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL</u> <u>NRWITFCQSIISTLTSTSGMSVWIRQPPGKALEWLAD</u> IWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDP ADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAGTTVTVSS |
| SEQ ID NO:52 | ДНК, кодирую | CAAGTCACACTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTGGTC AAGCCACCCAGACCCTGACCCTGACCCTGCACCTTCT |

| | | |
|--------------|-----------------|--|
| | щяя VH | <p>CCGGCTTCAGCCTGGCCCCTACCTCCTCCAGCACCAA GAAAACCCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGGA CCTGCAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACACTACAA GAACCCCAAGCTGACCCGGATGCTGACCGCCAAGTT CTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAACATCT GCAGTGCCTGGAAGAGGAACTGAAGCCCCTGGAAG AAGTGCTGAACCTGGCCCAGTCCAAGAACTTCCACC TGAGGCCTCGGGACCTGATCTCCAACATCAACGTGA TCGTGCTGGAAGTGAAGGGCTCCGAGACAACCTTCA TGTGCGAGTACGCCGACGAGACAGCCACCATCGTGG AATTTCTGAACCGGTGGATCACCTTCTGCCAGTCCAT CATCTCCACCCTGACCTCCACCTCCGGCATGTCCGTG GGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCAAGGCCCTGGAG TGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGACAAGAAGGAC TACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCTCC AAGGACACCTCCAAGAACCAAGTGGTGCTGAAAGTG ACCAACATGGACCCCGCCGACACCGCCACCTACTAC TGCGCCCGGTCCATGATCACCAACTGGTACTTCGAC GTGTGGGGCGCTGGCACCCCGTGACCGTGTCTCT</p> |
| SEQ ID NO:53 | Тяжелая цепь | <p><u>QVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLAPSSSTKKT</u> <u>QLOLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTAKFY</u> <u>MPKKATELKHLOCLEEELKPLEEVLNLAOSKNFHL</u> <u>RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL</u> <u>NRWITFCQSIISTLT</u>STSGMSVGVIRQPPGKALEWLAD IWWDKDYNSPLKSRILTISKDTSKNQVVLKVTNMDP ADTATYYCARSMITNWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> |

| | | |
|---------------------|--|--|
| <p>SEQ ID NO:54</p> | <p>ДНК, кодирую щую тяжелую цепь</p> | <p>CAAGTCACACTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTGGTC AAGCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCT CCGGCTTCAGCCTGGCCCCTACCTCCTCCAGCACCAA GAAAACCCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGGA CCTGCAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACCTACAA GAACCCCAAGCTGACCCGGATGCTGACCGCCAAGTT CTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAACATCT GCAGTGCCTGGAAGAGGAACTGAAGCCCCTGGAAG AAGTGCTGAACCTGGCCCAGTCCAAGAACTTCCACC TGAGGCCTCGGGACCTGATCTCCAACATCAACGTGA TCGTGCTGGAAGTGAAGGGCTCCGAGACAACCTTCA TGTGCGAGTACGCCGACGAGACAGCCACCATCGTGG AATTTCTGAACCGGTGGATCACCTTCTGCCAGTCCAT CATCTCCACCCTGACCTCCACCTCCGGCATGTCCGTG GGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCAAGGCCCTGGAG TGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGACAAGAAGGAC TACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCTCC AAGGACACCTCCAAGAACCAAGTGGTGCTGAAAGTG ACCAACATGGACCCCGCCGACACCGCCACCTACTAC TGCGCCCGGTCCATGATCACCAACTGGTACTTCGAC GTGTGGGGCGCTGGCACCACCGTGACCGTGTCTCT GCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCC CTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGT GACAGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCTGG CGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGC CTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTCACAGTGCCTTCAA GCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGA ACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGG TGGAGCCTAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTC CTCCCTGCCCTGCTCCTGAACTGCTGGGCGGCCCTTC TGTGTTCCCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTG ATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG GTGGCCGTGTCCCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC</p> |
|---------------------|--|--|

| | | |
|--------------------------------|-------|--|
| | | AAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTACAACCTCCACC TACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTC TCCAACAAGGCCCTGGCCGCCCTATCGAAAAGACA ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAG GTGTACACCCTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGC TTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTA ACGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTC CTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTC CAAACCTGACCGTGGACAAGTCCCAGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTC CCGGCAAG |
| SEQ ID NO:55 (объединенная) | LCDR1 | KAQLSVGYMH |
| SEQ ID NO:56 (объединенная) | LCDR2 | DTSKLAS |
| SEQ ID NO:57 (объединенная) | LCDR3 | FQSGYPFT |
| SEQ ID NO:58 (Kabat) | LCDR1 | KAQLSVGYMH |
| SEQ ID NO:59 (Kabat) | LCDR2 | DTSKLAS |
| SEQ ID NO:60 (Kabat) | LCDR3 | FQSGYPFT |
| SEQ ID NO:61 (Chothia) | LCDR1 | QLSVGY |
| SEQ ID NO:62 (Chothia) | LCDR2 | DTS |
| SEQ ID NO:63 (Chothia) | LCDR3 | GSGYPF |
| SEQ ID NO:64 (IMGT) | LCDR1 | LSVGY |

| | | |
|------------------------|--|--|
| SEQ ID NO:65 (IMGT) | LCDR2 | DTS |
| SEQ ID NO:66 (IMGT) | LCDR3 | FQSGYPFT |
| SEQ ID NO:67 | VL | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKAQLSVGIMHWYQQ KPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCFQSGYPFTFGGGTKLEIK |
| SEQ ID NO:68 | ДНК, кодирую щая VL | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGTCC GCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTGCAAG GCCAGCTGTCCGTGGGCTACATGCACTGGTATCAG CAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTAC GACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCAGA TTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCTGA CCATCTCCAGCCTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTA CTACTGTTTTCAAGGCTCCGGCTACCCCTTCACCTTC GGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG |
| SEQ ID NO:69 | Легкая цепь | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKAQLSVGIMHWYQQ KPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCFQSGYPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| SEQ ID NO:70 | ДНК, кодирую щая легкую цепь | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGTCC GCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTGCAAG GCCAGCTGTCCGTGGGCTACATGCACTGGTATCAG CAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTAC GACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCAGA TTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCTGA CCATCTCCAGCCTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTA CTACTGTTTTCAAGGCTCCGGCTACCCCTTCACCTTC GGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGT GGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGC CTGCTGAACAACCTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA |

| | | |
|--|--|--|
| | | CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGG ACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGA GCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCT GCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGA CCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC |
|--|--|--|

Пример 2. IgG.IL2R67A.H1 характеризуется удлиненным периодом полувыведения по сравнению с Proleukin® (IL-2)

[00226] Мышам CD-1, ранее не подвергавшимся экспериментам, вводили I.P. дозу, и собирали кровь от всех животных до введения дозы, через 1 час, 3, 7, 24, 31, 48, 55 и 72 часа после введения дозы. Образцы крови центрифугировали, и получали образцы плазмы крови. Полученные образцы плазмы крови переносили в одну полипропиленовую пробирку и замораживали при -80°C. Все образцы анализировали, и концентрации IgG.IL2R67A.H1 в плазме крови измеряли с помощью иммунологических анализов. Рассчитывали фармакокинетические параметры, такие как период полувыведения. Каждый образец анализировали в двух повторностях, при этом для каждого из дублирующих анализов требовалось 5 мкл образца, который был разбавлен 1:20. Захват: козье биотинилированное антитело к человеческому IL-2 (R&D Systems BAF202). Выявление: антитело к человеческому IL-2, конъюгированное с Alexa 647, клон MQ1-17H12 (Biolegend № 500315). Все иммунологические анализы проводили с помощью Gyrolab® Bioaffy200 с Gyros CD-200. Как показано на графике на фигуре 2, период полувыведения IgG.IL2R67A.H1 составляет примерно 12 часов и затем уменьшается в течение следующих 48 часов. Период полувыведения Proleukin® нельзя было показать на данном графике, поскольку его период полувыведения составляет примерно 4 часа.

Пример 3. IgG.IL2R67A.H1 обеспечивает избирательное размножение CD8+ эффекторных Т-клеток и лучше переносится, чем IL2-Fc или Proleukin®, нормальными мышами B6

[00227] IgG.IL2R67A.H1 обеспечивает увеличение количества CD8+ эффекторных Т-клеток по сравнению с Treg, не вызывая нежелательных явлений, наблюдаемых при введении Proleukin®. После введения дозы мышам в день 1 размножение CD8+ эффекторных Т-клеток отслеживали в день 4, день 8 и день 11. В каждый момент времени популяция CD8+ эффекторных Т-клеток характеризовалась значительным размножением без размножения Treg. Это отличалось от наблюдаемого в случае с Proleukin® и слитой конструкцией IL2-Fc, для которых при эквимоллярных дозах IL-2 наблюдались смертность и заболеваемость.

[00228] Самкам мышей B6 вводили Proleukin® (5x в неделю), IL2-Fc и IgG.IL2R67A.H1 (1x/неделя) в эквимоллярных концентрациях. Через восемь дней после первого этапа лечения селезенки обрабатывали с получением суспензии отдельных клеток и промывали в RPMI (10% FBS). Эритроциты лизировали буфером для лизиса эритроцитов (Sigma, № R7757), и для клеток определяли количество и жизнеспособность

клеток. Окрашивание для FACS осуществляли согласно стандартным протоколам с помощью буфера для FACS (1xPBS+0,5% BSA+0,05% азид натрия). Клетки окрашивали поверхностными антителами: крысиным антителом к мышиному CD3, конъюгированным с eFluor 450 (Ebioscience № 48-0032), антителом к мышиному CD4, конъюгированным с Pacific Blue (BD Pharmingen № 558107), крысиным антителом к мышиному CD8, конъюгированным с PerCp (BD Pharmingen № 553036), крысиным антителом к мышиному CD44, конъюгированным с FITC (Pharmingen № 553133), крысиным антителом к мышиному CD25, конъюгированным с APC (Ebioscience № 17-0251), крысиным антителом к мышиному Nk1.1 (Ebioscience № 95-5941) и затем фиксировали/пермеабелизировали и окрашивали на наличие FoxP3 с помощью набора для окрашивания с антителом к мышиному/крысиному FoxP3, конъюгированным с PE (Ebioscience № 72-5775). Клетки анализировали на Becton-Dickinson LSR Fortessa® или Becton-Dickinson FACS LSR II, и данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo®.

[00229] На фигурах 3A-3C показано предпочтительное размножение CD8+ эффекторных Т-клеток у самок мышей B6 после введения Proleukin® (5x в неделю), IL2-Fc и IgG.IL2R67A.H1 (1x/неделя) в концентрациях, эквивалентных Proleukin® (100 мкг IgG.IL2R67A.H1 и IL2-Fc ~ эквивалент 1 нмоль IL2). Данные на графиках демонстрируют, что CD8+ эффекторные Т-клетки пролиферируют без аналогичной пролиферации Treg. В отличие от этих данных, Proleukin® обеспечивал размножение как CD8+ эффекторных Т-клеток, так и Treg. Следует отметить, что IgG.IL2R67A.H1 превосходил слитую конструкцию IL2-Fc как по абсолютному количеству размножающихся CD8+ эффекторных Т-клеток, так и по соотношению CD8+ эффекторные Т-клетки:Treg, демонстрируя, что IgG.IL2R67A.H1 является структурной и функциональной основой белка на основе антитела с привитым цитокином. На фигурах 3D-3F показано, что благоприятный эффект IgG.IL2R67A.H1 был более выраженным при более высоких дозах. При введении мышам B6 500 мкг (эквивалента 5 нмоль IL2) IgG.IL2R67A.H1 наблюдалось предпочтительное размножение CD8+ эффекторных Т-клеток по сравнению с Treg-клетками аналогично более низким дозам. В то же время в группе лечения с помощью IL2-Fc было обнаружено, что мыши погибали всего лишь после однократной дозы на более высоком уровне (данные не показаны). Это указывает на то, что IgG.IL2R67A.H1 имеет более высокий терапевтический индекс, чем слитые конструкции IL2-Fc, и его можно безопасно вводить в более широком диапазоне доз.

Пример 4. IgG.IL2R67A.H1 обеспечивает избирательное размножение CD8+ эффекторных Т-клеток и лучше переносится, чем Proleukin®, мышами NOD

[00230] У мышей с сахарным диабетом без ожирения (NOD) спонтанно развивается сахарный диабет 1 типа, и они часто используются в качестве животной модели для сахарного диабета 1 типа у человека. Согласно тому же самому протоколу, который использовали для мышей B6, описанному в примере 3, IgG.IL2R67A.H1, IL2-Fc и Proleukin® вводили мышам NOD в эквивалентных эквивалентах Proleukin®. В этом случае

введение IgG.IL2R67A.H1 в данной дозе также обеспечивало предпочтительное размножение CD8⁺ эффекторных Т-клеток по сравнению с Treg, как показано на графике на фигуре 4А. Кроме того, при введении IgG.IL2R67A.H1 у мышей NOD не проявлялись побочные явления, в то время как в группе лечения с помощью Proleukin® 5 мышей находились в агональном состоянии, и 2 мыши умерли. Фигура 4В представляет собой график, на котором представлены дозы, кратность изменений числа клеток и тип клеток в мышинной модели NOD.

Пример 5. IgG.IL2R67A.H1 демонстрирует эффективность в качестве средства монотерапии в мышинной модели опухоли толстой кишки из клеток CT26

[00231] После изучения безопасности IgG.IL2R67A.H1 тестировали его эффективность в качестве средства монотерапии в мышинной модели из клеток CT26. Мышиные клетки CT26 представляют собой быстро растущие клетки карциномы толстой кишки IV стадии, используемые в более чем 500 опубликованных исследованиях, и представляют собой одну из широко используемых линий клеток и моделей при разработке лекарственных средств. Клетки CT26 (ATCC CRL-2638) выращивали в стерильных условиях в инкубаторе при 37°C с 5% CO₂. Клетки культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FBS. Клетки пассировали каждые 3-4 дня. В день инъекции клетки собирали (пассаж 11) и ресуспендировали в HBSS при концентрации 2,5x 10⁶/мл. Клетки тестировали с помощью Radil в отношении микоплазм и мышинных вирусов. Использовали мышей Balbc. Для каждой мыши 0,25x10⁶ клеток имплантировали путем подкожной инъекции в правый бок с использованием иглы 28 G (объем инъекции 100 мкл). После имплантации животных измеряли штангенциркулем и взвешивали 3 раза в неделю, после того как опухоли становились пальпируемыми. Измерения штангенциркулем использовали в расчетах согласно выражению (LxWxW)/2. Мышей кормили нормальным рационом и содержали в виварии SPF в соответствии с Руководством по уходу за лабораторными животными и их использованию и нормативными документами Институционального комитета по уходу за животными и их использованию.

[00232] Когда опухоли достигали приблизительно 100 мм³, мышам вводили внутрибрюшинным путем 12,5-100 мкг IgG.IL2R67A.H1. Опухоли измеряли дважды в неделю. Средние значения объема опухолей наносили на график с использованием программного обеспечения Prism 5 (GraphPad®). Конечная точка в исследованиях эффективности достигалась, когда размер опухоли достигал объема 1000 мм³. После инъекции у мышей также тщательно отслеживали признаки клинического ухудшения. Если по какой-либо причине у мышей проявлялись какие-либо признаки заболеваемости, в том числе респираторный дистресс, сгорбленная поза, уменьшение активности, паралич задних конечностей, тахипноэ как признак плеврального выпота, потеря массы тела на примерно 20% или 15% в сочетании с другими признаками, или их способность осуществлять нормальные виды активности (питание, передвижение) была нарушена, мышей умерщвляли.

[00233] IgG.IL2R67A.H1 был эффективным в мышинной модели из клеток CT26 в дозах в диапазоне от 12,5 мкг до 100 мкг, при этом имели место 4 введения IgG.IL2R67A.H1 в течение 17 дней в ходе 20-дневного исследования. Кривые объема опухоли, показанные на фигуре 5, свидетельствуют об эффективности IgG.IL2R67A.H1 в данном исследовании, поскольку объемы опухолей сохранялись на уровне до 200 мм в течение 15 дней и затем до 400 мм в течение оставшихся 5 дней.

Пример 6. IgG.IL2R67A.H1 и дополнительные противораковые терапевтические средства демонстрируют эффективность в мышинной модели из клеток B16

[00234] Для оценки эффективности IgG.IL2R67A.H1 в комбинации с другими противораковыми терапевтическими средствами использовали мышиную модель меланомы из клеток B16F10. Клетки B16F10 (ATCC CRL-6475) выращивали в стерильных условиях в инкубаторе при 37°C с 5% CO₂ в течение двух недель. Клетки B16F10 культивировали в DMEM+10% FBS. Клетки собирали и ресуспендировали в среде DMEM, не содержащей FBS, при концентрации 1×10⁶/100 мкл. Клетки B16F10 тестировали с помощью Radil в отношении микоплазм и мышинных вирусов. Клетки имплантировали в правый бок мышей B6 с помощью иглы 28 калибра (объем инъекции 100 мкл). После имплантации мышей измеряли штангенциркулем и взвешивали 2 раза в неделю, после того как опухоли становились пальпируемыми. Измерения штангенциркулем использовали в расчетах согласно выражению (L x W x W)/2.

[00235] В данном исследовании IgG.IL2R67A.H1 применяли в качестве средства монотерапии или в комбинации с антителом TA99, которое связывает антиген Tgp1, экспрессируемый на клетках B16F10. Слитую конструкцию IL2-Fc вводили в качестве средства монотерапии или в комбинации с антителом TA99. Для контроля антитело TA99 вводили в качестве средства монотерапии.

[00236] Неожиданным образом было обнаружено, что IgG.IL2R67A.H1 при введении в качестве средства монотерапии в дозе 500 мкг являлся наиболее эффективным средством лечения в данной модели (фигура 6). Следующим наиболее эффективным средством лечения была комбинация IgG.IL2R67A.H1 (100 мкг) и TA99. Данная комбинация была более эффективной, чем IgG.IL2F71A.H1 в качестве средства монотерапии при 100 мкг, TA99 в комбинации с IgG.IL2F71A.H1 при 500 мкг и IL2-Fc в качестве средства монотерапии или в составе комбинации IL2-Fc/TA99. При введении TA99 в качестве средства монотерапии оно не оказывало никакого эффекта, а средний объем опухоли был аналогичным наблюдаемому в контрольной группе, не получавшей лечения. Эти данные демонстрируют, что IgG.IL2R67A.H1 является эффективным в качестве средства монотерапии в опухолевой мышинной модели меланомы, однако он также является эффективным в паре с другим противоопухолевым средством.

Пример 7. Активность IgG.IL2R67A.H1 и IgG.IL2F71A.H1 в человеческих клетках

[00237] С целью тестирования активности IgG.IL2R67A.H1 в отношении

человеческих CD8⁺ эффекторных Т-клеток человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) анализировали в отношении активности pSTAT5. Клетки PBMC выдерживали в бессывороточной среде для тестирования и высевали. IgG.IL2R67A.H1, IgG.IL2F71A.H1 или Proleukin® добавляли к PBMC и инкубировали в течение 20 минут при 37°C. Через 20 минут клетки фиксировали 1,6% формальдегидом, промывали и окрашивали на поверхностные маркеры. Спустя 30 минут нахождения при комнатной температуре образцы промывали, и ресуспендированные клеточные осадки пермеабелизировали с помощью метанола при -20°C, промывали и окрашивали в отношении pSTAT5 и ДНК-интеркаляторов. Клетки анализировали на Cytotof®, а данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo® для количественной оценки уровня активности pSTAT5. Таблица на фигуре 7 демонстрирует, что при использовании IgG.IL2R67A.H1 наблюдалась предпочтительная активация CD8⁺ эффекторных Т-клеток, а активация Treg-клеток была сведена к минимуму.

Пример 8. Связывание белков на основе антител с привитым цитокином

[00238] Последовательности IL2, содержащие мутеин (SEQ ID NO:4), вставляли в CDR-петли остова, представляющего собой цепь иммуноглобулина. Белки на основе антител с привитым цитокином получали с использованием разнообразных известных последовательностей иммуноглобулинов, которые использовали в клинических условиях, а также последовательностей антител зародышевого типа. Антиген одного из применяемых антител представлял собой RSV. Для определения того, приводило ли прививание IL2 на CDR данного антитела к снижению или устранению связывания с RSV, проводили анализ ELISA в отношении белков RSV в PBS-буфере либо в карбонатном буфере. Как показано на фигуре 8, на это, по-видимому, влияло то, какая CDR была выбрана для прививания IL2. Например, IgG.IL2R67A.H1 характеризуется связыванием с RSV, аналогичным таковому у непривитого (немодифицированного) исходного антитела. В отличие от этого, прививание IL2 на CDR3 легкой цепи (CDR-L3) или CDR-H3 приводило к снижению связывания. Как и ожидалось, прививание IL2 на нерелевантное антитело (Xolair) приводит к отсутствию связывания. Это демонстрирует то, что белки на основе антител с привитым цитокином могут сохранять связывание с исходной мишенью остова антитела, или данное связывание может снижаться.

[00239] Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения в их свете будут предложены специалистам в данной области и должны быть включены в сущность и область действия настоящей заявки и объем прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, номера доступа последовательностей, патенты и заявки на патенты, упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий:
 - (a) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области, определяющие комплементарность (CDR), HCDR1, HCDR2, HCDR3; и
 - (b) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую LCDR1, LCDR2, LCDR3;и
 - (c) молекулу интерлейкина 2 (IL2), привитую на CDR VH или VL.
2. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 1, где молекула IL2 привита на CDR тяжелой цепи.
3. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 2, где CDR тяжелой цепи выбрана из области 1, определяющей комплементарность (HCDR1), области 2, определяющей комплементарность (HCDR2), и области 3, определяющей комплементарность (HCDR3).
4. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 3, где молекула IL2 привита на HCDR1.
5. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 1, где молекула IL2 привита на CDR легкой цепи.
6. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 5, где CDR легкой цепи выбрана из области 1, определяющей комплементарность (LCDR1), области 2, определяющей комплементарность (LCDR2), и области 3, определяющей комплементарность (LCDR3).
7. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-6, где молекула IL2 содержит мутацию, которая обеспечивает снижение аффинности молекулы IL2 в отношении высокоаффинного рецептора IL2.
8. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-7, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует пролиферацию CD8+ эффекторных Т-клеток в большей степени, чем рекомбинантный IL2 или Proleukin®.
9. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-8, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует пролиферацию CD4+ регуляторных Т-клеток в меньшей степени, чем рекомбинантный IL2 или Proleukin®.
10. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-9, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует пролиферацию NK-клеток в большей степени, чем рекомбинантный IL2 или Proleukin®.
11. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-10, где белок на основе антитела с привитым цитокином характеризуется более длительным периодом полувыведения, чем нативный IL2 или Proleukin®.
12. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-11, где молекула IL2 состоит из SEQ ID NO:4.
13. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-11, где молекула IL2 состоит из SEQ ID NO:6.

14. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-13, дополнительно содержащий тяжелую цепь антитела класса IgG.

15. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 14, где тяжелая цепь антитела класса IgG выбрана из IgG1, IgG2 и IgG4.

16. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-15, где специфичность связывания CDR с мишенью снижена на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, или 100% благодаря привитой молекуле IL2.

17. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-15, где специфичность связывания CDR с мишенью сохраняется на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, или 100% в присутствии привитой молекулы IL2.

18. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-17, где специфичность связывания CDR отличается от специфичности связывания молекулы IL2.

19. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-18, где специфичность связывания CDR направлена на антиген, отличный от человеческого.

20. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 19, где антиген, отличный от человеческого, представляет собой вирус.

21. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 20, где вирус представляет собой респираторно-синцитиальный вирус (RSV).

22. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 21, где RSV выбран из RSV подгруппы A и RSV подгруппы B.

23. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-22, где часть белка на основе антитела с привитым цитокином, представляющая собой остов антитела, является гуманизированной или человеческой.

24. Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO: 13, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:14, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:15, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит (d) LCDR1 под SEQ ID NO:29, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:30 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:31; или

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO:45, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:46, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:47; и вариабельную область легкой цепи, которая содержит (d) LCDR1 под SEQ ID NO:61, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:62 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:63.

25. Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO:19, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 35; или

(ii) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 51, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 67.

26. Белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-25, дополнительно содержащий модифицированную Fc-область, соответствующую сниженной эффекторной функции.

27. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 26, где модифицированная Fc-область содержит мутацию, выбранную из одной или нескольких из D265A, P329A, P329G, N297A, L234A и L235A.

28. Белок на основе антитела с привитым цитокином по п. 27, где модифицированная Fc-область содержит комбинацию мутаций, выбранную из одной или нескольких из D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A и P329G/L234A/L235A.

29. Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий HCDR1 под SEQ ID NO: 13, HCDR2 под SEQ ID NO:14, HCDR3 под SEQ ID NO:15, LCDR1 под SEQ ID NO:29, LCDR2 под SEQ ID NO:30, LCDR3 под SEQ ID NO:31, модифицированную Fc-область, содержащую мутацию D265A/P329A, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует активацию Treg-клеток в меньшей степени по сравнению с Proleukin®.

30. Белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий HCDR1 под SEQ ID NO: 45, HCDR2 под SEQ ID NO:46, HCDR3 под SEQ ID NO:47, LCDR1 под SEQ ID NO:61, LCDR2 под SEQ ID NO:62, LCDR3 под SEQ ID NO:63, модифицированную Fc-область, содержащую мутацию D265A/P329A, где белок на основе антитела с привитым цитокином стимулирует активацию Treg-клеток в меньшей степени по сравнению с Proleukin®.

31. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая белок на основе антитела с привитым цитокином, содержащий: (i) тяжелую цепь под SEQ ID NO:22 и легкую цепь под SEQ ID NO:38 или (ii) тяжелую цепь под SEQ ID NO:54 и легкую цепь под SEQ ID NO:70.

32. Рекомбинантная клетка-хозяин, подходящая для продуцирования белка на основе антитела с привитым цитокином, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 31, кодирующую полипептидные тяжелые и легкие цепи белка на основе антитела с привитым цитокином и необязательно сигнал секреции.

33. Рекомбинантная клетка-хозяин по п. 32, которая относится к линии клеток млекопитающего.

34. Рекомбинантная клетка-хозяин по п. 33, где линия клеток млекопитающего представляет собой линию клеток CHO.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая белок на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-30 и фармацевтически приемлемый носитель.

36. Способ лечения рака у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества белка на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-30 или фармацевтической композиции по п. 35.

37. Способ по п. 36, где рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легкого, колоректального рака, рака предстательной железы, рака молочной железы и лимфомы.

38. Способ по п. 36 или п. 37, где белок на основе антитела с привитым цитокином или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с другим терапевтическим средством.

39. Способ по п. 38, где терапевтическое средство представляет собой другой белок на основе антитела с привитым цитокином.

40. Способ по п. 38, где терапевтическое средство представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа.

41. Способ по п. 40, где контрольная точка иммунного ответа выбрана из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM3, CTLA-4, LAG-3, CEACAM-1, CEACAM-5, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR.

42. Способ обеспечения размножения CD8⁺ эффекторных Т-клеток в организме пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту белка на основе антитела с привитым цитокином по любому из пп. 1-30 или фармацевтической композиции по п. 35.

43. Способ по п. 42, где CD8⁺ эффекторные Т-клетки размножаются, а Трег-клетки не размножаются.

44. Способ по п. 42, где CD8⁺ эффекторные Т-клетки размножаются, а НК-клетки не размножаются.

45. Способ по любому из пп. 42-44, дополнительно включающий введение ингибитора контрольной точки иммунного ответа.

46. Способ по п. 45, где контрольная точка иммунного ответа выбрана из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM3, CTLA-4, LAG-3, CEACAM-1, CEACAM-5, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR.

47. Применение белка на основе антитела с привитым цитокином, содержащего:

(i) переменную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO: 13, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:14, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:15, и переменную область легкой цепи, которая содержит (d) LCDR1 под SEQ ID NO:29, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:30 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:31; или

(ii) переменную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 под SEQ ID NO:45, (b) HCDR2 под SEQ ID NO:46, (c) HCDR3 под SEQ ID NO:47; и переменную область легкой цепи, которая содержит (d) LCDR1 под SEQ ID NO:61, (e) LCDR2 под SEQ ID NO:62 и (f) LCDR3 под SEQ ID NO:63,

в лечении рака.

48. Применение по п. 47, где белок на основе антитела с привитым цитокином вводится в комбинации с другим терапевтическим средством.

49. Применение по п. 48, где терапевтическое средство представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа.

50. Применение по п. 49, где контрольная точка иммунного ответа выбрана из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM3, CTLA-4, LAG-3, CEACAM-1, CEACAM-5, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR.

Фигура 1**Конструирование белков для модулирования
избирательности в отношении IL2-R**

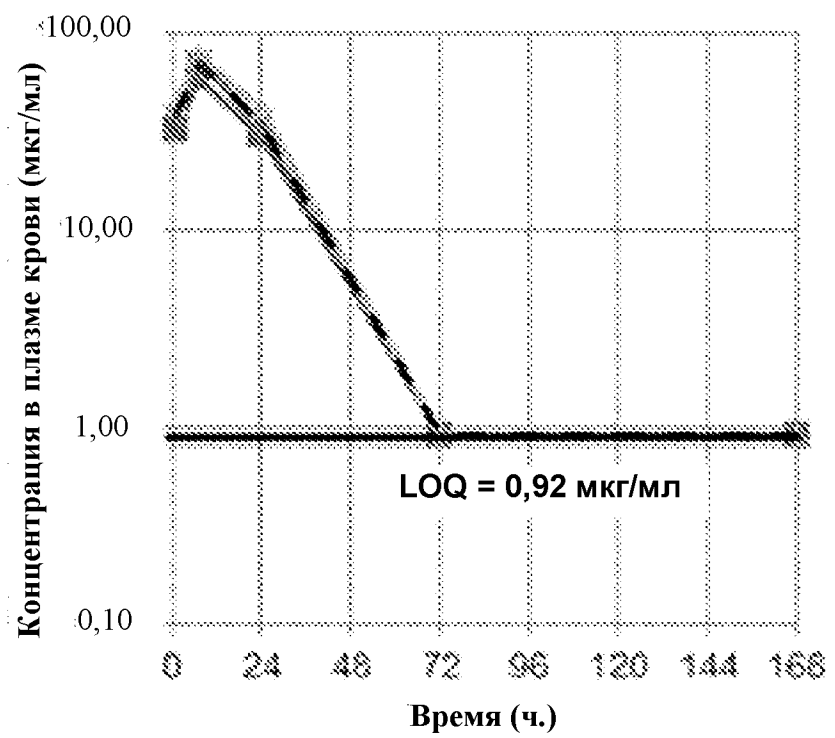
| Название | Выход (мг/л) | Агрега- ция (%) | Tm | LAL (EU/мг) | Формат | Treg (кратн. размн.) | NK (кратн. размн.) | CD8+ Teff (кратн. размн.) | IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (EC ₅₀ отн. IL-2) | IL-2R $\beta\gamma$ (EC ₅₀ отн. IL-2) |
|--------------------|-----------------|--------------------|-----------|----------------|------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------------|--|--|
| rhIL-2 (Proleukin) | N/A | N/A | N/A | N/A | Непривитос | 1,5 | 2,4 | 1,9 | 1 | 1 |
| IgG.IL2R67A.H1 | 5,6 | 0,01 | 70,9/73,2 | 0,85 | R38A в H1 | 1,5 | 1 | 3,6 | 0,03 | 96 |
| IgG.IL2F71A.H1 | 8,9 | 1,6 | 70,6/72,9 | 0,16 | R42A в H1 | 1,5 | 0,6 | 6,6 | 8 | 2 |
| GFTX3b-IL2-H1 | 9,6 | 1,8 | 68,6 | 0,95 | H1 | 1,5 | 0,8 | 2,1 | 1 | 0,3 |
| GFTX3b-IL2-H2 | 6,6 | 1,6 | 67,4 | 0,76 | H2 | 0,9 | 1,9 | 2,2 | 6 | 1 |
| GFTX3b-IL2-H3 | 6,8 | 2,3 | 67 | 0,96 | H3 | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 250 | 3400 |
| GFTX3b-IL2-L1 | 3,4 | 1,9 | 63,7/76,5 | 1,04 | L1 | 0,9 | 0,5 | 2 | 1 | 0,5 |
| GFTX3b-IL2-L2 | - | - | - | - | L2 | - | - | - | - | - |
| GFTX3b-IL2-L3 | 3,6 | 3,6 | 69,3 | 0,98 | L3 | 1,5 | 0,7 | 4,1 | 4 | 4 |

Фигура 2

IgG.IL2R67A.H1 характеризуется удлинённым периодом полувыведения по сравнению с Proleukin® (IL-2)

IgG.IL2R67A.H1, PK

10 мг/кг i.p.



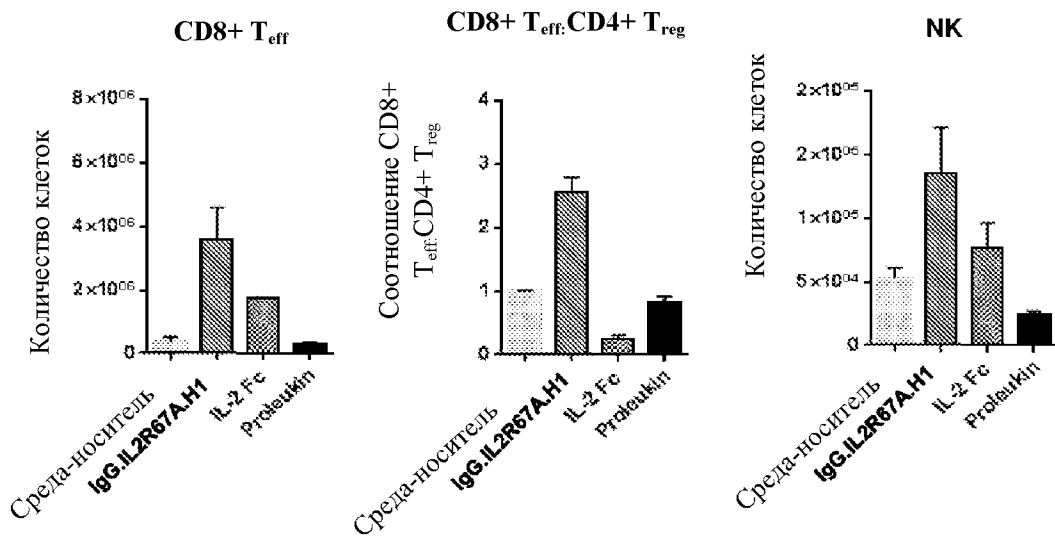
Фигура 3А

IgG.IL2R67A.H1/IL2-Fc, 100 мкг (~ 1 нмоль эквивалента IL-2), 4,3 мг/кг, в 1 дозе, даваемой в день 1

Proleukin, 3,41 мкг (1 нмоль IL-2), 0,14 мг/кг, в 5 последовательных ежедневных дозах/неделя

Популяции в селезенке

День 4



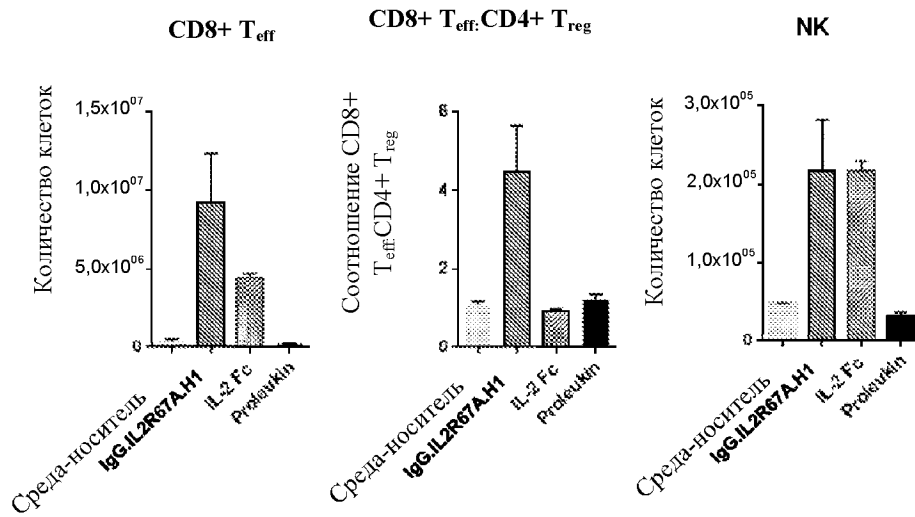
Фигура 3В

IgG.IL2R67A.H1/IL2-Fc, 100 мкг (~ 1 нмоль эквивалента IL-2), 4,3 мг/кг, в 1 дозе, даваемой в день 1

Proleukin, 3,41 мкг (1 нмоль IL-2), 0,14 мг/кг, в 5 последовательных ежедневных дозах/неделя

Популяции в селезенке

День 8



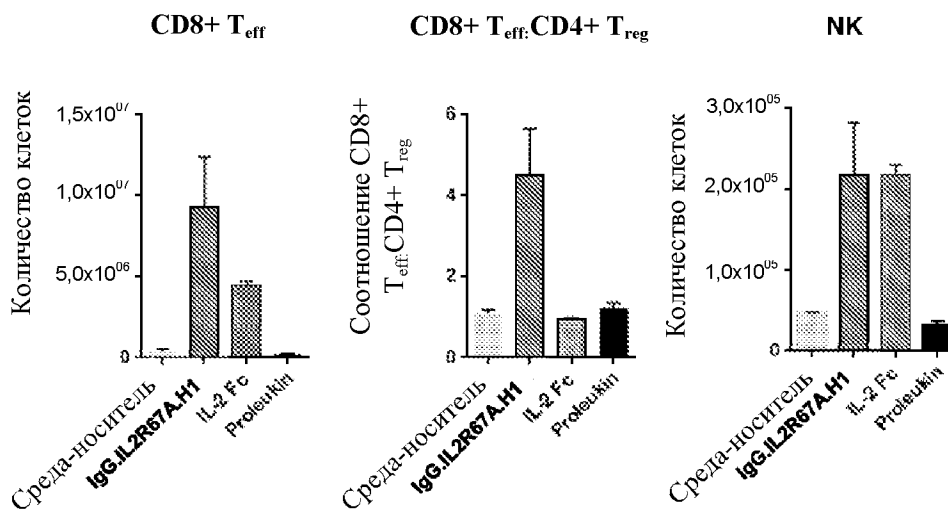
Фигура 3С

IgG.IL2R67A.H1/IL2-Fc, 100 мкг (~ 1 нмоль эквивалента IL-2), 4,3 мг/кг, в 1 дозе, даваемой в день 1

Proleukin, 3,41 мкг (1 нмоль IL-2), 0,14 мг/кг, в 5 последовательных ежедневных дозах/неделя

Популяции в селезенке

День 8

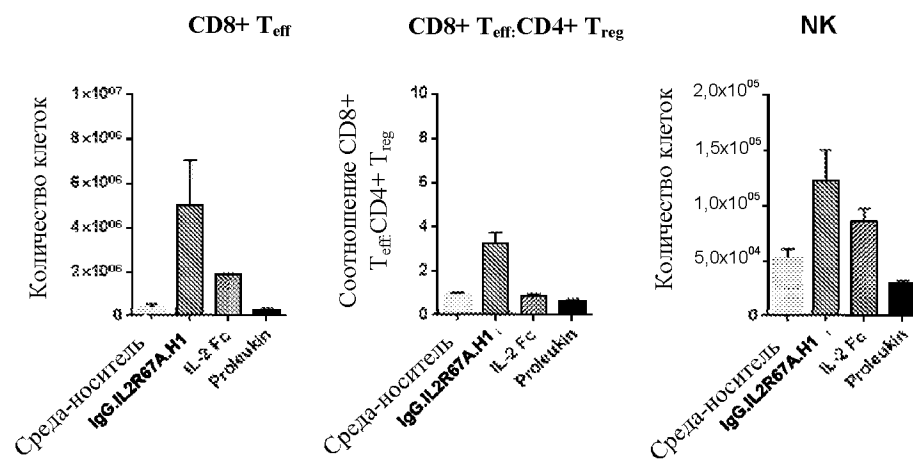


Фигура 3D

IgG.IL2R67A.H1/IL2-Fc, 500 мкг (~ 5 нмоль), 21,7 мг/кг, в 1 дозе, даваемой в день 1
Proleukin, 17,04 мкг (5 нмоль), 0,74 мг/кг, в 5 последовательных ежедневных
дозах/неделя

Популяции в селезенке

День 4

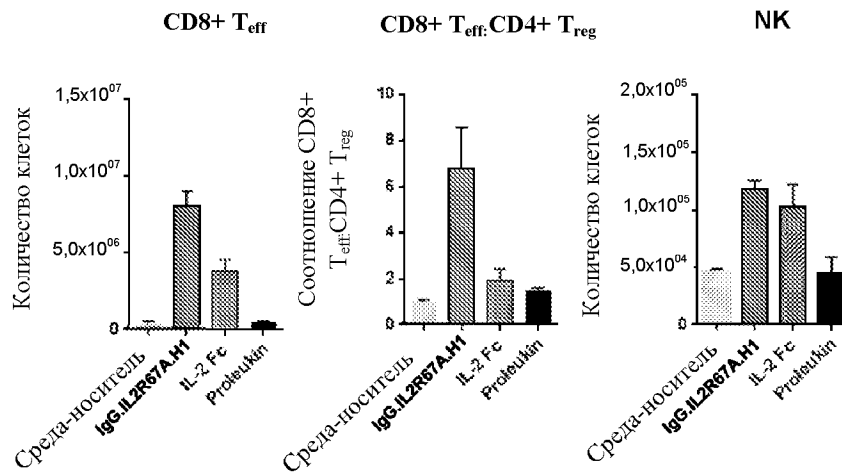


Фигура 3Е

**IgG.IL2R67A.H1/IL2-Fc, 500 мкг (~ 5 нмоль), 21,7 мг/кг, в 1 дозе, даваемой в день 1
Proleukin, 17,04 мкг (5 нмоль), 0,74 мг/кг, в 5 последовательных ежедневных
дозах/неделя**

Популяции в селезенке

День 8

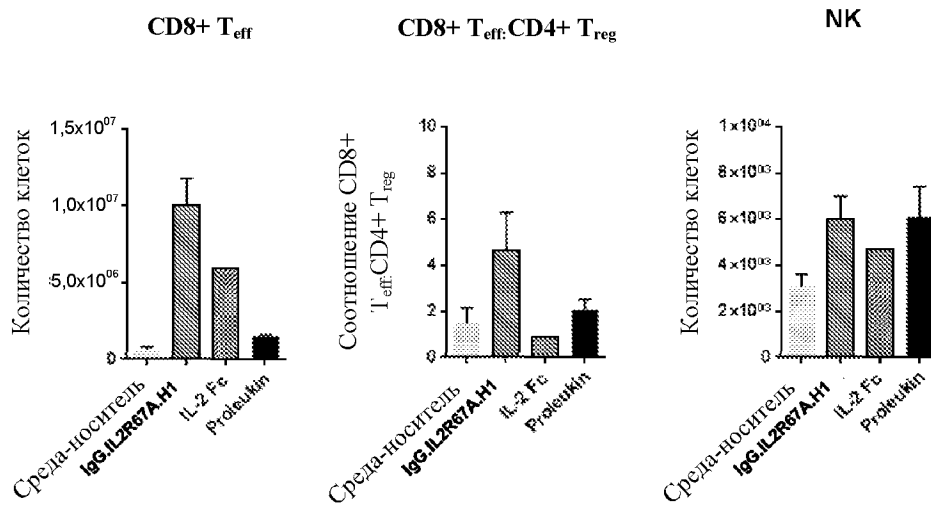


Фигура 3F

IgG.IL2R67A.H1/IL2-Fc, 500 мкг (~ 5 нмоль), 21,7 мг/кг, в 1 дозе, даваемой в день 1
Proleukin, 17,04 мкг (5 нмоль), 0,74 мг/кг, в 5 последовательных ежедневных
дозах/неделя

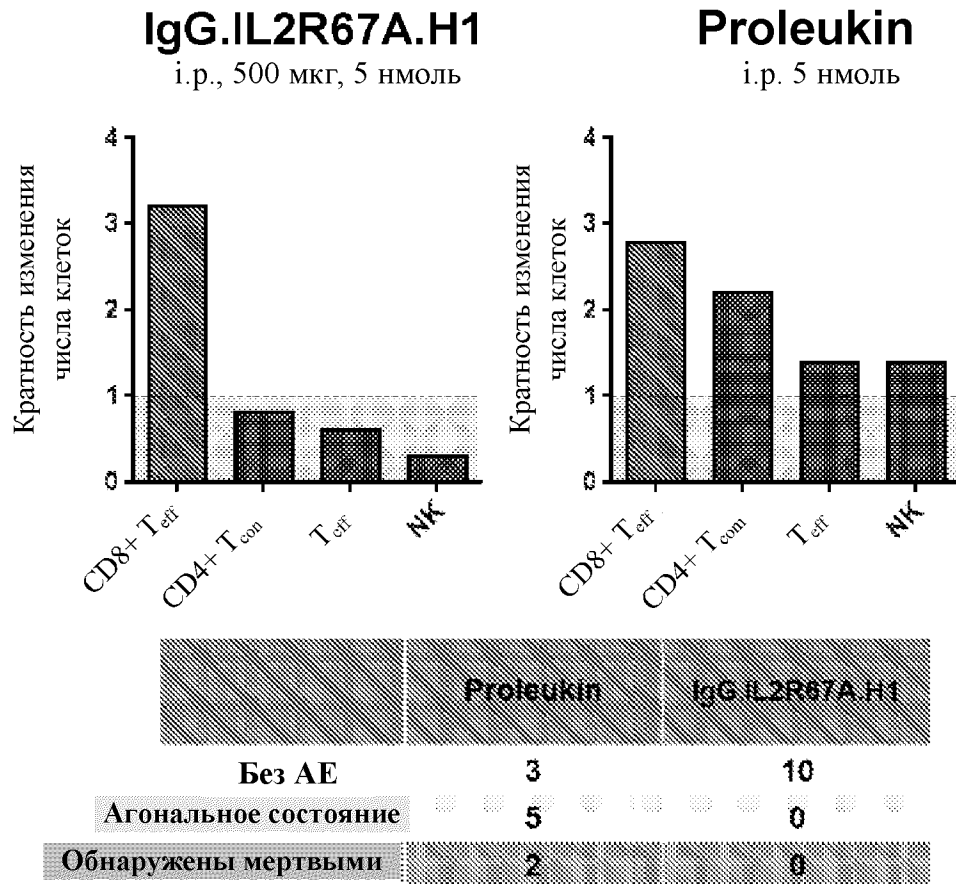
Популяции в селезенке

День 11



Фигура 4А

IgG.IL2R67A.H1 обеспечивает избирательное размножение CD8+ T_{eff} и лучше переносится, чем Proleukin®, мышами NOD



10/14

Фигура 4В

IgG.IL2R67A.H1 обеспечивает избирательное размножение CD8+ T_{eff} и лучше переносится, чем Proleukin®, мышами NOD

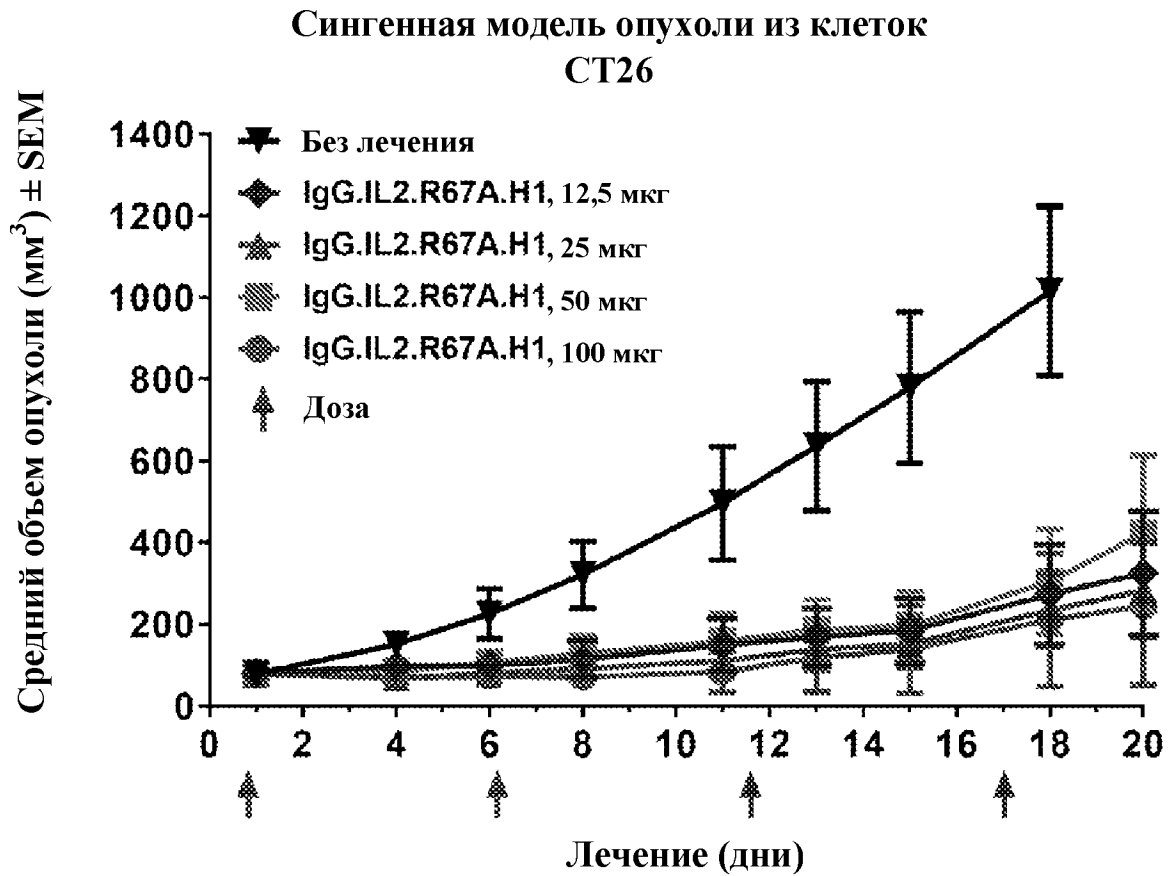
**Кратность изменений числа клеток у
мышей с преддиабетом**

(лечение в сравнении со средой-носителем)

| | Доза, нмоль, эквиваленты IL-2 на кг | IgG.IL2R67A.H1 | IgG.IL2R71A.H1 | IL-2 proleukin® |
|-----------------------|---|----------------|----------------|--------------------|
| CD8+ T _{eff} | 200 | 3,8 | 6,1 | 2,8 |
| | 40 | 1,7 | 2,2 | 0,9 |
| T _{reg} | 200 | 1,0 | 1,5 | 1,4 |
| | 40 | 0,9 | 1,2 | 1,1 |
| CD4+ T _{eff} | 200 | 1,1 | 1,2 | 1,1 |
| | 40 | 1,0 | 1,1 | 0,8 |
| NK | 200 | 0,4 | 0,7 | 1,2 |
| | 40 | 0,4 | 0,6 | 0,9 |

Фигура 5

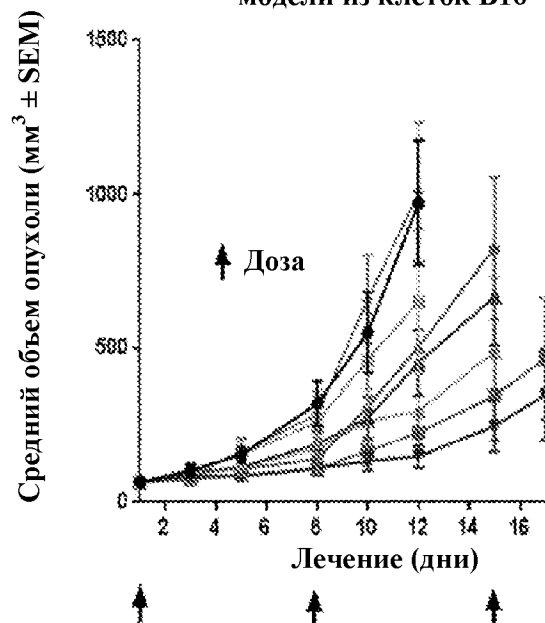
IgG.II2R67A.H1 демонстрирует эффективность в модели из клеток CT26



Фигура 6

**IgG.IL2R67A.H1 +/- TA99 демонстрирует
эффективность в модели из клеток B16**

**Эффективность в опухолевой
модели из клеток B16**



- Без лечения
- ▨ IL2-Fc, 12,5 мкг, QWx5 IV
- ✦ IgG.IL2R67A.H1, 100 мкг QWx5 IP
- ✧ IgG.IL2R67A.H1, 500 мкг QWx5 IP
- ▧ TA99, 100 мкг, QWx5 IV
- ✦ TA99 + IL2-Fc, 100 мкг + 12,5 мкг QWx5 IV
- ▧ TA99 + IgG.IL2R67A.H1, 100 мкг + 100 мкг QWx5 IV/IP
- ✧ TA99 + IgG.IL2R67A.H1, 100 мкг + 500 мкг QWx5 IV/IP

Фигура 7

Активность молекул с привитым ИЛ-2 в
человеческих клетках

| | Эквимольная концентрация привитого ИЛ-2 2 нМ | Кратность активности pSTAT5 | | | |
|---------------------|--|-----------------------------|----|------------------|-----|
| | | CD8 | НК | T _{reg} | CD4 |
| <i>pSTAT5 в CD8</i> | Proleukin (IL-2) | 102 | 71 | 30 | 300 |
| | GFTX3b_IL-2-H1 | 98 | 83 | 37 | 347 |
| | IgG_IL2R67A.H1 | 71 | 64 | 24 | 234 |
| | IgG_IL2F71A.H1 | 36 | 34 | 11 | 70 |
| | GFTX3b_IL-2-H2 | 20 | 28 | 13 | 142 |
| | GFTX3b_IL-2D113A | 4 | 12 | 15 | 118 |

Фигура 8