

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091973 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.11

(51) Int. Cl. C07K 16/30 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.03.01

(54) КОНСТРУКЦИИ СЛИТЫХ БЕЛКОВ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИ-MUC1 АНТИТЕЛО И IL-15

(31) 18159449.0; 18194290.5
(32) 2018.03.01; 2018.09.13
(33) EP
(86) PCT/EP2019/055125
(87) WO 2019/166617 2019.09.06
(71) Заявитель:
ГЛИКОТОП ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Геллерт Йоханна, Келер Патрик,
Екель Аника, Дикс Лаура,
Даниельчик Антье, Голец Штеффен
(DE)
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к конструкциям слитых белков, содержащим антитело к раковому антигену MUC1 и IL-15. В частности, конструкции слитых белков активируют НК-клетки и Т-клетки в месте расположения рака.

A1

202091973

202091973

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563990ЕА/060

КОНСТРУКЦИИ СЛИТЫХ БЕЛКОВ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИ-MUC1 АНТИТЕЛО И IL-15

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области антител. Предоставлен слитый белок, состоящий из антитела к раковому антигену и цитокина. В частности, в участке локализации рака слитый белок, за счет своей IL-15 части, активирует Т-клетки и натуральные (естественные) киллерные клетки (натуральные киллеры), связываясь с раковым антигеном MUC1. Разработка конструкций слитых белков демонстрирует явные преимущества в определенных условиях, в частности, высокоспецифическое нацеливание на опухолевые участки с сильным связыванием антигена и сильной активацией иммунных клеток. В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к терапевтическому и диагностическому применению этих конструкций слитых белков.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Цитокины являются перспективными лекарственными средствами для лечения рака, поскольку они модулируют иммунные ответы. Цитокины являются молекулярными мессенджерами, которые обеспечивают быстрое распространение сигнала между клетками иммунной системы для генерации скоординированного ответа на целевой антиген. В то время как многие формы распространения сигнала иммунной системы осуществляются через прямое межклеточное взаимодействие, секреция цитокинов обеспечивает быстрое распространение передачи сигналов иммунной системы универсальным и эффективным образом.

Цитокины стимулируют непосредственно иммунные эффекторные клетки и стромальные клетки в опухолевом участке и улучшают распознавание клеток опухоли цитотоксическими эффекторными клетками. Многочисленные исследования на животных моделях опухолей показали, что цитокины обладают широким спектром противоопухолевой активности, и на основании этого факта было разработано несколько подходов терапии рака, основанных на цитокинах. В последние годы в клинических испытаниях с участием пациентов с запущенным раком проводится тестирование ряда цитокинов, включая GM-CSF, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 и IL-21. В настоящее время проводится доклиническая работа, направленная на нейтрализацию супрессивных цитокинов, таких как IL-10 и TGF- β , с целью повышения противоопухолевого иммунитета.

В частности, интерлейкин-15 (IL-15) является привлекательным цитокином для терапии рака. IL-15 является цитокином, который стимулирует эффекторные иммунные ответы. Он индуцирует развитие, активацию и пролиферацию Т-клеток и натуральных киллеров (NK). IL-15 и α -цепь рецептора IL-15 экспрессируются на моноцитах, макрофагах и дендритных клетках и связываются с комплексом β -цепь рецептора IL-2/общая γ -цепь (IL2R $\beta\gamma_c$) на эффекторных иммунных клетках. IL-15 индуцирует высокий

уровень противоопухолевой цитотоксичности при использовании в комбинации с обычными антителами, нацеленными на опухоли *in vitro* и *in vivo*. Тем не менее, введение цитокинов часто затруднено из-за дозолимитирующей токсичности, препятствующей их применению в качестве эффективных модуляторов.

Исходя из вышесказанного, в данной области техники существует потребность в эффективном нацеливании цитокинов, таких как IL-15, на опухолевый участок. В качестве предпосылки для безопасной и эффективной иммуноцитокиновой терапии необходимо высокоспецифичное нацеливание на опухоль.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что интерлейкин 15 можно эффективно и специфически нацеливать на опухолевые участки при комбинировании его с анти-MUC1 антителами. ТА-MUC1 является новым углевод/белок смешанным эпитопом на опухолевом маркере MUC1, который практически отсутствует в нормальных клетках. ТА-MUC1 широко распространен среди раковых опухолей эпителиального происхождения различной этиологии, а также присутствует в метастазах и раковых стволовых клетках, лежащих в основе его широкого терапевтического потенциала. Связывание одновременно противоракового антигена MUC1 и $IL2R\beta\gamma_c$ обеспечивает активацию и пролиферацию NK и Т-клеток непосредственно в опухолевом участке. Авторы настоящего изобретения могут теперь продемонстрировать, что слитый белок, содержащий MUC1-специфическое антитело и IL-15, эффективно воздействует на раковые клетки и индуцирует ответ NK и Т-клеток против указанных раковых клеток.

Следовательно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к конструкции слитого белка, содержащей:

- (i) модуль антитела, специфически связывающийся с MUC1, и
- (ii) модуль IL-15.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей конструкцию слитого белка по изобретению. Кроме того, в третьем аспекте представлена экспрессионная кассета или вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по изобретению и промотор, функционально связанный с указанной нуклеиновой кислотой, и в четвертом аспекте представлена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту или экспрессионную кассету или вектор по изобретению.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей конструкцию слитого белка по изобретению.

Согласно шестому аспекту, изобретение относится к конструкции слитого белка или фармацевтической композиции по изобретению для применения в медицине, в частности для лечения рака или инфекций.

Другие объекты, признаки, преимущества и аспекты настоящего изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники из приведенного ниже описания и прилагаемой формулы изобретения. Однако следует понимать, что приведенное ниже описание, прилагаемая формула изобретения и конкретные примеры, в

которых описаны предпочтительные варианты осуществления заявки, приведены только в качестве иллюстрации. Различные изменения и модификации в пределах сущности и объема раскрытого изобретения станут легко очевидными для специалистов в данной области техники после ознакомления с приведенной ниже информацией.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В контексте настоящего описания, выражения, представленные ниже, как правило имеют приведенные ниже значения за исключением случаев, когда из контекста, в котором они используются, не следует иное.

Выражение «содержать», используемое в настоящем описании, помимо его буквального значения также включает и, в частности, относится к выражениям «по существу состоит из» и «состоит из». Таким образом, выражение «содержит» относится к вариантам осуществления, в которых объект изобретения, который «содержит» конкретно перечисленные элементы, не содержит дополнительных элементов, а также относится к вариантам осуществления, в которых объект изобретения, который «содержит» конкретно перечисленные элементы, может и/или действительно включает дополнительные элементы. Аналогично, выражение «иметь» следует понимать как выражение «содержит», также включающее и, в частности, ссылающееся на выражения «по существу состоит из» и «состоит из». Термин «по существу состоит из», где это возможно, в частности, относится к вариантам осуществления, в которых объект изобретения включает 20% или менее, в частности 15% или менее, 10% или менее или особенно 5% или менее других элементов в дополнение к конкретно перечисленным элементам, из которых состоит объект изобретения.

Используемый в настоящем описании термин «белок» относится к полипептиду или комбинации двух или более полипептидов или комплексу, содержащему один или более полипептидов и одну или более других молекул или ионов. Белок может содержать любые встречающиеся в природе аминокислоты, а также искусственные аминокислоты и может иметь биологическое или синтетическое происхождение. Полипептид(ы) белка может(могут) быть модифицирован(ы) естественным образом (посттрансляционные модификации) или синтетически, например, путем гликозилирования, амидирования, карбоксилирования, гидроксилирования и/или фосфорилирования. Полипептид содержит по меньшей мере две аминокислоты, но не обязательно должен быть какой-либо конкретной длины; этот термин не включает ограничение по размеру. Предпочтительно, полипептид содержит по меньшей мере 50 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 100 аминокислот, наиболее предпочтительно по меньшей мере 150 аминокислот.

Термин «конструкция слитого белка» относится к белку, в котором два или более полипептида, полученных из разных встречающихся в природе белков, искусственно объединены с образованием одного белка. Разные полипептиды, в частности, могут быть слиты друг с другом с образованием одной полипептидной цепи, содержащей указанные разные полипептиды.

Термины «белок» и «белковая конструкция», используемые в настоящем описании, относятся в определенных вариантах осуществления к популяции белков или белковых конструкций, соответственно, одного и того же вида. В частности, все белки или белковые конструкции популяции демонстрируют признаки, используемые для определения белка или белковой конструкции. В определенных вариантах осуществления все белки или белковые конструкции в популяции имеют одинаковую аминокислотную последовательность.

Термин «антитело», в частности, относится к белку, содержащему по меньшей мере две тяжелые цепи и две легкие цепи, связанные дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Константная область тяжелой цепи содержит три или, в случае антител типа IgM или IgE, четыре константных домена тяжелой цепи (CH1, CH2, CH3 и CH4), где первый константный домен CH1 находится рядом с вариабельной областью и может быть связан со вторым константным доменом CH2 через шарнирную область. Константная область легкой цепи состоит только из одного константного домена. Вариабельные области могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые перемежаются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR), причем каждая вариабельная область содержит три CDR и четыре FR. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области тяжелой цепи могут быть любого типа, такого как тяжелые цепи γ -, δ -, α -, μ - или ϵ -типа. Предпочтительно, тяжелая цепь антитела представляет собой γ -цепь. Кроме того, константная область легкой цепи также может быть любого типа, такого как легкие цепи κ - или λ -типа. Предпочтительно легкая цепь антитела представляет собой κ -цепь. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Антитело может быть, например, гуманизированным, человеческим или химерным антителом.

Антигенсвязывающая часть антитела обычно относится к полноразмерному антителу или одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов антитела включают Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} ; F(ab)₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области, каждый из которых связывается с одним и тем же антигеном; Fd-фрагмент, состоящий из доменов V_H и C_{H1} ; Fv-фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одного

плеча антитела; и dAb фрагмент, который состоит из домена V_H .

«Fab-часть» антитела, в частности, относится к части антитела, содержащей переменные области тяжелой и легкой цепей (V_H и V_L) и первые домены константных областей тяжелой и легкой цепей (C_{H1} и C_L). В тех случаях, когда антитело не включает все эти области, тогда термин «Fab-часть» относится только к тем областям V_H , V_L , C_{H1} и C_L , которые присутствуют в антителе. Предпочтительно, «Fab-часть» относится к той части антитела, которая соответствует фрагменту, полученному путем расщепления природного антитела папаином, который содержит антигенсвязывающую активность антитела. В частности, Fab-часть антитела включает антигенсвязывающий участок или его антигенсвязывающую способность. Предпочтительно, Fab-часть содержит по меньшей мере V_H область антитела.

«Fc-часть» антитела, в частности, относится к части антитела, содержащей константные области 2, 3 и, где применимо, 4 тяжелой цепи (C_{H2} , C_{H3} и C_{H4}). В частности, Fc-часть содержит две из каждого из этих областей. В тех случаях, когда антитело не содержит ни одну из этих областей, термин «Fc-часть» относится только к тем участкам C_{H2} , C_{H3} и C_{H4} , которые присутствуют в антителе. Предпочтительно, Fc-часть содержит по меньшей мере область C_{H2} антитела. Предпочтительно, «Fc-часть» относится к той части антитела, которая соответствует фрагменту, полученному путем расщепления природного антитела папаином, не содержащему антигенсвязывающую активность антитела. В частности, Fc-часть антитела способна связываться с Fc-рецептором и, таким образом, например, содержит участок связывания Fc-рецептора или способность связываться с Fc-рецептором.

Термины «антитело» и «конструкция антитела», используемые в настоящем описании, относятся в некоторых вариантах осуществления к популяции антител или конструкций антител, соответственно, одного и того же типа. В частности, все антитела или конструкции антител в популяции проявляют признаки, используемые для определения антитела или конструкции антитела. В определенных вариантах осуществления все антитела или конструкции антител в популяции имеют одну и ту же аминокислотную последовательность.

Используемый в настоящем описании термин «антитело» также включает фрагменты и производные указанного антитела. В частности, «фрагмент или производное» антитела, в частности, представляет собой белок или гликопротеин, который получен из указанного антитела и способен связываться с тем же антигеном, в частности с тем же эпитопом, что и антитело. Таким образом, фрагмент или производное антитела в настоящем описании обычно относится к функциональному фрагменту или производному. В особенно предпочтительных вариантах осуществления фрагмент или производное антитела содержит переменную область тяжелой цепи. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела или его производных. Примеры фрагментов антитела включают (i) Fab-фрагменты, одновалентные фрагменты, состоящие из переменной

области и первого константного домена каждой из тяжелой и легкой цепей; (ii) $F(ab)_2$ -фрагменты, двухвалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагменты, состоящие из переменной области и первого константного домена CH1 тяжелой цепи; (iv) Fv-фрагменты, состоящие из переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи одного плеча антитела; (v) scFv-фрагменты, Fv фрагменты, состоящие из одной полипептидной цепи; (vi) $(Fv)_2$ -фрагменты, состоящие из двух Fv-фрагментов, ковалентно связанных друг с другом; (vii) переменный домен тяжелой цепи; и (viii) полиантитела, состоящие из переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи, ковалентно связанные друг с другом таким образом, что возможна только внутримолекулярная, но не межмолекулярная, ассоциация переменной области тяжелой цепи с легкой цепью. В частности, производные антитела включают антитела, которые связываются с тем же антигеном, что и родительское антитело, но имеют аминокислотную последовательность, отличную от последовательности родительского антитела, из которого они были получены. Эти фрагменты и производные антител получают обычными методами, известными специалистам в данной области.

Целевая аминокислотная последовательность «получена» или «соответствует» эталонной аминокислотной последовательности, если целевая аминокислотная последовательность гомологична или идентична, с учетом всей длины, соответствующей части эталонной аминокислотной последовательности на по меньшей мере 75%, более предпочтительно на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%. «Соответствующая часть» означает, что, например, каркасная область 1 переменной области тяжелой цепи (FRH1) целевого антитела соответствует каркасной области 1 переменной области тяжелой цепи эталонного антитела. В конкретных вариантах осуществления целевая аминокислотная последовательность, которая «получена» или «соответствует» эталонной аминокислотной последовательности, является гомологичной на 100% или, в частности, идентичной на 100% по всей своей длине соответствующей части эталонной аминокислотной последовательности. В контексте изобретения, «гомологию» или «идентичность» аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности предпочтительно определяют относительно всей длины эталонной последовательности или относительно всей длины соответствующей части эталонной последовательности, которая соответствует той последовательности, гомологию или идентичность которой определяют. Антитело, полученное из родительского антитела, которое определяется одной или более аминокислотными последовательностями, такими как конкретные последовательности CDR или конкретные последовательности переменной области, в частности, представляет собой антитело, имеющее аминокислотные последовательности, такие как последовательности CDR или последовательности переменной области, которые являются на по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, по

меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологичными или идентичными, в особенности идентичными, соответствующим аминокислотным последовательностям родительского антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело, полученное из (т.е. производное) родительского антитела, содержит те же последовательности CDR, что и родительское антитело, но отличается остальными последовательностями вариабельных областей.

Термин «антитело», используемое в контексте настоящего описания, также относится к поливалентным и полиспецифическим антителам, т.е. конструкциям антител, которые имеют более двух связывающих участков, каждый из которых связывается с одним и тем же эпитопом, и конструкциям антител, которые имеют один или более связывающих участков, которые связываются с первым эпитопом, и один или более связывающих участков, которые связываются со вторым эпитопом, и, необязательно, дополнительные связывающие участки, которые связываются с дополнительными эпитопами.

«Специфическое связывание» предпочтительно означает, что агент, такой как антитело, сильнее связывается с мишенью, такой как эпитоп, по отношению к которой оно является специфическим, по сравнению со связыванием с другой мишенью. Агент связывается сильнее с первой мишенью по сравнению со второй мишенью, если он связывается с первой мишенью с константой диссоциации (K_d), которая ниже константы диссоциации для второй мишени. Предпочтительно константа диссоциации для мишени, с которой агент специфически связывается, более чем в 100 раз, 200 раз, 500 раз или более чем в 1000 раз ниже, чем константа диссоциации для мишени, с которой агент не связывается специфически. Кроме того, термин «специфическое связывание», в частности, указывает на сродство связывания между партнерами по связыванию с константой сродства (аффинности) K_a , составляющей по меньшей мере 10^6 M^{-1} , предпочтительно по меньшей мере 10^7 M^{-1} , более предпочтительно по меньшей мере 10^8 M^{-1} . В частности, антитело, специфическое к определенному антигену, относится к антителу, которое способно связываться с указанным антигеном со сродством, имеющим K_a , которая составляет по меньшей мере 10^6 M^{-1} , предпочтительно по меньшей мере 10^7 M^{-1} , более предпочтительно по меньшей мере 10^8 M^{-1} . Например, термин «анти-MUC1 антитело», в частности, относится к антителу, которое специфически связывается с MUC1, и предпочтительно способно связываться с MUC1 со сродством, имеющим K_a , которая составляет по меньшей мере 10^6 M^{-1} , предпочтительно по меньшей мере 10^7 M^{-1} , более предпочтительно по меньшей мере 10^8 M^{-1} .

Термин «модуль антитела», упомянутый в настоящем описании, относится к полипептидной конструкции, которая получена из антитела и способна специфически связываться с антигеном. В частности, модуль антитела содержит по меньшей мере одну, в основном две тяжелые цепи антитела и, необязательно, по меньшей мере одну, в основном две легкие цепи антитела.

Используемый в настоящем описании термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептидной конструкции, которая получена из антитела, способна специфически связываться с антигеном, но не включает все элементы природного антитела. В частности, антигенсвязывающий фрагмент не содержит некоторые или все константные домены антитела и может содержать только один, а не два антигенсвязывающих участка.

«Антигенсвязывающий участок», в частности, содержит по меньшей мере одну переменную область антитела, например переменную область тяжелой цепи антитела. В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела. Переменная область тяжелой цепи антитела и переменная область легкой цепи антитела антигенсвязывающего участка могут быть расположены друг за другом с использованием антигенного каркаса, в частности домена CH1 и домена CL, и/или могут быть слиты друг с другом через пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок представляет собой одноцепочечный фрагмент переменной области (scFv).

«IL-15» относится к цитокиновому интерлейкину 15, в частности к человеческому интерлейкину 15. IL-15 представляет собой белок, имеющий структуру пучка из четырех α -спиралей, который экспрессируется с N-концевого сигнального пептида. В зрелом IL-15 сигнальный пептид отщепляется, и белок гликозилируется, и его масса составляет примерно 14-15 кДа. IL-15 связывается с α -цепью рецептора IL-15, в частности со своим доменом sushi, и с комплексом β -цепь рецептора IL-2/общая γ -цепь рецептора интерлейкинов (общая γ -цепь).

Термин «MUC1» относится к белку MUC1, также известному как муцин-1, полиморфному эпителиальному муцину (PEM) или раковому антигену 15-3, в частности к человеческому MUC1. MUC1 является членом семейства муцинов и кодирует связанный с мембраной гликозилированный фосфопротеин. MUC1 имеет массу ядерного белка 120-225 кДа, которая увеличивается до 250-500 кДа при гликозилировании. Он простирается на 200-500 нм за пределы поверхности клетки. Белок прикрепляется к апикальной поверхности многих эпителиальных клеток с помощью трансмембранного домена. Внеклеточный домен включает домен tandemных повторов из 20 аминокислот (VNTR), причем количество повторов у разных индивидуумов варьирует от 20 до 120. Эти повторы богаты сериновыми, треониновыми и пролиновыми остатками, которые допускают O-гликозилирование тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления термин «MUC1» относится к ассоциированному с опухолью MUC1 («TA-MUC1»). TA-MUC1 представляет собой MUC1, присутствующий на раковых клетках. Этот MUC1 отличается от MUC1, присутствующего на нераковых клетках, гораздо более высоким уровнем экспрессии, локализацией и гликозилированием. В частности, TA-MUC1 присутствует на раковых клетках неполярно на всей клеточной поверхности, тогда как в нераковых клетках MUC1 экспрессируется строго апикально и, следовательно, недоступен для системно вводимых

антител. Кроме того, ТА-MUC1 имеет aberrантное O-гликозилирование, которое обнажает новый пептидный эпитоп на осто́ве белка MUC1 и новые углеводные антигены опухоли, такие как альфа антиген Томсена-Фриденрайха (TF α).

«TF α », также называемый альфа антигеном Томсена-Фриденрайха или Core-1, относится к дисахариду Gal- β 1,3-GalNAc, который связан через O-гликозидную связь в альфа-аномерной конфигурации с гидроксиаминокислотами, серином или треонином, белков в клетках карциномы.

«Относительное количество гликанов», в контексте настоящего изобретения, относится к определенному проценту или процентному диапазону гликанов, прикрепленных к антителам в препарате антител или в композиции, содержащей антитела, соответственно. В частности, относительное количество гликанов относится к определенному проценту или процентному диапазону всех гликанов, содержащихся в антителах и, таким образом, связанных с полипептидными цепями антител в препарате антитела или композиции, содержащей антитела. 100% гликанов относится ко всем гликанам, связанным с антителами в препарате антител или в композиции, содержащей антитела, соответственно. Например, относительное количество содержащих фукозу гликанов, равное 10%, относится к композиции, содержащей антитела, в которой 10% всех гликанов, содержащихся в антителах и, таким образом, связанных с полипептидными цепями антител в указанной композиции, содержат остаток фукозы, в то время как 90% всех гликанов, содержащихся в антителах и, таким образом, связанных с полипептидными цепями антител в указанной композиции, не содержат остаток фукозы. Соответствующее эталонное количество гликанов, составляющее 100%, может относиться либо к гликановым структурам, все из которых присоединены к антителам в композиции, либо к N-гликанам, т.е. гликановым структурам, все из которых присоединены к остатку аспарагина антител в композиции, или к гликанам, все из которых являются комплексного типа. Специалист в данной области обычно в явном виде указывает эталонную группу гликановых структур или непосредственно получает ее в зависимости от обстоятельств.

Термин «N-гликозилирование» относится ко всем гликанам, присоединенным к остаткам аспарагина полипептидной цепи белка. Эти остатки аспарагина обычно являются частью сайтов N-гликозилирования, имеющих аминокислотную последовательность Asn-Xaa-Ser/Thr, где Xaa может представлять собой любую аминокислоту, кроме пролина. Аналогично, «N-гликаны» представляют собой гликаны, присоединенные к остаткам аспарагина полипептидной цепи. Термины «гликан», «структура гликана», «углевод», «углеводная цепь» и «структура углевода» как правило используются в настоящем описании синонимично. N-гликаны обычно имеют общую структуру ядра, состоящую из двух остатков N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и трех остатков маннозы, имеющих структуру Man α 1,6-(Man α 1,3-)Man β 1,4-GlcNAc β 1,4-GlcNAc β 1-Asn с Asn, который является остатком аспарагина полипептидной цепи. N-гликаны подразделяются на три различных типа, а именно гликаны комплексного типа, гликаны гибридного типа и гликаны с высоким содержанием маннозы.

Числа, приведенные в настоящем описании, в частности относительные количества конкретного свойства гликозилирования, предпочтительно следует понимать как приблизительные числа. В частности, числа предпочтительно могут быть на 10% выше и/или ниже, в частности, на 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% выше и/или ниже.

Термин «нуклеиновая кислота» включает одноцепочечные и двухцепочечные нуклеиновые кислоты и рибонуклеиновые кислоты, а также дезоксирибонуклеиновые кислоты. Она может содержать встречающиеся в природе, а также синтетические нуклеотиды и может быть модифицирована естественным образом или синтетически, например, путем метилирования, кэпирования 5'- и/или 3'-конца.

Термин «экспрессионная кассета», в частности, относится к конструкции нуклеиновой кислоты, которая способна обеспечивать и регулировать экспрессию введенной в нее кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты. Экспрессионная кассета может содержать промоторы, сайты связывания рибосом, энхансеры и другие контрольные элементы, которые регулируют транскрипцию гена или трансляцию мРНК. Точная структура экспрессионной кассеты может меняться в зависимости от вида или типа клетки, но обычно она содержит 5'-нетранскрибируемые и 5'- и 3'-нетранслируемые последовательности, которые участвуют в инициации транскрипции и трансляции, соответственно, такие как ТАТА-бокс, последовательность кэпирования, последовательность СААТ и т.п. Более конкретно, 5'-нетранскрибируемые экспрессионные контрольные последовательности содержат промоторную область, которая включает промоторную последовательность для контроля транскрипции функционально связанной нуклеиновой кислоты. Экспрессионные кассеты также могут содержать энхансерные последовательности или последовательности активатора, расположенные выше.

Согласно изобретению, термин «промотор» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая расположена выше (5') последовательности нуклеиновой кислоты, предназначенной для экспрессии, и контролирует экспрессию этой последовательности, обеспечивая участок узнавания и связывания для РНК-полимераз. «Промотор» может включать дополнительные участки узнавания и связывания для других факторов, которые участвуют в регуляции транскрипции гена. Промотор может контролировать транскрипцию прокариотического или эукариотического гена. Кроме того, промотор может быть «индуцибельным», т.е. способным инициировать транскрипцию в ответ на индуцирующий агент, или может быть «конститутивным», если транскрипция не контролируется индуцирующим агентом. В отсутствие индуцирующего агента ген, который находится под контролем индуцибельного промотора, не экспрессируется или экспрессируется лишь в незначительной степени. В присутствии индуцирующего агента ген включается или увеличивается уровень транскрипции. Как правило, это опосредуется связыванием специфического фактора транскрипции.

Термин «вектор» используется в настоящем описании в своем наиболее общем значении и содержит любой промежуточный носитель для нуклеиновой кислоты, который

позволяет введение указанной нуклеиновой кислоты, например, в прокариотические и/или эукариотические клетки и, где это целесообразно, интеграцию указанной нуклеиновой кислоты в геном. Векторы такого типа предпочтительно реплицируются и/или экспрессируются в клетках. Векторы включают плазмиды, фагемиды, бактериофаги или вирусные геномы. Используемый в настоящем описании термин «плазмида» обычно относится к конструкции внехромосомного генетического материала, обычно дуплекса кольцевой ДНК, который может реплицироваться независимо от хромосомной ДНК.

Согласно изобретению, термин «клетка-хозяин» относится к любой клетке, которая может быть трансформирована или трансфицирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Термин «клетки-хозяева» включает в соответствии с изобретением прокариотические (например, *E.coli*) или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих, в частности клетки человека, клетки дрожжей и клетки насекомых). Особое предпочтение отдается клеткам млекопитающих, таким как клетки человека, мышей, хомяков, свиней, коз или приматов. Клетки могут быть получены из нескольких типов тканей и включают первичные клетки и клеточные линии. Нуклеиновая кислота может присутствовать в клетке-хозяине в форме одной копии или двух или более копий и, в одном из вариантов осуществления, экспрессируется в клетке-хозяине.

Согласно изобретению, термин «пациент» означает человека, примата, не являющегося человеком, или другого животного, в частности млекопитающего, такого как корова, лошадь, свинья, овца, коза, собака, кошка или грызун, такой как мышь и крыса. В особо предпочтительном варианте осуществления пациент является человеком.

Термин «рак» согласно изобретению, в частности, включает лейкозы, саркомы, меланомы, карциномы, тератомы, лимфомы, саркомы, мезотелиомы, нейробластомы, глиомы, рак прямой кишки, рак эндометрия, рак почки, рак надпочечников, рак щитовидной железы, рак крови, рак кожи, рак головного мозга, рак шейки матки, интестинальный рак, рак печени, рак толстой кишки, рак желудка, рак кишечника, рак головы и шеи, рак желудочно-кишечного тракта, рак лимфатических узлов, рак пищевода, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак уха, носа и горла (ЛОР), рак молочной железы, рак простаты, рак мочевого пузыря, рак матки, рак яичников и рак легких и его метастазы. Термин рак, согласно изобретению, также включает метастазы рака.

«Опухолью» означает группу клеток или ткань, которая образована неправильно регулируемой клеточной пролиферацией. Опухоли могут демонстрировать частичное или полное отсутствие структурной организации и функциональной координации с нормальной тканью и обычно образуют отдельную массу ткани, которая может быть доброкачественной или злокачественной.

«Метастазирование» означает распространение раковых клеток из исходного участка в другую часть тела. Формирование метастазов является очень сложным процессом и обычно включает отделение раковых клеток от первичной опухоли, попадание в кровоток и оседание с последующим ростом в нормальных тканях в других

частях тела. Когда опухолевые клетки метастазируют, новую опухоль называют вторичной или метастатической опухолью, и ее клетки обычно напоминают клетки исходной опухоли. Это означает, например, что, если рак молочной железы метастазирует в легкие, вторичная опухоль состоит из аномальных клеток молочной железы, а не аномальных клеток легкого. В таком случае, опухоль в легких называют метастатическим раком молочной железы, а не раком легких.

Термин «фармацевтическая композиция», в частности, относится к композиции, подходящей для введения человеку или животному, т.е. к композиции, содержащей компоненты, которые являются фармацевтически приемлемыми. Фармацевтическая композиция предпочтительно содержит активное соединение или его соль или пролекарство вместе с носителем, разбавителем или фармацевтическими вспомогательными веществами, такими как буфер, консервант и модификатор тоничности.

Числовые диапазоны, приведенные в настоящем описании, включают числа, определяющие диапазон. Заголовки, представленные в настоящем описании, не являются ограничением различных аспектов или вариантов осуществления настоящего изобретения, продемонстрированных со ссылкой на описание в целом. Согласно одному из вариантов осуществления объект изобретения, раскрытый в настоящем описании как включающий определенные этапы, в случае способов, или как содержащий определенные ингредиенты, в случае композиций, относится к объекту изобретения, состоящему из соответствующих этапов или ингредиентов. Предпочтительным также является выбор и объединение предпочтительных аспектов и вариантов осуществления, раскрытых в настоящем описании, и конкретный объект изобретения, основанный на соответствующей комбинации предпочтительных вариантов осуществления, также включен в настоящее раскрытие.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано на разработке конструкций слитых белков, в которых IL-15 или его варианты слиты с антираковым антителом, нацеленным на MUC1. Традиционное анти-MUC1 антитело проявляет свою противораковую активность, связываясь с ассоциированным с опухолью MUC1 и рекрутирующими и активирующими цитотоксическими иммунными клетками. Связывание и активация иммунных клеток, в частности клеток, природных киллеров (NK-клеток), достигается посредством взаимодействия Fc-части антитела с рецепторами Fcγ, особенно FcγRIIIa, на иммунных клетках. После активации инициируется антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC). Ввиду этого авторы настоящего изобретения дополнительно улучшили эффективность традиционного анти-MUC1 антитела путем присоединения к этим антителам IL-15 или комбинации IL-15 и домена sushi α-цепи рецептора IL-15. IL-15 представляет собой цитокин, который индуцирует развитие, активацию и пролиферацию NK, NKT и T-клеток.

Авторы изобретения смогли продемонстрировать, что слитая конструкция анти-

MUC1 антитела PankoMab и IL-15 эффективно активирует и рекрутирует иммунные клетки и индуцирует лизис опухолевых клеток. Тонкая регулировка активности может быть достигнута путем использования активной или неактивной Fc-части антитела, которая либо является гликозилированным естественным образом и способна взаимодействовать с Fc-рецепторами, либо инактивирована путем удаления сайта гликозилирования. Кроме того, активность IL-15 также можно контролировать с помощью нативного IL-15 или мутантного варианта с пониженным сродством связывания с рецептором, а также путем его объединения с доменом sushi α -субъединицы рецептора IL-15. Как правило, анти-MUC1 антитело с функциональной Fc-частью, слитой с нативным IL-15 без домена sushi, обеспечивает наилучший баланс сродства связывания с мишенью, надежной функциональности и безопасности с высокой противоопухолевой активностью, низкой нецелевой активностью и благоприятным фармакокинетическим поведением с длительным периодом полувыведения.

Кроме того, авторы изобретения показали, что IL-15 может быть слит с анти-MUC1 антителом в разных местах, например, на С-конце тяжелой цепи, С-конце легкой цепи и N-конце легкой цепи, все из которых обеспечивают получение функциональных слитых конструкций. Наилучшую активность, а также фармакокинетические и фармакодинамические параметры неожиданно наблюдали при слиянии IL-15 с С-концом тяжелой цепи антитела.

Ввиду этого настоящее изобретение относится к конструкции слитого белка, содержащей:

- (i) модуль антитела, специфически связывающийся с MUC1, и
- (ii) модуль IL-15.

Модуль анти-MUC1 антитела

Модуль антитела, специфически связывающийся с MUC1 (модуль анти-MUC1 антитела), содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий участок, специфически связывающийся с эпитопом MUC1. В некоторых вариантах осуществления модуль антитела содержит, по меньшей мере, два, в основном ровно два антигенсвязывающих участка, специфически связывающихся с эпитопом MUC1. Эти антигенсвязывающие участки могут быть разными или идентичными и, в частности, могут иметь одинаковую аминокислотную последовательность. В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающие участки модуля антитела содержат переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела.

В некоторых вариантах осуществления модуль анти-MUC1 антитела содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь антитела. В некоторых вариантах осуществления модуль антитела содержит две тяжелые цепи антитела. В частности, тяжелые цепи антитела включают домен VH, домен CH1, шарнирную область, домен CH2 и домен CH3. В некоторых других вариантах осуществления тяжелые цепи антитела содержат домен CH2 и домен CH3, но не содержат домен CH1. В других вариантах осуществления один или более константных доменов тяжелых цепей могут быть заменены другими доменами,

в частности аналогичными доменами, такими как, например, альбумин. Тяжелые цепи антитела могут быть любого типа, включая γ -, α -, ε -, δ - и μ -цепи, и предпочтительно представляют собой γ -цепи, включая $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ -, $\gamma 3$ - и $\gamma 4$ -цепи, в основном $\gamma 1$ -цепи. Следовательно, модуль антитела предпочтительно представляет собой модуль антитела типа IgG, в частности модуль антитела типа IgG1.

В предпочтительных вариантах осуществления модуль антитела содержит Fc-область. Модуль антитела, в частности, может представлять собой цельное антитело, содержащее две тяжелые цепи, каждая из которых содержит домены VH, CH1, шарнирную область, CH2 и CH3, и две легкие цепи, каждая из которых содержит домены VL и CL. Модуль антитела, в частности, способен связываться с одним или более человеческими Fc γ -рецепторами, в основном человеческим Fc γ -рецептором 3A. В некоторых вариантах осуществления модуль антитела не связывается или, по существу, не связывается с человеческими Fc γ -рецепторами. В этих вариантах осуществления модуль антитела, в частности, не содержит сайт гликозилирования в домене CH2. В некоторых вариантах осуществления тяжелые цепи модуля антитела не содержат С-концевой остаток лизина, например С-концевой лизин, кодируемый человеческим геном тяжелой $\gamma 1$ -цепи антитела. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления один или более из последних трех аминокислотных остатков на С-конце тяжелой цепи могут быть удалены и/или замещены. Например, последние две или последние три аминокислоты могут быть удалены, или С-концевая последовательность PGK может быть мутирована, например, путем замены лизина аланином, глицина аланином или серином или пролина лейцином, или их комбинацией. Используемые в настоящем описании термины «тяжелая цепь» и «CH3» включают варианты, содержащие такие делеции и/или мутации.

В частности, модуль антитела дополнительно содержит по меньшей мере одну легкую цепь антитела, в основном две легкие цепи антитела. В частности, легкие цепи антитела содержат домен VL и домен CL. Легкая цепь антитела может представлять собой к-цепь или λ -цепь и в основном представляет собой к-цепь. В некоторых вариантах осуществления модуль антитела содержит две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела.

В альтернативных вариантах осуществления модуль антитела не содержит легкую цепь антитела. В этих вариантах осуществления тяжелые цепи антитела модуля антитела могут дополнительно содержать переменную область легкой цепи. В частности, переменная область легкой цепи слита с N-концом тяжелой цепи или вставлена в С-конец переменной области тяжелой цепи. Для соединения переменной области легкой цепи с остальными частями тяжелой цепи могут присутствовать пептидные линкеры.

В конкретных вариантах осуществления модуль антитела содержит переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела. Эти переменные области могут быть ковалентно связаны друг с другом, например, с помощью пептидного линкера. В определенном варианте осуществления модуль антитела содержит полипептидную цепь, содержащую, в основном в направлении от N-конца к С-

концу, вариабельную область тяжелой цепи антитела, пептидный линкер и вариабельную область легкой цепи антитела. В частности, модуль антитела может представлять собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

Модуль анти-MUC1 антитела специфически связывается с эпитопом MUC1. Эпитоп может быть специфическим к MUC1, т.е. он не присутствует в других молекулах, или может быть эпитопом, который также можно обнаружить в других молекулах.

В некоторых вариантах осуществления модуль антитела связывается с MUC1 зависимым от гликозилирования образом. В частности, модуль антитела сильнее связывается с MUC1, если он гликозилирован, особенно если он гликозилирован во внеклеточных tandemных повторах. В конкретных вариантах осуществления модуль антитела сильнее связывается с MUC1, если он O-гликозилирован N-ацетилгалактозамином (Tn), сиалил(α 2-6)N-ацетилгалактозамином (sTn), галактоза(β 1-3)N-ацетилгалактозамином (TF) или галактоза(β 1-3)(сиалил(α 2-6))N-ацетилгалактозамином (sTF), предпочтительно Tn или TF.

В некоторых вариантах осуществления модуль антитела специфически связывается с эпитопом во внеклеточных tandemных повторах MUC1. В частности, модуль антитела связывается сильнее, если указанные tandemные повторы гликозилированы по остатку треонина N-ацетилгалактозамином (Tn), сиалил(α 2-6)N-ацетилгалактозамином (sTn), галактоза(β 1-3)N-ацетилгалактозамином (TF) или галактоза(1-3)(сиалил(2-6))N-ацетилгалактозамином (sTF), предпочтительно Tn или TF. Предпочтительно, углеводный фрагмент связан с остатком треонина α -O-гликозидной связью.

В конкретных вариантах осуществления модуль антитела способен специфически связываться с эпитопом в домене tandemных повторов MUC1, который содержит аминокислотную последовательность PDTR (SEQ ID NO: 19) или PDTRP (SEQ ID NO: 20). Связывание с этим эпитопом предпочтительно зависит от гликозилирования, как описано выше, связывание с которым, в частности, увеличивается, если вышеописанный углеводный фрагмент присоединен к остатку треонина последовательности PDTR или PDTRP (SEQ ID NO: 19 и 20), соответственно.

В некоторых вариантах осуществления модуль антитела специфически связывается с ассоциированным с опухолью эпитопом MUC1 (TA-MUC1). Эпитоп TA-MUC1, в частности, относится к эпитопу MUC1, который присутствует на опухолевых клетках, но не присутствует на нормальных клетках, и/или который доступен антителам только в кровотоке хозяина, когда присутствует на опухолевых клетках, но не присутствует на нормальных клетках. Описанные выше эпитопы, в частности те, которые присутствуют в домене tandemных повторов MUC1, могут представлять собой эпитопы MUC1, ассоциированного с опухолью. В некоторых вариантах осуществления связывание модуля антитела с клетками, экспрессирующими эпитоп TA-MUC1, является более сильным, чем связывание с клетками, экспрессирующими нормальный неопухолевый MUC1. Предпочтительно указанное связывание сильнее по меньшей мере в 1,5 раза, предпочтительно сильнее по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей

мере в 10 раз или сильнее по меньшей мере в 100 раз. В частности, TA-MUC1 гликозилирован по меньшей мере одним N-ацетилгалактозамином (Tn) или галактоза(β 1-3)N-ацетилгалактозамином (TF) во внеклеточной области tandemных повторов. В некоторых вариантах осуществления модуль антитела специфически связывается с этим эпитопом во внеклеточной области tandemных повторов TA-MUC1, содержащей N-ацетилгалактозамин (Tn) или галактоза(β 1-3)N-ацетилгалактозамин (TF). В частности, указанный эпитоп содержит по меньшей мере одну последовательность PDTR или PDTRP (SEQ ID NO: 19 или 20) tandemных повторов MUC1 и гликозилирован по треонину последовательности PDTR или PDTRP (SEQ ID NO: 19 или 20) N-ацетилгалактозамином (Tn) или галактоза(β 1-3)N-ацетилгалактозамином (TF), предпочтительно через α -О-гликозидную связь. При связывании TA-MUC1 модуль антитела предпочтительно специфически связывается эпитопом гликозилированного MUC1 в опухоли, что способствует усилению связи по меньшей мере в 2 раза, предпочтительно в 4 раза или в 10 раз, наиболее предпочтительно в 20 раз по сравнению со связью с негликозилированным пептидом, имеющим идентичную длину и идентичную пептидную последовательность.

Далее описаны конкретные варианты осуществления модулей антител, специфически связывающихся с TA-MUC1.

В некоторых вариантах осуществления модуль антитела содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области: CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, или содержащую определяющие комплементарность области: CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В соответствии с одним из вариантов осуществления переменная область(и) тяжелой цепи, присутствующая(ие) в модуле антитела, содержит(ат) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 8 или 9 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, в частности на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 97% идентична одной из указанных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи модуля антитела содержит аминокислотную последовательность (i), которая содержит набор CDR, в котором CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и CDR-H3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, или в котором CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и CDR-H3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и (ii) которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере

мере 90% или по меньшей мере 95% идентична любой из SEQ ID NO: 7, 8 и 9.

Модуль антитела может дополнительно содержать по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области: CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, или содержащую определяющие комплементарность области: CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В соответствии с одним из вариантов осуществления переменная область(и) легкой цепи, присутствующая(ие) в модуле антитела, содержит(ат) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, 17 или 18 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, в частности на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 97% идентична одной из указанных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи модуля антитела содержит аминокислотную последовательность, (i) которая содержит набор CDR, в котором CDR-L1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR-L2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и CDR-L3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, или в котором CDR-L1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR-L2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и CDR-L3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и (ii) которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентична любой из SEQ ID NO: 16, 17 и 18.

В конкретных предпочтительных вариантах осуществления модуль антитела содержит по меньшей мере одну, в частности две переменные области тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и по меньшей мере одну, в частности две переменные области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В дополнительном варианте осуществления модуль антитела получают из антитела, содержащего одну или более последовательностей, описанных выше, в частности антитела PankoMab в его химерном или гуманизированном варианте, как описано, например, в WO 2004/065423 и WO 2011/012309, или из антитела Гатипотумаб.

Модуль антитела, в котором CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и/или в котором переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или 9, имеет сайт N-гликозилирования в переменной области тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела содержит мутацию, которая приводит к удалению этого сайта N-гликозилирования в переменной области тяжелой цепи. В частности, аминокислотный остаток в положении 8 SEQ ID NO: 3 и/или в положении 57 SEQ ID NO:

9, соответственно, замещен любым другим аминокислотным остатком, кроме Asn, в основном Gln или Ala. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления вариабельная область(и) тяжелой цепи, присутствующая(ие) в модуле антитела, содержит(ат) определяющие комплементарность области: CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В частности, вариабельная область(и) тяжелой цепи, присутствующая(ие) в модуле антитела, содержит(ат) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, в частности на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 97% идентична одной из указанных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область(и) тяжелой цепи модуля антитела содержит(ат) аминокислотную последовательность, (i) которая содержит набор CDR, в котором CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и CDR-H3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и (ii) которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентична любой из SEQ ID NO: 34. В этих вариантах осуществления аминокислотный остаток в положении 8 SEQ ID NO: 33 и положении 57 SEQ ID NO: 34, в частности, представляет собой любой аминокислотный остаток, кроме аспарагина, в основном глутамин или аланин. Кроме того, в этих вариантах осуществления вариабельная область(и) легкой цепи, присутствующая(ие) в модуле антитела, в частности, содержит(ат) определяющие комплементарность области: CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В частности, вариабельная область(и) легкой цепи, присутствующая(ие) в модуле антитела, включает(ют) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, в частности на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 97% идентична одной из указанных последовательностей. В этих вариантах осуществления вариабельная область(и) легкой цепи модуля антитела содержит(ат) в основном аминокислотную последовательность, (i) которая содержит набор CDR, в котором CDR-L1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR-L2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и CDR-L3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и (ii) которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентична любой из SEQ ID NO: 18.

Модуль IL-15

Модуль IL-15 конструкции слитого белка содержит одну или более активностей IL-

15. В частности, модуль IL-15 способен специфически связываться с комплексом β -цепь рецептора IL-2/общая γ -цепь и/или с α -цепью рецептора IL-15. В некоторых вариантах осуществления модуль IL-15 содержит IL-15 или его фрагмент, главным образом человеческий IL-15 или его фрагмент. В конкретных вариантах осуществления модуль IL-15 содержит и, в частности, состоит из человеческого IL-15.

В конкретных вариантах осуществления модуль IL-15 содержит последовательность SEQ ID NO: 21 или полученную из нее последовательность. В частности, модуль IL-15 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, в частности на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 97% идентична последовательности SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления модуль IL-15 содержит и, в частности, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21. В других вариантах осуществления модуль IL-15 содержит фрагмент указанных последовательностей, в основном фрагмент длиной по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 аминокислот. В частности, фрагмент сохраняет способность специфически связываться с комплексом β -цепь рецептора IL-2/общая γ -цепь и/или с α -цепью рецептора IL-15.

Модуль IL-15 может содержать мутацию, которая увеличивает связывание рецептора. Например, модуль IL-15 может содержать замену аспарагина аспарагиновой кислотой в положении аминокислоты, соответствующем Asn72 в SEQ ID NO: 21. В вариантах осуществления, в которых модуль IL-15 содержит последовательность SEQ ID NO: 21 или полученную из нее последовательность, мутация, которая увеличивает связывание рецептора, представляет собой N72D. В альтернативных вариантах осуществления модуль IL-15 может содержать мутацию, которая уменьшает связывание рецептора. Например, модуль IL-15 может содержать замену изолейцина глутаминовой кислотой в положении аминокислоты, соответствующем Ile67 в последовательности SEQ ID NO: 21. В вариантах осуществления, в которых модуль IL-15 содержит последовательность SEQ ID NO: 21 или полученную из нее последовательность, мутация, которая уменьшает связывание рецептора, представляет собой I67E. Модуль IL-15 может быть гликозилирован по аминокислоте в SEQ ID NO: 21, соответствующей Asn79, и/или по аминокислоте, соответствующей Asn112.

В конкретных вариантах осуществления модуль IL-15 дополнительно содержит α -цепь рецептора IL-15 или ее фрагмент. В частности, α -цепь рецептора IL-15 представляет собой α -цепь рецептора человеческого IL-15. В некоторых вариантах осуществления α -цепь рецептора IL-15 или ее фрагмент специфически связывается с IL-15, главным образом с человеческим IL-15. В конкретных вариантах осуществления модуль IL-15 содержит фрагмент α -цепи рецептора IL-15, который содержит или состоит только из внеклеточного домена или его части α -цепи рецептора IL-15, в основном α -цепи человеческого рецептора IL-15. В частности, фрагмент α -цепи рецептора IL-15 содержит или состоит только из домена sushi α -цепи рецептора IL-15, в основном α -цепи

человеческого рецептора IL-15.

В конкретных вариантах осуществления модуль IL-15 содержит фрагмент α -цепи рецептора IL-15, который содержит последовательность SEQ ID NO: 22 или полученную из нее последовательность. В частности, фрагмент α -цепи рецептора IL-15 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, в частности на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 97% идентична последовательности SEQ ID NO: 22. В дополнительных вариантах осуществления фрагмент α -цепи рецептора IL-15 содержит фрагмент указанных последовательностей, в основном фрагмент из по меньшей мере 50, по меньшей мере 55 или по меньшей мере 60 аминокислот в длину. В частности, этот фрагмент сохраняет способность специфически связываться с комплексом общая γ -цепь/ β -цепь рецептора IL-2 и/или с IL-15.

α -цепь рецептора IL-15 или ее фрагмент может быть частью той же полипептидной цепи, что и IL-15 или его фрагмент, или α -цепь рецептора IL-15 или ее фрагмент и IL-15 или его фрагмент могут быть частью разных полипептидных цепей. В предпочтительных вариантах осуществления α -цепь рецептора IL-15 или ее фрагмент и IL-15 или его фрагмент являются частью одной и той же полипептидной цепи. В этих вариантах осуществления α -цепь рецептора IL-15 или ее фрагмент могут быть слиты с N-концом или C-концом IL-15 или его фрагментом, в основном с его N-концом. В некоторых вариантах осуществления α -цепь рецептора IL-15 или ее фрагмент слиты с IL-15 или его фрагментом через пептидный линкер, в частности пептидный линкер, раскрытый в настоящем описании.

В конкретных вариантах осуществления модуль IL-15, а также вся конструкция слитого белка не содержат α -цепь рецептора IL-15 или ее фрагмент, который способен связываться с IL-15.

В некоторых конкретных вариантах осуществления модуль IL-15 содержит и, в частности, состоит из человеческого IL-15, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. В альтернативном варианте осуществления модуль IL-15 содержит и, в частности, состоит из человеческого IL-15, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, в которой остаток изолейцина в положении 67 замещен глутаминовой кислотой. В другом варианте осуществления модуль IL-15 содержит и в основном состоит из фрагмента α -цепи человеческого рецептора IL-15, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, слитого с N-концом человеческого IL-15, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, через пептидный линкер. В другом варианте осуществления модуль IL-15 имеет любую из этих конструкций, за исключением того, что человеческий IL-15 имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, в частности на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO: 21, относительно всей длины эталонной последовательности, и/или фрагмент α -цепи человеческого рецептора IL-15 имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, в частности на по

меньшей мере 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 22 относительно всей длины эталонной последовательности, и причем модуль IL-15 специфически связывается с комплексом общая γ -цепь/ β -цепь рецептора IL-2.

Конструкция слитого белка

Конструкция слитого белка содержит по меньшей мере один модуль анти-MUC1 антитела и по меньшей мере один модуль IL-15. В определенных вариантах осуществления конструкция слитого белка содержит по меньшей мере два, в частности точно два модуля IL-15. Модули IL-15 могут быть одинаковыми или разными и, в частности могут иметь одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один модуль IL-15 слит с С-концом тяжелой цепи модуля антитела. Дополнительно или в качестве альтернативы, по меньшей мере один модуль IL-15 слит с С-концом легкой цепи модуля антитела.

В конкретных вариантах осуществления, в которых конструкция слитого белка содержит два модуля IL-15, модуль антитела также содержит две тяжелые цепи, и каждый из модулей IL-15 слит с С-концом другой тяжелой цепи модуля антитела. В альтернативных вариантах осуществления, в которых конструкция слитого белка содержит два модуля IL-15, модуль антитела также содержит две легкие цепи, и каждый из модулей IL-15 слит с С-концом другой легкой цепи модуля антитела. В дополнительных альтернативных вариантах осуществления, в которых конструкция слитого белка содержит два модуля IL-15, модуль антитела также содержит две легкие цепи, и каждый из модулей IL-15 слит с N-концом другой легкой цепи модуля антитела.

Модуль IL-15 может быть слит с модулем антитела напрямую через пептидную связь или опосредованно через пептидный линкер. Прямое слияние относится к вариантам осуществления, в которых последовательность модуля IL-15 непосредственно следует за последовательностью модуля антитела без каких-либо промежуточных аминокислот между этими двумя последовательностями. Слияние через пептидный линкер относится к вариантам осуществления, в которых между последовательностью модуля антитела и последовательностью модуля IL-15 присутствует одна или более аминокислот. Указанные одна или более аминокислот образуют пептидный линкер между модулем антитела и модулем IL-15.

Пептидный линкер в принципе может иметь любое количество аминокислот и любую аминокислотную последовательность, которые подходят для связывания модуля антитела и модуля IL-15. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит по меньшей мере 3, предпочтительно по меньшей мере 5, по меньшей мере 8, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 20 аминокислот. В других вариантах осуществления пептидный линкер содержит 50 или менее, предпочтительно 45 или менее, 40 или менее, 35 или менее, 30 или менее, 25 или менее или 20 или менее аминокислот. В частности, пептидный линкер содержит от 10 до 30 аминокислот, в основном 20 или 30 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления пептидный линкер состоит из остатков глицина и серина. В пептидном линкере могут присутствовать

глицин и серин в соотношении 2 к 1, 3 к 1, 4 к 1 или 5 к 1 (количество остатков глицина к количеству остатков серина). Например, пептидный линкер может содержать последовательность из четырех остатков глицина, за которой следует один остаток серина, и, в частности, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 повторов этой последовательности. Конкретными примерами являются пептидные линкеры, содержащие или состоящие из аминокислотной последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 31), 2 повторов аминокислотной последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 31), 3 повторов аминокислотной последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 31), 4 повторов аминокислотной последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 31) и 6 повторов аминокислотной последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 31). В частности, могут быть использованы пептидные линкеры, состоящие из 2, 3 или 4 повторов аминокислотной последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 31). В конкретных вариантах осуществления конструкция слитого белка содержит пептидный линкер, содержащий 2, 3 или 4 повтора аминокислотной последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 31) между С-концом модуля антитела и N-концом модуля IL-15, и/или пептидный линкер, содержащий 4 или 6 повторов аминокислотной последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 31) между IL-15 или его фрагментом и α -цепью или ее фрагментом рецептора IL-15 в модуле IL-15. В дополнительных вариантах осуществления пептидный линкер содержит последовательность PAPAP (SEQ ID NO: 32) и, в частности, 3 или 6 повторов этой последовательности. В конкретных вариантах осуществления конструкция слитого белка содержит пептидный линкер, содержащий 3 или 6 повторов аминокислотной последовательности PAPAP (SEQ ID NO: 32) между С-концом модуля антитела и N-концом модуля IL-15.

В других вариантах осуществления пептидный линкер содержит последовательности, которые не имеют или имеют только незначительный иммуногенный потенциал у людей, предпочтительно последовательности, которые представляют собой человеческие последовательности или встречающиеся в природе последовательности. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления пептидный линкер и соседние аминокислоты не проявляют или имеют только незначительный иммуногенный потенциал. Пептидные линкеры, описанные выше, также можно использовать для связывания других элементов конструкции слитого белка, таких как переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи, присутствующие в одном антигенсвязывающем фрагменте.

В некоторых вариантах осуществления модуль IL-15 слит с С-концом тяжелой цепи модуля антитела через пептидный линкер. В этих вариантах осуществления пептидный линкер может содержать дополнительный аминокислотный остаток на N-конце, в частности остаток пролина, остаток аспартата или остаток аланина. Дополнительно или альтернативно, последние 1, 2 или 3 аминокислотных остатка тяжелой цепи антитела могут быть удалены и/или мутированы. Конкретные примеры включают конструкции слитых белков, в которых пептидный линкер содержит

дополнительный остаток пролина или остаток аспартата на N-конце; конструкции слитых белков, в которых пептидный линкер содержит дополнительный остаток аланина на N-конце, а последний аминокислотный остаток тяжелой цепи антитела удален; и конструкции слитых белков, в которых последние два аминокислотных остатка тяжелой цепи антитела удалены. В этих вариантах осуществления пептидный линкер, в частности, содержит 2, 3 или 4 повтора аминокислотной последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 31) или 3 или 6 повторов аминокислотной последовательности PAPAP (SEQ ID NO: 32).

Конструкция слитого белка, в частности, представляет собой конструкцию антитела. Конструкция антитела специфически связывается с эпитопом MUC1, но не содержит каких-либо дополнительных антигенсвязывающих участков, которые специфически связываются с другим антигеном. В альтернативных вариантах осуществления конструкция слитого белка содержит один или более дополнительных антигенсвязывающих участков, которые специфически связываются с другими антигенами. Эти дополнительные антигенсвязывающие участки могут присутствовать в любом месте конструкции слитого белка. В некоторых вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий участок присутствует в антигенсвязывающем фрагменте, слитом с С- или N-концом легкой цепи или тяжелой цепи антитела в модуле антитела. В частности, если модуль антитела содержит две легкие цепи антитела, один или более антигенсвязывающих фрагментов, в основном один дополнительный антигенсвязывающий фрагмент, могут быть слиты с С- или N-концом, в основном с С-концом, каждой из легких цепей антитела модуля антитела. Эти дополнительные антигенсвязывающие фрагменты могут быть одинаковыми или разными и, в частности, могут иметь одну и ту же аминокислотную последовательность. В этих вариантах осуществления модуль IL-15 предпочтительно слит с С-концом тяжелой(ых) цепи(ей) антитела. Кроме того, если модуль антитела содержит две тяжелые цепи антитела, один или более дополнительных антигенсвязывающих фрагментов, в основном один дополнительный антигенсвязывающий фрагмент, могут быть слиты с С-концом каждой из тяжелых цепей антитела модуля антитела. Эти дополнительные антигенсвязывающие фрагменты могут быть одинаковыми или разными и, в частности, могут иметь одну и ту же аминокислотную последовательность. В этих вариантах осуществления модуль IL-15 предпочтительно слит с С-концом легкой цепи(ей) антитела в модуле антитела.

В конкретных вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела и вариабельную область легкой цепи антитела. Эти вариабельные области могут быть ковалентно связаны друг с другом, например, с помощью пептидного линкера. В определенном варианте осуществления дополнительный антигенсвязывающий фрагмент содержит полипептидную цепь, содержащую, в основном в направлении от N-конца к С-концу, вариабельную область тяжелой цепи антитела, пептидный линкер и вариабельную область легкой цепи антитела. В частности, дополнительный антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

Дополнительный антигенсвязывающий участок может специфически связываться с любым антигеном, в основном с антигенами, ассоциированными с опухолью, или антигенами контрольных точек иммунных клеток. Подходящие примеры таких антигенов могут быть выбраны из группы, состоящей из CD3, EGFR, HER2, PD-1, PD-L1, CD40, CEA, EpcAM, CD7, CD28, GITR, ICOS, OX40, 4-1BB, CTLA-4, TFA, LeY, CD160, галектина-3 и галектина-1.

В конкретных вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с CD3. В частности, дополнительный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный фрагмент вариабельной области (scFv), специфически связывающийся с CD3. Дополнительный антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом CD3. В частности, дополнительный антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с CD3ε. В конкретных вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с CD3ε способом, зависящим от конформации, в основном если он находится в комплексе с CD3δ.

В некоторых вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с CD3, содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области: CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25. В соответствии с одним из вариантов осуществления вариабельная область(и) тяжелой цепи, присутствующая(ие) в дополнительном антигенсвязывающем фрагменте, содержит(ат) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, в частности на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 97% идентична одной из указанных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи дополнительного антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность, (i) которая содержит набор CDR, в котором CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и CDR-H3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; и (ii) которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентична любой из SEQ ID NO: 26.

Дополнительный антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с CD3, может дополнительно содержать по меньшей мере одну вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области: CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В соответствии с одним из

вариантов осуществления вариабельная область(и) легкой цепи, присутствующая(ие) в дополнительном антигенсвязывающем фрагменте, содержит(ат) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, в частности на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 97% идентична одной из указанных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи дополнительного антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность, (i) которая содержит набор CDR, в котором CDR-L1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, CDR-L2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и CDR-L3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и (ii) которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентична любой из SEQ ID NO: 30.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления дополнительный антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с CD3, содержит по меньшей мере одну, в частности одну, вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и по меньшей мере одну, в частности одну, вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

В некоторых вариантах осуществления конструкция слитого белка содержит один или более дополнительных агентов, конъюгированных с ней. Дополнительным агентом может быть любой агент, подходящий для конъюгации с конструкцией слитого белка. Если в конструкции слитого белка присутствует более одного дополнительного агента, эти дополнительные агенты могут быть одинаковыми или разными и, в частности, все они могут быть идентичными. Конъюгирование дополнительного агента с конструкцией слитого белка может быть достигнуто любым способом, известным в данной области. Дополнительный агент может быть присоединен к конструкции слитого белка ковалентно, в частности путем слияния или химического связывания, или нековалентно. В определенных вариантах осуществления дополнительный агент ковалентно присоединен к конструкции слитого белка, в основном через линкерный фрагмент. Линкерный фрагмент может представлять собой любой химический объект, подходящий для присоединения дополнительного агента к конструкции слитого белка.

В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой полипептид белка. Этот полипептид или белок, в частности, может быть слит с полипептидной цепью модуля антитела или полипептидной цепью модуля IL-15. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент, представляющий собой полипептид или белок, слит с С- или N-концом легкой цепи антитела или тяжелой цепи антитела модуля антитела. В вариантах осуществления, в которых модуль антитела содержит две легкие цепи антитела, дополнительный агент, представляющий собой полипептид или белок, может быть слит с С- или N-концом, в основном с С-концом,

каждой из двух легких цепей антитела. В вариантах осуществления, в которых модуль антитела содержит две тяжелые цепи антитела, дополнительный агент, представляющий собой полипептид или белок, может быть слит с С-концом каждой из двух тяжелых цепей антитела. Полипептид или белок может быть идентичным или отличаться и, в частности, может иметь такую же аминокислотную последовательность. Подходящие примеры таких дополнительных агентов, которые представляют собой полипептид или белок, могут быть выбраны из группы, состоящей из цитокинов, хемокинов, модулей антител, антигенсвязывающих фрагментов, ферментов и доменов взаимодействия.

Дополнительный агент предпочтительно используется в терапии, диагностике, прогнозировании и/или мониторинге заболевания, в частности рака. Например, дополнительный агент может быть выбран из группы, состоящей из радионуклидов, химиотерапевтических агентов, детектируемых меток, токсинов, цитолитических компонентов, иммуномодуляторов, иммуноэффекторов и липосом.

Гликозилирование конструкции слитого белка

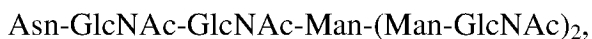
Модуль анти-MUC1 антитела может содержать домен CH2 в одной или более тяжелых цепях антитела. Природные человеческие антитела типа IgG содержат сайт N-гликозилирования в домене CH2. Домены CH2, присутствующие в модуле антитела, могут содержать или не содержать сайт N-гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления домены CH2, присутствующие в модуле антитела, не содержат сайт N-гликозилирования. В частности, модуль антитела не содержит остаток аспарагина в положении тяжелой цепи, соответствующем положению 297 согласно системе нумерации IMGT/Eu. Например, модуль антитела может содержать в тяжелой цепи мутацию Ala297. В этих вариантах осуществления конструкция слитого белка предпочтительно обладает сильно сниженной способностью или полностью лишена способности индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и/или комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) посредством связывания с рецепторами Fcγ. Указанная сильно пониженная способность, в частности, относится к уменьшению активности до 10% или менее, в основном до 3% или менее, 1% или менее или 0,1% или менее по сравнению с той же конструкцией слитого белка, содержащей сайт N-гликозилирования в CH2 доменах и имеющей характерный для млекопитающих паттерн гликозилирования, аналогичный тому, который можно получить путем продуцирования в человеческих клеточных линиях или в клеточных линиях CHO или SP2/0, например паттерн гликозилирования, раскрытый в настоящем описании.

Активацию Т-клеток и NK-клеток через цитотоксичность конструкции слитого белка, а также цитотоксичность конструкции слитого белка можно контролировать через наличие или отсутствие N-гликозилирования в домене CH2 и паттерна гликозилирования. Даже без гликозилирования в домене CH2 иммунные клетки активируются в опухолевом участке модулем IL-15 конструкции слитого белка. При гликозилировании CH2 активация иммунных клеток увеличивается, а при наличии паттерна гликозилирования с

пониженным фукозилированием активация иммунных клеток становится еще более выраженной.

В альтернативных вариантах осуществления домены CH2, присутствующие в модуле антитела, содержат сайт N-гликозилирования. Этот сайт гликозилирования, в частности, находится в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 297 тяжелой цепи в соответствии с системой нумерации IMGT/Eu, и имеет мотив аминокислотной последовательности Asn Xaa Ser/Thr, где Xaa может представлять собой любую аминокислоту, кроме пролина. N-связанное гликозилирование в Asn²⁹⁷ является консервативным в IgG млекопитающих, а также в гомологичных областях других изотипов антител. Из-за необязательных дополнительных аминокислот, которые могут присутствовать в варибельной области или других модификациях последовательности, фактическое положение этого консервативного сайта гликозилирования может меняться в аминокислотной последовательности антитела. Предпочтительно гликаны, присоединенные к модулю антитела, представляют собой N-связанные углеводные структуры в виде 2-антенарного комплекса, предпочтительно содержащие по меньшей мере следующую структуру:



где Asn представляет собой аспарагиновый остаток полипептидной части модуля антитела; GlcNAc представляет собой N-ацетилглюкозамин, и Man представляет собой маннозу. Терминальные остатки GlcNAc могут дополнительно содержать остаток галактозы, который необязательно может нести остаток сиаловой кислоты. Дополнительный остаток GlcNAc (называемый бисекторным GlcNAc) может быть присоединен к Man, ближайшему к полипептиду. Фукоза может быть связана с GlcNAc, присоединенным к Asn.

Конструкция слитого белка может иметь паттерн гликозилирования в доменах CH2 модуля антитела, имеющего большое количество фукозы в ядре или небольшое количество фукозы в ядре. Пониженный уровень фукозилирования в доменах CH2 увеличивает способность конструкции слитого белка индуцировать ADCC. В некоторых вариантах осуществления относительное количество гликанов, несущих остаток фукозы в ядре, составляет 40% или менее, в основном 30% или менее или 20% или менее от общего количества гликанов, прикрепленных к доменам CH2 модуля антитела в композиции. В альтернативных вариантах осуществления относительное количество гликанов, несущих остаток фукозы в ядре, составляет по меньшей мере 60%, в основном по меньшей мере 65% или по меньшей мере 70% от общего количества гликанов, прикрепленных к доменам CH2 модуля антитела в композиции.

Благодаря наличию или отсутствию сайта гликозилирования в домене CH2 модуля анти-MUC1 антитела и наличию или отсутствию фукозы в структурах гликанов в указанном сайте гликозилирования можно контролировать способность конструкции слитого белка индуцировать ADCC через Fc-часть модуля антитела и силу указанной индукции ADCC. Опосредованная Т-клетками и NK-клетками цитотоксичность уже

инициируется пролиферацией и активацией указанных иммунных клеток в опухолевом участке. Это достигается благодаря модулю анти-MUC1 антитела, который связывается с опухолевыми клетками и локализует конструкцию слитого белка в опухолевом участке, и модулю IL-15, который индуцирует пролиферацию и активацию Т-клеток и NK-клеток. Общая цитотоксическая активность, опосредованная Т-клетками и NK-клетками, может быть увеличена путем гликозилирования Fc-части модуля антитела и, помимо этого, путем уменьшения уровня фукозилирования в указанном гликозилировании. При Fc-гликозилировании, в частности при низком уровне фукозилирования, опосредованная NK-клетками ADCC дополнительно усиливается. В некоторых приложениях важна точная регулировка ADCC активности. Следовательно, в определенных ситуациях наиболее выгодной может быть конструкция слитого белка без сайта гликозилирования в домене CH2 модуля антитела, конструкция слитого белка с сайтом гликозилирования в домене CH2 модуля антитела и с высоким уровнем фукозилирования или конструкция слитого белка с сайтом гликозилирования в домене CH2 модуля антитела и с низким уровнем фукозилирования.

В некоторых вариантах осуществления модуль IL-15 является гликозилированным. В частности, модуль IL-15 может быть гликозилирован по аминокислоте, соответствующей Asn79 и/или Asn112 SEQ ID NO: 21.

Конструкция слитого белка предпочтительно продуцируется рекомбинантно в клетке-хозяине. Клетка-хозяин, используемая для получения конструкции слитого белка, может представлять собой любые клетки-хозяева, которые можно использовать для получения антител. Подходящими клетками-хозяевами являются, в частности, эукариотические клетки-хозяева, в основном клетки-хозяева млекопитающих. Типичные клетки-хозяева включают клетки дрожжей, такие как клеточные линии *Pichia pastoris*, клетки насекомых, такие как клеточные линии SF9 и SF21, клетки растений, клетки птиц, такие как клеточные линии утки EB66, клетки грызунов, такие как клеточные линии CHO, NS0, SP2/0 и YB2/0, и клетки человека, такие как клеточные линии HEK293, PER.C6, CAP, CAP-T, AGE1.HN, Mutz-3 и KG1.

В некоторых вариантах осуществления конструкция слитого белка продуцируется рекомбинантно в линии клеток крови человека, в частности в линии клеток миелолейкоза человека. Предпочтительные клеточные линии человека, которые можно использовать для получения конструкции слитого белка, а также подходящие процедуры получения описаны в WO 2008/028686 A2. В конкретном варианте осуществления конструкцию слитого белка получают путем экспрессии в клеточной линии миелоидного лейкоза человека, выбранной из группы, состоящей из NM-H9D8, NM-H9D8-E6 и NM-H9D8-E6Q12. Эти клеточные линии депонированы под регистрационными номерами DSM ACC2806 (NM-H9D8; депонированная 15 сентября 2006 г.), DSM ACC2807 (NM-H9D8-E6; депонированная 5 октября 2006 г.) и DSM ACC2856 (NM-H9D8-E6Q12; депонированная 8 августа 2007 г.) в соответствии с требованиями Будапештского договора в Немецком фонде микроорганизмов (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) by Glycotope

GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin (DE). Клетки NM-H9D8 обеспечивают паттерн гликозилирования с высоким уровнем сиалилирования, высоким уровнем бисекторных GlycNAc, высоким уровнем галактозилирования и высоким уровнем фукозилирования. Клетки NM-H9D8-E6 и NM-H9D8-E6Q12 имеют паттерн гликозилирования, сходный с таковым у клеток NM-H9D8, за исключением того, что уровень фукозилирования является очень низким. Другие подходящие клеточные линии включают K562, клеточную линию миелоидного лейкоза человека, представленную в Американской коллекции типовых культур (ATCC CCL-243), а также клеточные линии, полученные из упомянутых выше клеточных линий.

В других вариантах осуществления конструкция слитого белка продуцируется рекомбинантно в клеточной линии CHO, главным образом в клеточной линии CHO dhfr, такой как клеточная линия ATCC № CRL-9096.

Нуклеиновая кислота, экспрессионная кассета, вектор, клеточная линия и композиция

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей конструкцию слитого белка. Последовательность указанной нуклеиновой кислоты может представлять собой любую нуклеотидную последовательность, подходящую для кодирования конструкции слитого белка. Однако предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере частично адаптирована к использованию конкретных кодонов клетки-хозяина или организма, предназначенных для экспрессии нуклеиновой кислоты, в частности к использованию человеческих кодонов. Нуклеиновая кислота может быть двухцепочечной или одноцепочечной ДНК или РНК, предпочтительно двухцепочечной ДНК, такой как кДНК, или одноцепочечной РНК, такой как мРНК. Она может представлять собой одну непрерывную молекулу нуклеиновой кислоты или может состоять из нескольких молекул нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует отдельную часть конструкции слитого белка.

Если конструкция слитого белка состоит из более чем одной различающихся аминокислотных цепей, такой как легкая цепь и тяжелая цепь модуля антитела, нуклеиновая кислота может, например, представлять собой одну молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую несколько кодирующих областей, каждая из которых кодирует одну из аминокислотных цепей конструкции слитого белка, предпочтительно разделенных регуляторными элементами, такими как элементы IRES, с получением отдельных аминокислотных цепей, или нуклеиновая кислота может состоять из нескольких молекул нуклеиновой кислоты, причем каждая молекула нуклеиновой кислоты содержит одну или более кодирующих областей, каждая из которых кодирует одну из аминокислотных цепей конструкции слитого белка. В дополнение к кодирующим областям, кодирующим конструкцию слитого белка, нуклеиновая кислота также может содержать дополнительные последовательности нуклеиновых кислот или другие модификации, которые, например, могут кодировать другие белки, могут влиять на транскрипцию и/или трансляцию кодирующей области(ей), могут влиять на стабильность

или другие физические или химические свойства нуклеиновой кислоты или могут вообще не иметь никакой функции.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к экспрессионной кассете или вектору, содержащему нуклеиновую кислоту по изобретению и промотор, функционально связанный с указанной нуклеиновой кислотой. Кроме того, экспрессионная кассета или вектор могут содержать дополнительные элементы, в частности элементы, которые способны влиять и/или регулировать транскрипцию и/или трансляцию нуклеиновой кислоты, амплификацию и/или размножение экспрессионной кассеты или вектора, интеграцию экспрессионной кассеты или вектора в геном клетки-хозяина и/или число копий экспрессионной кассеты или вектора в клетке-хозяине. Подходящие экспрессионные кассеты и векторы, содержащие соответствующие экспрессионные кассеты для экспрессии антител, хорошо известны в уровне техники и, таким образом, не нуждаются в дополнительном раскрытии в настоящем описании.

Кроме того, настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту по изобретению или экспрессионной кассете или вектору по изобретению. Клетка-хозяин может быть любой клеткой-хозяином. Она может быть изолированной клеткой или клеткой, содержащейся в ткани. Предпочтительно клетка-хозяин представляет собой культивируемую клетку, в частности первичную клетку или клетку стабильной клеточной линии, предпочтительно клетку, полученную из опухоли. Предпочтительно она является бактериальной клеткой, такой как *E.coli*, дрожжевой клеткой, такой как клетка *Saccharomyces*, в частности *S. cerevisiae*, клеткой насекомого, такой как клетка Sf9, или клеткой млекопитающего, в частности клеткой человека, такой как полученная из опухоли клетка человека, клетка хомяка, такая как CHO, или клетка примата. В предпочтительном варианте осуществления изобретения клетку-хозяин получают из клеток миелоидного лейкоза человека. Предпочтительно, ее выбирают из следующих клеток или клеточных линий: K562, KG1, MUTZ-3 или клетки или клеточной линии, полученной из них, или смеси клеток или клеточных линий, содержащих по меньшей мере одну из этих вышеупомянутых клеток. Клетку-хозяин предпочтительно выбирают из группы, состоящей из NM-H9D8, NM-H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12 и клетки или клеточной линии, полученной из любой из указанных клеток-хозяев, или смеси клеток или клеточных линий, содержащих по меньшей мере одну из упомянутых выше клеток. Эти клеточные линии и их свойства подробно описаны в заявке PCT WO 2008/028686 A2. В предпочтительных вариантах осуществления клетка-хозяин оптимизирована для экспрессии гликопротеинов, в частности антител, имеющих специфический паттерн гликозилирования. Предпочтительно использование кодонов в кодирующей области нуклеиновой кислоты согласно изобретению и/или промотора и других элементов экспрессионной кассеты или вектора совместимо и, более предпочтительно, оптимизировано для типа используемой клетки-хозяина. Предпочтительно, конструкция слитого белка продуцируется клеткой-хозяином или клеточной линией, как описано выше.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей конструкцию слитого белка, нуклеиновую кислоту, экспрессионную кассету или вектор или клетку-хозяин. Композиция также может содержать более одного из этих компонентов. Кроме того, композиция может содержать один или более дополнительных компонентов, выбранных из группы, состоящей из растворителей, разбавителей и вспомогательных веществ. Предпочтительно композиция представляет собой фармацевтическую композицию. В этом варианте осуществления все компоненты композиции предпочтительно являются фармацевтически приемлемыми. Композиция может представлять собой твердую или жидкую композицию, в частности, предпочтительно водный раствор, эмульсию или суспензию или лиофилизированный порошок.

Применение в медицине

Конструкция слитого белка, в частности, может быть использована в медицине, в частности, в терапии, диагностике, прогнозе и/или мониторинге заболевания, в частности заболевания, раскрытого в настоящем описании, предпочтительно рака, инфекций и иммунодефицитов.

Следовательно, в дополнительном аспекте изобретение предоставляет конструкцию слитого белка, нуклеиновую кислоту, экспрессионную кассету или вектор, клетку-хозяин или композицию для применения в медицине. Предпочтительно применение в медицине представляет собой применение при лечении, прогнозировании, диагностике и/или мониторинге заболевания, такого как, например, заболевание, связанное с аномальным ростом клеток, такого как, рак, инфекции, такие как бактериальные, вирусные, грибковые или паразитарные инфекции, и заболевание, связанное со снижением иммунной активности, такое как иммунодефициты. В предпочтительном варианте осуществления заболевание представляет собой рак. Предпочтительно рак выбирают из группы, состоящей из рака яичников, рака молочной железы, такого как тройной негативный рак молочной железы, рака легких и рака поджелудочной железы. Рак, в частности, может быть выбран из рака толстой кишки, рака желудка, рака печени, рака почек, рака мочевого пузыря, рака кожи, рака шейки матки, рака предстательной железы, рака желудочно-кишечного тракта, рака эндометрия, рака щитовидной железы и рака крови.

В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция вызвана вирусом иммунодефицита человека, вирусом простого герпеса, вирусом Эпштейна-Барра, вирусом гриппа, вирусом лимфоцитарного хориоменингита, вирусом гепатита В или вирусом гепатита С. В некоторых вариантах осуществления заболевание содержит или связано с клетками, которые экспрессируют MUC1. Например, рак, подлежащий лечению, является MUC1-положительным, т.е. содержит раковые клетки, которые экспрессируют MUC1.

В конкретных вариантах осуществления конструкция слитого белка используется в комбинации с другим терапевтическим агентом, в основном другим противораковым агентом. Указанным дополнительным терапевтическим агентом может быть любое

известное противораковое лекарственное средство. Подходящие противораковые терапевтические агенты, которые можно комбинировать с конструкцией слитого белка, могут представлять собой химиотерапевтические агенты, антитела, иммуностимулирующие агенты, цитокины, хемокины и вакцины. Кроме того, терапия с использованием конструкции слитого белка может применяться в комбинации с лучевой терапией, хирургией и/или традиционной китайской медициной.

В некоторых вариантах осуществления конструкция слитого белка предназначена для применения при лечении рака в комбинации с одним или более из следующего:

- (i) клеточной терапии, например клеточной терапии на основе CAR-T, TCR, NK или CD;
- (ii) иммуноактивирующим антитела, например, биспецифического рекрутера Т-клеток или NK-клеток или других иммуноцитоклинов;
- (iii) антитела контрольной точки, например антагонистических или агонистических антител контрольных точек, таких как антитела к CD3, PD-1, PD-L1, CD40, CD7, CD28, GITR, ICOS, OX40, 4-1BB, CTLA-4, CD160, галектину-3 и галектину-1;
- (iv) вакцинационной терапии;
- (v) химиотерапии;
- (vi) нацеленного на опухоль антитела, включая, без ограничения, ADCC-опосредующие моноклональные антитела, такие как антитела к EGFR, HER2, TFA, LeY, CEA и EpCAM;
- (vii) терапии, которая активирует TA-MUC1 на поверхности раковых клеток, например, путем ингибирования EGFR.

В конкретных вариантах осуществления конструкция слитого белка предназначена для применения при лечении рака в комбинации с биспецифическим антителом, нацеленным на MUC1 и CD3, в основном с биспецифическим антителом, содержащим модуль антитела, который специфически связывается с MUC1, и антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD3. Модуль антитела, который специфически связывается с MUC1 биспецифического антитела, в частности является таким, как раскрыто в настоящем описании в отношении конструкции слитого белка, и антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с CD3 биспецифического антитела, в частности является таким, как раскрыто в настоящем описании в отношении дополнительного антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связывается с CD3. Подходящие биспецифические антитела описаны, например, в WO 2018/178047 (PCT/EP2018/057721).

В дополнительных вариантах осуществления конструкция слитого белка предназначена для применения при лечении рака в комбинации с анти-PD-L1 антителом. В частности, комбинация конструкции слитого белка с анти-PD-L1 антителом демонстрирует синергетические эффекты в отношении гибели опухолевых клеток и/или активации иммунных клеток, в основном активации Т-клеток. Типичные анти-PD-L1 антитела описаны, например, в WO 2018/178122 (PCT/EP2018/057844).

В дополнительных вариантах осуществления конструкция слитого белка предназначена для применения при лечении рака в комбинации с анти-EGFR антителом. В частности, комбинация конструкции слитого белка с анти-EGFR антителом демонстрирует синергетический эффект в отношении гибели опухолевых клеток. Типичными анти-EGFR антителами являются томузотуксимаб и цетуксимаб.

В дополнительных вариантах осуществления конструкция слитого белка предназначена для применения при лечении рака в комбинации с анти-CD40 антителом. Лечение анти-CD40 антителом повышает экспрессию субъединиц рецептора IL-15 на иммунных клетках пациента. Таким образом, активация иммунных клеток усиливается, и лечение опухолей с помощью конструкции слитого белка становится более эффективным у пациентов, получающих лечение анти-CD40 антителом. Типичные анти-CD40 антитела описаны, например, в WO 2018/178046 (PCT/EP2018/057717).

Конкретные варианты осуществления

Ниже описаны конкретные варианты осуществления настоящего изобретения.

Вариант осуществления 1. Конструкция слитого белка, содержащая:

- (i) модуль антитела, специфически связывающийся с MUC1 (модуль анти-MUC1 антитела), и
- (ii) модуль IL-15.

Вариант осуществления 2. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 1, в которой модуль анти-MUC1 антитела содержит две тяжелые цепи, каждая из которых содержит домен VH, домен CH1, шарнирную область, домен CH2 и домен CH3.

Вариант осуществления 3. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 1 или 2, в которой модуль анти-MUC1 антитела содержит две легкие цепи, каждая из которых содержит домен VL и домен CL.

Вариант осуществления 4. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-3, в которой модуль анти-MUC1 антитела представляет собой модуль антитела типа IgG, в частности модуль антитела типа IgG1.

Вариант осуществления 5. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-4, в которой модуль анти-MUC1 антитела имеет к-цепь.

Вариант осуществления 6. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-5, в которой модуль анти-MUC1 антитела специфически связывается с эпитопом TA-MUC1.

Вариант осуществления 7. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-6, в которой модуль анти-MUC1 антитела содержит набор последовательностей CDR тяжелой цепи с CDR-H1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR-H2, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и CDR-H3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, или CDR-H1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, CDR-H2, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и CDR-H3, имеющей аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 8. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-7, в которой модуль анти-MUC1 антитела содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, которая по меньшей мере на 80% идентична любой из SEQ ID NO: 7, 8 и 9.

Вариант осуществления 9. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-6, в которой модуль анти-MUC1 антитела содержит набор последовательностей CDR тяжелой цепи с CDR-H1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR-H2, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и CDR-H3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

Вариант осуществления 10. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-6 и 9, в которой модуль анти-MUC1 антитела содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 9.

Вариант осуществления 11. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-6, в которой модуль анти-MUC1 антитела содержит набор последовательностей CDR тяжелой цепи с CDR-H1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR-H2, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и CDR-H3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

Вариант осуществления 12. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-6 и 11, в которой модуль анти-MUC1 антитела содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 34.

Вариант осуществления 13. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-12, в которой модуль анти-MUC1 антитела содержит набор последовательностей CDR легкой цепи с CDR-L1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR-L2, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и CDR-L3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

Вариант осуществления 14. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-13, в которой модуль анти-MUC1 антитела содержит последовательность вариабельной области легкой цепи антитела, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 15. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-14, в которой модуль IL-15 содержит IL-15 или его фрагмент, основном человеческий IL-15 или его фрагмент.

Вариант осуществления 16. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 15, в которой модуль IL-15 содержит полноразмерный человеческий IL-15.

Вариант осуществления 17. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 15 или 16, в которой человеческий IL-15 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления 18. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-17, в которой модуль IL-15 содержит мутацию, которая уменьшает связывание рецептора.

Вариант осуществления 19. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 18, в которой мутация, которая уменьшает связывание рецептора, представляет собой замену изолейцина глутаматом в положении, соответствующем Ile67, в SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления 20. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-19, в которой модуль IL-15 специфически связывается с рецептором интерлейкина, содержащим β -цепь рецептора IL-2, общую γ -цепь и α цепь рецептора IL-15.

Вариант осуществления 21. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-20, в которой модуль IL-15 специфически связывается с рецептором интерлейкина, содержащим β -цепь человеческого рецептора IL-2, человеческую общую γ -цепь и α цепь человеческого рецептора IL-15.

Вариант осуществления 22. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 15-21, в которой модуль IL-15 дополнительно содержит α -цепь рецептора IL-15 или ее фрагмент, в частности α -цепь человеческого рецептора IL-15 или ее фрагмент.

Вариант осуществления 23. Конструкция слитого белка в соответствии с вариантом осуществления 22, в которой фрагмент α -цепи рецептора IL-15 представляет собой внеклеточный домен α -цепи человеческого рецептора IL-15 или его часть.

Вариант осуществления 24. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 22, в которой фрагмент α -цепи рецептора IL-15 представляет собой домен sushi α -цепи человеческого рецептора IL-15 или его часть.

Вариант осуществления 25. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 22-24, в которой α -цепь рецептора IL-15 или ее фрагмент содержит последовательность SEQ ID NO: 22.

Вариант осуществления 26. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 22-25, в которой α -цепь рецептора IL-15 или ее фрагмент специфически связывается с человеческим IL-15.

Вариант осуществления 27. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 22-26, в которой α -цепь рецептора IL-15 или ее фрагмент слита с N-концом человеческого IL-15 или его фрагментом.

Вариант осуществления 28. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 22-27, в которой α -цепь рецептора IL-15 или ее фрагмент слита с человеческим IL-15 или его фрагментом через пептидный линкер.

Вариант осуществления 29. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 28, в которой пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, в частности 2 или более, в основном 3 или 4 повтора аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31.

Вариант осуществления 30. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 29, в которой пептидный линкер состоит из 2, 3 или 4 повторов аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31.

Вариант осуществления 31. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-14, в которой модуль IL-15 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления 32. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-14, в которой модуль IL-15 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления 33. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 32, в которой аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 22 находится на N-конце аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления 34. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-14, в которой модуль IL-15 имеет, в направлении от N конца к С концу, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, за которой следуют 2, 3 или 4 повтора аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, за которой следует аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления 35. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-14, в которой модуль IL-15 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, содержащую мутацию Ile67Glu.

Вариант осуществления 36. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-35, в которой модуль IL-15 слит с С-концом модуля антитела.

Вариант осуществления 37. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-21, в которой модуль IL-15 не содержит α -цепь рецептора IL-15 или ее фрагмент, в основном внеклеточный домен α -цепи рецептора IL-15 или домен sushi α -цепи рецептора IL-15 или его фрагмент, способный связываться с IL-15.

Вариант осуществления 38. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-37, содержащая два модуля IL-15, каждый из которых слит с С-концом другой тяжелой цепи модуля антитела.

Вариант осуществления 39. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 38, в которой тяжелые цепи модуля антитела не содержат С-концевой остаток лизина.

Вариант осуществления 40. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 38, в которой тяжелые цепи модуля антитела не содержат два С-концевых остатка глицина и лизина.

Вариант осуществления 41. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 38, в которой тяжелые цепи модуля антитела не содержат три С-концевых остатка пролина, глицина и лизина.

Вариант осуществления 42. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 38-41, в которой один или более из трех С-концевых остатков, пролина, глицина и лизина, если присутствуют, тяжелых цепей модуля антитела замещены в основном лейцином или аланином, или серином.

Вариант осуществления 43. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-42, в которой конструкция слитого белка содержит два модуля IL-15, каждый из которых слит с С-концом другой легкой цепи модуля антитела.

Вариант осуществления 44. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-42, содержащая два модуля IL-15, каждый из которых слит с N-концом другой легкой цепи модуля антитела.

Вариант осуществления 45. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-44, содержащая пептидный линкер между модулем антитела и модулем IL-15.

Вариант осуществления 46. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 45, в которой пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, в частности 2 или более, в основном 2, 3 или 4 повтора аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31.

Вариант осуществления 47. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 46, в которой пептидный линкер состоит из 2, 3 или 4 повторов аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31.

Вариант осуществления 48. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 45, в которой пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, в частности 2 или более, в основном 3 или 6 повтора аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32.

Вариант осуществления 49. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 48, в которой пептидный линкер состоит из 3 или 6 повторов аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32.

Вариант осуществления 50. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 45-49, в которой пептидный линкер дополнительно содержит дополнительный N-концевой остаток пролина, аспартата или аланина.

Вариант осуществления 51. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-44, не содержащая пептидный линкер между модулем антитела и модулем IL-15.

Вариант осуществления 52. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-51, в которой модуль антитела не содержит сайт N-гликозилирования в домене CH2.

Вариант осуществления 53. Конструкция слитого белка по любому из вариантов

осуществления 1-51, в которой модуль антитела содержит сайт N-гликозилирования в домене CH2 тяжелых цепей антитела.

Вариант осуществления 54. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 53, в которой модуль антитела имеет паттерн гликозилирования в домене CH2 тяжелых цепей антитела с относительным количеством гликанов, несущих остаток фукозы в ядре, составляющим по меньшей мере 60% от общего количества гликанов, связанных с CH2 доменами модуля антитела в композиции.

Вариант осуществления 55. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 53, в которой модуль антитела имеет паттерн гликозилирования в домене CH2 тяжелых цепей антитела с относительным количеством гликанов, несущих остаток фукозы в ядре, составляющим 40% или менее от общего количества гликанов, связанных с доменами CH2 модуля антитела в композиции.

Вариант осуществления 56. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-55, содержащая дополнительный агент, конъюгированный с ней.

Вариант осуществления 57. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 56, в которой дополнительный агент представляет собой полипептид или белок, который слит с полипептидной цепью модуля антитела или с полипептидной цепью модуля IL-15.

Вариант осуществления 58. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 57, в которой модуль антитела содержит две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, причем модуль IL-15 слит с С-концом каждой легкой цепи антитела и причем дополнительный агент, представляющий собой полипептид или белок, слит с С-концом каждой тяжелой цепи антитела.

Вариант осуществления 59. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 57, в которой модуль антитела содержит две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, причем модуль IL-15 слит с С-концом каждой тяжелой цепи антитела и причем дополнительный агент, представляющий собой полипептид или белок, слит с С-концом каждой легкой цепи антитела.

Вариант осуществления 60. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 56-59, в которой дополнительный агент выбирают из группы, состоящей из цитокинов, хемокинов, модулей антител, антигенсвязывающих фрагментов, ферментов и связывающих доменов.

Вариант осуществления 61. Нуклеиновая кислота, кодирующая конструкцию слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-60.

Вариант осуществления 62. Экспрессионная кассета или вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 61 и промотор, функционально связанный с указанной нуклеиновой кислотой.

Вариант осуществления 63. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 61 или кассету или вектор экспрессии по варианту осуществления 62.

Вариант осуществления 64. Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-60 и один или более дополнительных компонентов, выбранных из группы, состоящей из растворителей, разбавителей и вспомогательных веществ.

Вариант осуществления 65. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-60 или фармацевтическая композиция по варианту осуществления 64 для применения в медицине.

Вариант осуществления 66. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-60 или фармацевтическая композиция по варианту осуществления 58 для применения при лечении, прогнозировании, диагностике и/или мониторинге заболеваний, связанных с аномальным ростом клеток, таким как рак; инфекциями, такими как бактериальные, вирусные, грибковые или паразитарные инфекции; и заболеваниями, связанными со снижением иммунной активности, такими как иммунодефицит.

Вариант осуществления 67. Конструкция слитого белка или фармацевтическая композиция по варианту осуществления 66 для применения при лечении рака, причем рак выбирают из группы, состоящей из рака молочной железы, толстой кишки, желудка, печени, поджелудочной железы, почек, крови, легких, эндометрия, щитовидной железы и яичника.

Вариант осуществления 68. Конструкция слитого белка или фармацевтическая композиция по варианту осуществления 66 для применения при лечении инфекций, причем инфекцию выбирают из группы, состоящей из бактериальных инфекций, вирусных инфекций, грибковых инфекций и паразитарных инфекций.

Вариант осуществления 69. Конструкция слитого белка, содержащая:

(i) модуль анти-MUC1 антитела, причем модуль антитела содержит две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, при этом каждая тяжелая цепь содержит домен VH, домен CH1, шарнирную область, домен CH2 и домен CH3, и каждая легкая цепь содержит домен VL и домен CL; и

(ii) два модуля IL-15, каждый из которых содержит человеческий IL-15.

Вариант осуществления 70. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 69, в которой каждая из тяжелых цепей антитела содержит набор последовательностей CDR тяжелой цепи с CDR-H1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR-H2, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и CDR-H3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

Вариант осуществления 71. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 70, в которой каждый домен VH модуля анти-MUC1 антитела содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична, в основном на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 34.

Вариант осуществления 72. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 70 или 71, в которой аминокислотный остаток в положении 8 SEQ ID NO:

33 и положении 57 SEQ ID NO: 34 представляет собой любой аминокислотный остаток, кроме аспарагина, в основном глутамин или аланин.

Вариант осуществления 73. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 69, в которой каждая из тяжелых цепей антитела содержит набор последовательностей CDR тяжелой цепи с CDR-H1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR-H2, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и CDR-H3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

Вариант осуществления 74. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 73, в которой каждый домен VH модуля анти-MUC1 антитела содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична, в основном на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 8 или 9.

Вариант осуществления 75. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 70-74, в которой каждая из легких цепей антитела содержит набор последовательностей CDR легкой цепи с CDR-L1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR-L2 имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и CDR-L3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

Вариант осуществления 76. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 75, в которой каждый домен VL модуля анти-MUC1 антитела содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична, в основном на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 17 или 18, в основном 18.

Вариант осуществления 77. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 69, в которой каждая из тяжелых цепей антитела содержит набор последовательностей CDR тяжелой цепи с CDR-H1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, CDR-H2, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и CDR-H3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 78. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 77, в которой каждый домен VH модуля анти-MUC1 антитела содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична, в основном на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 7.

Вариант осуществления 79. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 77 или 78, в которой каждая из легких цепей антитела содержит набор последовательностей CDR легкой цепи с CDR-L1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR-L2, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и CDR-L3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 80. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 79, в которой каждый домен VL модуля анти-MUC1 антитела содержит

аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична, в основном на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 16.

Вариант осуществления 81. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 69, в которой каждый домен VH модуля анти-MUC1 антитела содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична, в основном на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 9, и набор последовательностей CDR тяжелой цепи с CDR-H1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR-H2, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и CDR-H3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

Вариант осуществления 82. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 69, в которой каждый домен VH модуля анти-MUC1 антитела содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична, в основном на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 9, и набор CDR последовательностей тяжелой цепи с CDR-H1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR-H2, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и CDR-H3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, причем молекула антитела содержит мутацию, в результате которой происходит замещение аминокислотного остатка в положении 8 SEQ ID NO: 3, который соответствует аминокислотному остатку в положении 57 SEQ ID NO: 9, любым другим аминокислотным остатком, кроме Asn, в основном Gln или Ala, в частности Gln.

Вариант осуществления 83. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 81 или 82, в которой каждый домен VL модуля анти-MUC1 антитела содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична, в основном на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, и набор CDR последовательностей легкой цепи с CDR-L1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR-L2, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и CDR-L3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

Вариант осуществления 84. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 69-83, в которой модуль IL-15 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична, в основном на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления 85. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 84, в которой модуль IL-15 дополнительно содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична, в основном на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 22.

Вариант осуществления 86. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 85, содержащая пептидный линкер, содержащий 2, 3 или 4 повтора

аминокислотной последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 31) между С-концом аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80% идентична, в основном на 100% идентична SEQ ID NO: 22, и N-концом аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80% идентична, в основном на 100% идентична SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления 87. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 69-84, в которой модуль IL-15 не содержит α -цепь рецептора IL-15 или ее фрагмент, в основном внеклеточный домен α -цепи рецептора IL-15 или домен sushi α -цепи рецептора IL-15 или его фрагмент, способный связываться с IL-15.

Вариант осуществления 88. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 69-87, в которой пептидный линкер присутствует между модулями IL-15 и модулем антитела.

Вариант осуществления 89. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 69-88, в которой модуль IL-15 слит с С-концом тяжелых цепей модуля антитела.

Вариант осуществления 90. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 89, содержащая пептидный линкер, содержащий 4 повтора аминокислотной последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 31) между С-концом тяжелых цепей модуля антитела и N-концом модулей IL-15.

Вариант осуществления 91. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 89, содержащая пептидный линкер, содержащий 3 повтора аминокислотной последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 31) между С-концом тяжелых цепей модуля антитела и N-концом модулей IL-15.

Вариант осуществления 92. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 89, содержащая пептидный линкер, содержащий 2 повтора аминокислотной последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 31) между С-концом тяжелых цепей модуля антитела и N-концом модулей IL-15.

Вариант осуществления 93. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 89, содержащая пептидный линкер, содержащий 3 повтора аминокислотной последовательности PAPAP (SEQ ID NO: 32) между С-концом тяжелых цепей модуля антитела и N-концом модулей IL-15.

Вариант осуществления 94. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 89, содержащая пептидный линкер, содержащий 6 повторов аминокислотной последовательности PAPAP (SEQ ID NO: 32) между С-концом тяжелых цепей модуля антитела и N-концом модулей IL-15.

Вариант осуществления 95. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 90-94, в которой пептидный линкер дополнительно содержит дополнительный N-концевой остаток пролина, аспартата или аланина.

Вариант осуществления 96. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 89-95, в которой тяжелые цепи модуля антитела не содержат С-концевой

остаток лизина.

Вариант осуществления 97. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 89-95, в которой тяжелые цепи модуля антитела не содержат два С-концевых остатка глицина и лизина.

Вариант осуществления 98. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 89-95, в которой тяжелые цепи модуля антитела не содержат три С-концевых остатка пролина, глицина и лизина.

Вариант осуществления 99. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 89-98, в которой один или более из трех С-концевых остатков пролина, глицина и лизина, если присутствуют, в тяжелых цепях модуля антитела, замещены другим аминокислотным остатком, в частности аланином или лейцином.

Вариант осуществления 100. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 69-88, в которой модуль IL-15 слит с С-концом модуля антитела.

Вариант осуществления 101. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 100, содержащая пептидный линкер, содержащий 2, 3 или 4 повтора аминокислотной последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 3), между С-концом легких цепей модуля антитела и N-концом модулей IL-15.

Вариант осуществления 102. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 100, содержащая пептидный линкер, содержащий 3 или 6 повторов аминокислотной последовательности PAPAP (SEQ ID NO: 32), между С-концом легких цепей модуля антитела и N-концом модулей IL-15.

Вариант осуществления 103. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 69-88, в которой модули IL-15 слиты с N -концом легких цепей модуля антитела.

Вариант осуществления 104. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 103, содержащая пептидный линкер, содержащий 2, 3 или 4 повтора аминокислотной последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 31), между N-концом легких цепей модуля антитела и С-концом модулей IL-15.

Вариант осуществления 105. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 69-99, в которой каждый модуль IL-15 содержит человеческий IL-15 и слит своим N-концом через пептидный линкер с С-концом другой тяжелой цепи.

Вариант осуществления 106. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 69-88, в которой каждый модуль IL-15 содержит человеческий IL-15 и слит своим N-концом через пептидный линкер с С-концом другой легкой цепи.

Вариант осуществления 107. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 69-88, в которой каждый модуль IL-15 содержит человеческий IL-15 и слит своим С-концом через пептидный линкер с N-концом другой легкой цепи.

Вариант осуществления 108. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 69-99, в которой каждый модуль IL-15 содержит человеческий IL-15 и слит своим N-концом через пептидный линкер с С-концом другой тяжелой цепи, причем

тяжелые цепи не содержат С-концевого остатка лизина.

Вариант осуществления 109. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 69-87, в которой каждый модуль IL-15 содержит человеческий IL-15 и слит своим N-концом непосредственно с С-концом другой тяжелой цепи, причем тяжелые цепи не содержат С-концевой остаток лизина.

Вариант осуществления 110. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 69-84 и 87-109, в которой модуль IL-15 состоит из человеческого IL-15.

Вариант осуществления 111. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 110, в которой человеческий IL-15 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

Вариант осуществления 112. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 69-111, в которой модуль антитела не содержит сайт N-гликозилирования в домене CH2 каждой тяжелой цепи антитела.

Вариант осуществления 113. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 112, в которой модуль антитела не содержит остаток аспарагина в положении тяжелой цепи, соответствующем положению 297 согласно системе нумерации IMGT/Eu, в частности содержит мутацию Ala297 в тяжелой цепи.

Вариант осуществления 114. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 69-111, в которой модуль антитела содержит сайт N-гликозилирования в домене CH2 тяжелых цепей модуля антитела.

Вариант осуществления 115. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 114, в которой модуль антитела имеет паттерн гликозилирования в домене CH2 тяжелых цепей антитела, причем относительное количество гликанов с остатками фукозы в ядре составляет по меньшей мере 60%, в основном по меньшей мере 65% или по меньшей мере 70% от общего количества гликанов, связанных с CH2 доменами модуля антитела в композиции конструкции слитого белка.

Вариант осуществления 116. Конструкция слитого белка по варианту осуществления 114, в которой модуль антитела имеет паттерн гликозилирования в домене CH2 тяжелых цепей антитела, причем относительное количество гликанов с остатками фукозы в ядре составляет 40% или менее, основном 30% или менее или 20% или менее от общего количества гликанов, связанных с доменами CH2 модуля антитела в композиции конструкции слитого белка.

Вариант осуществления 117. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 69-116 для применения при лечении заболеваний, связанных с аномальным ростом клеток, таких как рак, инфекций, таких как бактериальные, вирусные, грибковые или паразитарные инфекции, и иммунодефицитов.

Вариант осуществления 118. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 69-116 для применения при лечении рака яичников, рака молочной железы, такого как тройной негативный рак молочной железы, рака легких или рака поджелудочной железы.

Вариант осуществления 119. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-60 и 69-116 для применения при лечении рака в комбинации с биспецифическим антителом, нацеленным на MUC1 и CD3.

Вариант осуществления 120. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-60 и 69-116 для применения при лечении рака в комбинации с анти-PD-L1 антителом.

Вариант осуществления 121. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-60 и 69-116 для применения при лечении рака в комбинации с анти-EGFR антителом, таким как томизотуксимаб или цетуксимаб.

Вариант осуществления 122. Конструкция слитого белка по любому из вариантов осуществления 1-60 и 69-116 для применения при лечении рака в комбинации с анти-CD40 антителом.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг.1 показаны различные конструкции слитых белков, содержащие IL-15 дикого типа (IL-15wt), IL-15 с мутацией, которая уменьшает связывание рецептора, (IL-15mut), или комбинацию домена sushi IL-15R α и IL-15 (IL-15sushi), присоединенного к С-концу тяжелой цепи или к С- или N-концу легкой цепи анти-MUC1 антитела (α MUC1).

На фиг.2 показаны антигенсвязывающие характеристики PM-IL15wt NA и PM-IL15wt с гликозилированными и негликозилированными пептидами MUC1 в качестве меры специфичности к опухоли, оцененной с помощью ELISA. α MUC1 без IL-15 (PankoMab) использовали в качестве контроля.

На фиг.3 показано связывание иммуноцитоклинов PM-IL-15 с опухолевой клеточной линией T-47D, экспрессирующей TA-MUC1, оцененное методом проточной цитометрии. Конструкции α MUC1-IL-15 сравнивали с аналогичными конструкциями слияния с антителом, которые не связываются с целевыми клетками (MOPC-IL-15wt/sushi). α MUC1 без IL-15 (PankoMab) использовали в качестве эталона.

На фиг.4 показано связывание PM-IL15wt NA и PM-IL15wt с TA-MUC1, экспрессированным опухолевыми клетками, на PANC-1, оцененное методом проточной цитометрии. α MUC1 без IL-15 (PankoMab) и нерелевантный человеческий IgG1 использовали в качестве положительного и отрицательного контроля, соответственно.

На фиг.5 показано связывание иммуноцитоклинов PM-IL-15 с доменами IL-15R α (A) и IL-2/IL-15R β (B) рецептора IL-15. Связывание анализировали методом ELISA. α MUC1 без IL-15 (PankoMab) использовали в качестве контроля.

На фиг.6 показано связывание PM-IL15wt NA и PM-IL15wt с субъединицами IL15R α и IL15R β рецептора IL15, оцененное с помощью ELISA. α MUC1 без IL-15 (PankoMab) использовали в качестве контроля.

На фиг.7 показано связывание иммуноцитоклинов PM-IL-15 с функциональной Fc-частью и без нее с Fc-гамма рецептором IIIa типа, оцененное с помощью конкурентного анализа Alphascreen. α MUC1 без IL-15 (PankoMab) использовали в качестве контроля.

На фиг.8 показана индукция природной цитотоксичности иммуноцитоклинами PM-

IL-15 к TA-MUC1-отрицательной клеточной линии Jurkat в присутствии PBMC. Цитотоксичность оценивали с помощью анализа высвобождения европия через 5 часов. α MUC1 без IL-15 (PankoMab) использовали в качестве контроля.

На фиг.9 показана опосредованная иммунными клетками антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) к целевым клеткам, иницированная конструкциями слитого белка. PBMC, содержащие NK-клетки и Т-клетки, инкубировали с различными конструкциями α MUC1-IL-15 в присутствии MUC1⁺ целевых клеток T47D. Определяли специфический лизис целевых клеток в зависимости от концентрации конструкции слитого белка. α MUC1 без IL-15 использовали в качестве контроля.

На фиг.10 показана опосредованная иммунными клетками ADCC к целевым клеткам, иницированная конструкциями слитого белка. PBMC, содержащие NK-клетки и Т-клетки, инкубировали с различными конструкциями α MUC1-IL-15 в присутствии MUC1⁺ целевых клеток Ovar-3. Определяли специфический лизис целевых клеток в зависимости от концентрации конструкции слитого белка. Конструкции α MUC1-IL-15 сравнивали с эквивалентными нецелевыми контрольными конструкциями (MOPC-IL-15wt/sushi). α MUC1 без IL-15 использовали в качестве контроля.

На фиг.11 показана индукция ADCC иммуноцитокинами PM-IL-15 к TA-MUC1-положительным клеткам рака молочной железы MCF-7 в присутствии PBMC. Цитотоксичность анализировали с помощью анализа высвобождения LDH через 24 часа. α MUC1 без IL-15 (PankoMab) использовали в качестве контроля.

На фиг.12 показана обусловленная PM-IL15wt NA и PM-IL15wt индукция цитотоксичности к TA-MUC1 экспрессирующим опухолевым клеткам CaOV-3. PBMC от разных доноров использовали в качестве эффекторных клеток. Гибель клеток определяли с помощью анализа высвобождения LDH.

На фиг.13 показано, что иммуноцитокины PM-IL-15 индуцируют инфильтрацию иммунных клеток в экспрессирующие TA-MUC1 трехмерные опухолевые сфероиды, имитирующие иммуносупрессивную опухолевую среду. Сфероиды, культивированные совместно с PBMC и иммуноцитокинами или PBS в качестве контрольного буфера в течение 2 дней, анализировали с помощью иммуногистохимии для определения количества CD45- или CD3-положительных иммунных клеток в опухоли после обработки.

На фиг.14 показана обусловленная PM-IL-15wt и PM-IL-15-wt NA индукция инфильтрации иммунных клеток в экспрессирующие TA-MUC1 трехмерные опухолевые сфероиды. Сфероиды, культивированные совместно с PBMC и иммуноцитокинами, α MUC1 без IL-15 (PankoMab) или PBS в качестве контрольного буфера в течение 2 дней, анализировали с помощью иммуногистохимии для определения количества CD45- или CD8-положительных иммунных клеток в опухоли после лечения.

На фиг.15 показана активация NK-клеток (А) и NKT-клеток (В) слитыми белковыми конструкциями. PBMC, содержащие NK-клетки и NKT-клетки, инкубировали в присутствии конструкций α MUC1-IL-15. Активацию NK-клеток и NKT-клеток определяли по экспрессии CD69. α MUC1 без IL-15 (PankoMab) использовали в качестве

контроля.

На фиг.16 показана пролиферация NK-клеток (А), NKT-клеток (В) и CD8⁺ Т-клеток (С) слитыми белковыми конструкциями. РВМС, содержащие NK-клетки, NKT-клетки и CD8⁺ Т-клетки, инкубировали в присутствии конструкций α MUC1-IL-15. Пролиферацию иммунных клеток определяли по проценту разделившихся клеток. α MUC1 без IL-15 (PankoMab) использовали в качестве контроля.

На фиг.17 показаны стимулирующие свойства PM-IL15wt NA и PM-IL15wt в различных популяциях иммунных клеток. Маркеры активации CD25 и CD69 на NK и CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках анализировали методом проточной цитометрии. α MUC1 без IL-15 (PankoMab) и среду без добавления антител использовали в качестве контролей.

На фиг.18 показана обусловленная PM-IL15wt NA и PM-IL15wt активация подмножеств клеток памяти и эффекторных Т-клеток, включая наивные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, оцененная по уровню детектирования экспрессии маркера активации методом проточной цитометрии. α MUC1 без IL-15 (PankoMab) и среду без добавления антител использовали в качестве контролей.

На фиг.19 показана обусловленная PM-IL15wt NA и PM-IL15wt индукция пролиферации CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток, оцененная методом проточной цитометрии. α MUC1 без IL-15 (PankoMab) и среду без добавления антител использовали в качестве контролей.

На фиг.20 показана индукция высвобождения цитокинов РВМС у здоровых доноров после инкубации с иммуноцитокинами PM-IL-15. Среда, α MUC1 без IL-15 (PankoMab) и ОКТ3 служили в качестве контролей для случаев отсутствия высвобождения цитокинов, только умеренного высвобождения цитокинов или высвобождения цитокинов на высоком уровне. Секрецию IFN- γ и GM-CSF анализировали с помощью электрохемилюминесценции.

На фиг.21 показана обусловленная PM-IL15wt NA и PM-IL15wt реактивация NK и Т-клеток после предшествующей обработки этих иммунных клеток цитокином TGF- β для имитации иммуносупрессивных состояний в микроокружении опухоли. Реактивацию NK и Т-клеток после обработки иммуноцитокинами или контрольной средой определяли путем анализа маркеров активации методом проточной цитометрии.

На фиг.22 показаны хемотактические свойства PM-IL15wt NA и PM-IL15wt в подмножестве иммунных клеток, оцененные с помощью хемотактического анализа в камере системы Transwell. Количество NK (А), NKT (В) и CD8⁺ Т-клеток (С), мигрирующих из верхней в нижнюю камеру, содержащую стимулирующие иммуноцитокины или нецелевой IL-15, определяли методом проточной цитометрии. Результаты выражены в виде хемотактического индекса, относящегося к необработанному контролю.

На фиг.23 показан период полувыведения из кровотока различных конструкций слитых белков. α MUC1-IL-15wt NA и α MUC1-IL-15sushi NA инъецировали мышам, и концентрацию этих конструкций в плазме контролировали в течение 8 дней. Показаны

рассчитанные периоды полувыведения конструкций.

На фиг.24 показано влияние различных конструкций слитых белков на количество Т-клеток в мышинной модели. α MUC1-IL-15wt NA и α MUC1-IL-15sushi NA инъецировали мышам, и образцы крови анализировали до инъекции и через 8 дней после инъекции. Количество CD8⁺ Т-клеток в крови мышей определяли путем окрашивания РВМС на CD45, CD3, CD4 и CD8.

На фиг.25 показано фармакокинетическое (РК) поведение *in vivo* PM-IL15wt NA и PM-IL15wt после однократного введения, т.е. инъекции мышам C57BL/6. Концентрации в сыворотке, определенные в разные моменты времени с помощью ELISA, наносили на график (А), а также рассчитывали параметры РК, конечное время полувыведения из сыворотки ($t_{1/2}$) и площадь под кривой (AUC) (В) для групп из 3 мышей.

На фиг.26 показаны фармакодинамические (PD) эффекты *in vivo* у мышей C57BL/6 после однократного внутривенного введения иммуноцитокинов PM-IL-15wt NA и PM-IL-15wt или PBS в качестве контрольного буфера. Обусловленные лечением эффекты PD анализировали методом проточной цитометрии в лимфатических органах, селезенке и паховых лимфатических узлах (ingLN). Увеличение общего количества клеток в этих органах показано на А+D, относительные пропорции различных популяций иммунных клеток показаны на В+E, и окончательное селективное размножение CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток и NKT-клеток показано на С+F.

На фиг.27 (А) показано увеличение отношения CD8⁺/CD4⁺ Treg при обработке однократной дозой с PM-IL-15wt NA и PM-IL-15wt по сравнению с контролем PBS, оцененное методом проточной цитометрии в модели, описанной на фиг. 26. (В) показано влияние лечения на относительную долю различных подгрупп Т-клеток в популяции CD8⁺. Экспрессию ICOS, NKG2D и CD122 (IL-2/15R β) на CD8⁺ Т-клетках (С) и NK-клетках (D) в селезенке определяли методом проточной цитометрии после обработки.

На фиг.28 показаны концентрации цитокинов TNF- α и IFN- γ , определенные с помощью ELISA в образцах сыворотки этих мышей после обработки иммуноцитокинами или PBS в качестве контрольного буфера.

На фиг.29 показаны отдаленные эффекты PD, обусловленные лечением с помощью PM-IL-15wt и NA PM-IL-15wt, на иммунные клетки периферической крови. Относительные пропорции NK, CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, NKT-клеток, гранулоцитов и моноцитов определяли методом проточной цитометрии до (день 0) и после (день 11) обработки иммуноцитокинами.

На фиг.30 показано связывание различных конструкций PM-IL-15wt с ТА-MUC1, экспрессированными на опухолевых клетках, на ZR-75-1, оцененное методом проточной цитометрии. α MUC1 без IL-15 (PankoMab) использовали в качестве положительного контроля.

На фиг.31 показано связывание различных конструкций PM-IL-15wt с субъединицей IL-15R α (CD215), оцененное методом ELISA.

На фиг.32 показана пролиферация CTLL-2 и KHyG-1 mCD16 в ответ на PM-IL-15-

CH34GS и -Ск4GS по сравнению с рекомбинантным IL-15.

На фиг.33 показаны стимулирующие свойства PM-IL-15-CH34GS и -Ск4GS по сравнению с рекомбинантным IL-15 в различных популяциях иммунных клеток. Маркер активации CD25 анализировали на NK и CD8⁺ Т-клетках методом проточной цитометрии. Среду без добавления антител использовали в качестве контроля.

На фиг.34 показана обусловленная PM-IL-15-CH34GS и Ск4GS индукция цитотоксичности к опухолевым клеткам СаOV-3, экспрессирующим ТА-MUC1, по сравнению с рекомбинантным IL-15. Гибель опухолевых клеток определяли с помощью анализа высвобождения LDH.

На фиг.35 показано фармакокинетическое (PK) поведение *in vivo* PM-IL-15-CH34GS и -Ск4GS после однократной внутривенной инъекции мышам C57BL/6. Показаны рассчитанные параметры PK (конечное время полувыведения из сыворотки ($t_{1/2}$) и площадь под кривой (AUC)) для групп из 3 мышей.

На фиг.36 показаны фармакодинамические (PD) эффекты *in vivo* у мышей C57BL/6 после однократного внутривенного введения иммуноцитокинов PM-IL-15-CH34GS и PM-IL-15-Ск4GS. Относительные пропорции экспрессии NK и CD8⁺ ТК-клеток, а также экспрессию CD122 (субъединицы IL15R β) в обеих клеточных подгруппах в крови определяли методом проточной цитометрии до (день 0) и после (день 11) обработки иммуноцитокинами.

На фиг.37 показано влияние лечения путем в/в и подкожного введения PM-IL-15-CH34GS и -Ск4GS на относительные пропорции различных подгрупп эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти в популяции CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток *in vivo*.

На фиг.38 показан терапевтический эффект PM-IL-15-CH34GS на объем опухоли и выживаемость мышей с трансплантированными ТА-MUC1-положительными мышинными опухолевыми клетками 4T1.

На фиг.39 показаны обнаруженные синергетические эффекты на активацию иммунных клеток при объединении иммуноцитокина PM-IL-15-CH34GS с нацеленным на ТА-MUC1 биспецифическим рекрутером Т-клеток (PM-CD3) в присутствии целевых клеток СаOV-3. Индуцированную лечением экспрессию маркера активации CD25 на CD4⁺ (А) и CD8⁺ (В) Т-клетках определяли через 2 дня методом проточной цитометрии.

На фиг.40 показаны обнаруженные синергетические эффекты на пролиферацию Т-клеток при объединении иммуноцитокинов PM-IL-15wt NA и PM-IL-15wt с нацеленным на ТА-MUC1 биспецифическим рекрутером Т-клеток (PM-CD3) в присутствии целевых клеток СаOV-3. Индуцированную лечением пролиферацию CD4⁺ (А) и CD8⁺ (В) Т-клеток определяли через 5 дней методом проточной цитометрии.

На фиг.41 показаны обнаруженные синергетические эффекты на опосредованную РВМС цитотоксичность к опухолевым клеткам СаOV-3 после комбинированного лечения иммуноцитокинами PM-IL-15wt NA или PM-IL-15wt с нацеленным на ТА-MUC1 биспецифическим рекрутером Т-клеток (PM-CD3). Цитотоксичность определяли через 24 часа с помощью анализа высвобождения LDH. На (А) показан абсолютный

специфический лизис, на (В) дополнительно отмечен синергизм после вычитания лизиса, индуцированного самими иммуноцитокинами. На (С) показаны эффекты после комбинированного лечения иммуноцитокинами в дозе 1 или 5 мкг/мл.

На фиг.42 показана экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках HSC-4 и моноцитах после инкубации в течение 2 дней с 20 нМ PM-IL-15-CH34GS относительно контроля.

На фиг.43 показаны обнаруженные синергетические эффекты на PBMC-опосредованную цитотоксичность к опухолевым клеткам HSC-4 после комбинированного лечения PM-IL-15-CH34GS с антителом Bavencio®, нацеленным на PD-L1. Цитотоксичность определяли через 24 часа с помощью анализа высвобождения LDH.

На фиг.44 показаны обнаруженные синергетические эффекты на активацию Т-клеток в реакции смешанной культуры лимфоцитов после комбинированного лечения PM-IL-15-CH34GS с антителом, Bavencio®, нацеленным на PD-L1.

На фиг.45 показаны обнаруженные синергетические эффекты на PBMC-опосредованную цитотоксичность к опухолевым клеткам HSC-4 после комбинированного лечения PM-IL-15-CH34GS с анти-EGFR антителами Erbitux® и CetuGEX®. Цитотоксичность определяли через 24 часа с помощью анализа высвобождения LDH.

На фиг.46 показана экспрессия CD215 на NK, NKT, CD4+ и CD8+ Т-клетках после лечения глико-оптимизированным анти-CD40 антителом hIgG1.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: *Получение конструкций слитых белков, специфически связывающихся с MUC1 и IL-15.*

Создавали конструкции слитых белков, которые состояли из части, специфически связывающейся с MUC1, и IL-15 функциональной части. MUC1-связывающая часть представляет собой гуманизированную полноразмерную молекулу антитела IgG1 PankoMab (гатипотузумаб) с типичной Y-формой антитела. Анти-MUC1 антитело либо содержит природный сайт гликозилирования в домене CH2 (PM), либо несет мутацию N297A в тяжелой цепи, приводящую к отсутствию гликозилирования (PM NA). Без гликозилирования в домене CH2 антитело не связывается с Fcγ-рецепторами и не может индуцировать ADCC (Fc-сайленсированный вариант). Функция IL-15 реализуется через слияние полноразмерного человеческого IL-15, имеющего последовательность дикого типа (IL-15wt) или мутацию I67E (IL-15mut), которая уменьшает связывание с рецептором. В одной из конструкций IL-15wt присутствует вместе с доменом sushi α-цепи рецептора IL-15 (IL-15sushi). Общая структура конструкций показана на фиг.1.

Таблица 1: Конструкции слитых белков

Конструкция	гликозилирование PankoMab	последовательность IL-15	домен sushi IL- 15Rα
PM-IL-15wt	□	wt	-
PM-IL-15mut	□	I67E	-
PM-IL-15sushi	□	wt	□

PM-IL-15wt NA	-	wt	-
PM-IL-15mut NA	-	I67E	-
PM-IL-15sushi NA	-	wt	□

В этих конструкциях один IL-15 слит с С-концом каждой тяжелой цепи антитела через линкер (Gly4Ser)₄. Домен sushi IL-15R α , если он присутствует, слит между С-концом тяжелой цепи антитела и N-концом IL-15 с линкером (Gly4Ser)₄, расположенным между партнерами по слиянию.

Таблица 2: Другие конструкции слитых белков

Конструкция	Положение IL-15	Последовательность линкера	Наличие С-терм. лизина в тяжелой цепи
PM-IL-15-CH34GS	С-терм. HC	(GGGGS) ₄	□
PM-IL-15-Ск4GS	С-терм. LC	(GGGGS) ₄	□
PM-IL-15-Ск1GS	С-терм. LC	(GGGGS) ₁	□
PM-IL-15-VL4GS	N-терм. LC	(GGGGS) ₄	□
PM-IL-15-CH34GS-oK	С-терм. HC	(GGGGS) ₄	-
PM-IL-15-CH3oLi-oK	С-терм. HC	без линкера	-

В этих конструкциях один IL-15wt слит с С-концом или N-концом каждой легкой цепи антитела через линкер (Gly4Ser)₄ или (Gly4Ser)₁; или один IL-15 слит с С-концом каждой тяжелой цепи антитела через линкер (Gly4Ser)₄ или непосредственно, без какого-либо линкера, причем концевой остаток лизина тяжелой цепи удален. PankoMab гликозилирован в домене CH2. PM-IL-15-CH34GS соответствует PM-IL-15wt из таблицы 1.

Эти конструкции были экспрессированы в клеточной линии NM-H9D8, полученной из миелоидного лейкоза человека (DSM ACC2806), с получением конструкций с человеческим паттерном гликозилирования, имеющим примерно 90% фукозилированных гликанов в домене CH2 PankoMab. Кроме того, конструкции также могут быть получены в родственной клеточной линии NM-H9D8-E6Q12 (DSM ACC2856) с получением гликозилированных конструкций с низким уровнем фукозилирования, составляющим примерно 10% в домене CH2 PankoMab конструкций wt.

Таблица 3: Дополнительные конструкции слитых белков

конструкция	Положение IL-15	Последоват. линкера	С-терминальная последовательность CH3 (EU нумерация)
PM(N54Q)-4GS-IL15-CH3-Fcwt	С-терм. HC	P(GGGGS) ₄	S ₄₄₄ P ₄₄₅ G ₄₄₆ K ₄₄₇
PM(N54Q)-3GS-IL15-CH3P-Fcwt	С-терм. HC	P(GGGGS) ₃	S ₄₄₄ P ₄₄₅ G ₄₄₆ K ₄₄₇
PM(N54Q)-3xL1-IL15-CH3-Fcwt	С-терм. HC	(PAPAP) ₃	S ₄₄₄ P ₄₄₅ G ₄₄₆ K ₄₄₇
PM(N54Q)-2GS-IL15-CH3D-Fcwt	С-терм. HC	D(GGGGS) ₂	S ₄₄₄ P ₄₄₅ G ₄₄₆ K ₄₄₇
PM(N54Q)-3GS-IL15-CH3D-Fcwt	С-терм. HC	D(GGGGS) ₃	S ₄₄₄ P ₄₄₅ G ₄₄₆ K ₄₄₇

PM(N54Q)-6xL1-IL15-CH3D-Fcwt	С-терм. HC	D(PAPAP) ₃	S ₄₄₄ P ₄₄₅ G ₄₄₆ K ₄₄₇
PM(N54Q)-3GS-IL15-CH3KA-Fcwt	С-терм. HC	(GGGGS) ₃	S ₄₄₄ P ₄₄₅ G ₄₄₆ A ₄₄₇
PM(N54Q)-2GS-IL15-CH3KA-Fcwt	С-терм. HC	(GGGGS) ₂	S ₄₄₄ P ₄₄₅ G ₄₄₆ A ₄₄₇
PM(N54Q)-6xL1-IL15-CH3KA-Fcwt	С-терм. HC	(PAPAP) ₆	S ₄₄₄ P ₄₄₅ G ₄₄₆ A ₄₄₇
PM(N54Q)-3xL1-IL15-CH3KA-Fcwt	С-терм. HC	(PAPAP) ₃	S ₄₄₄ P ₄₄₅ G ₄₄₆ A ₄₄₇
PM(N54Q)-3GS-IL15-Ck-Fcwt	С-терм. LC	(GGGGS) ₃	-
PM(N54Q)-3xL1-IL15-Ck-Fcwt	С-терм. LC	(PAPAP) ₃	-
PM(N54Q)-6xL1-IL15-Ck-Fcwt	С-терм. LC	(PAPAP) ₆	-
PM(N54Q)-2GS-IL15-CH3P-Fcwt	С-терм. HC	P(GGGGS) ₂	S ₄₄₄ P ₄₄₅ G ₄₄₆ K ₄₄₇
PM(N54Q)-6xL1-IL15-CH3-Fcwt	С-терм. HC	(PAPAP) ₆	S ₄₄₄ P ₄₄₅ G ₄₄₆ K ₄₄₇
PM(N54Q)-3xL1-IL15-CH3D-Fcwt	С-терм. HC	D(PAPAP) ₃	S ₄₄₄ P ₄₄₅ G ₄₄₆ K ₄₄₇
PM(N54Q)-3GS-IL15-CH3oGK-Fcwt	С-терм. HC	(GGGGS) ₃	S ₄₄₄ P ₄₄₅
PM(N54Q)-2GS-IL15-CH3oGK-Fcwt	С-терм. HC	(GGGGS) ₂	S ₄₄₄ P ₄₄₅
PM(N54Q)-6xL1-IL15-CH3oGK-Fcwt	С-терм. HC	(PAPAP) ₆	S ₄₄₄ P ₄₄₅
PM(N54Q)-3xL1-IL15-CH3oGK-Fcwt	С-терм. HC	(PAPAP) ₃	S ₄₄₄ P ₄₄₅
PM(N54Q)-3GS-IL15-CH3GAoK-Fcwt	С-терм. HC	(GGGGS) ₃	S ₄₄₄ P ₄₄₅ A ₄₄₆
PM(N54Q)-6xL1-IL15-CH3GAoK-Fcwt	С-терм. HC	(PAPAP) ₆	S ₄₄₄ P ₄₄₅ A ₄₄₆
PM(N54Q)-3GS-IL15-CH3GSoK-Fcwt	С-терм. HC	(GGGGS) ₃	S ₄₄₄ P ₄₄₅ S ₄₄₆
PM(N54Q)-6xL1-IL15-CH3GSoK-Fcwt	С-терм. HC	(PAPAP) ₆	S ₄₄₄ P ₄₄₅ S ₄₄₆
PM(N54Q)-3GS-IL15-CH3PLoGK-Fcwt	С-терм. HC	(GGGGS) ₃	S ₄₄₄ L ₄₄₅
PM(N54Q)-2GS-IL15-CH3PLoGK-Fcwt	С-терм. HC	(GGGGS) ₂	S ₄₄₄ L ₄₄₅
PM(N54Q)-3xL1-IL15-CH3PLoGK-Fcwt	С-терм. HC	(PAPAP) ₃	S ₄₄₄ L ₄₄₅

Эти конструкции были экспрессированы в клеточной линии NM-H9D8, полученной из миелоидного лейкоза человека (DSM ACC2806), и в клеточной линии яичника китайского хомячка CHO/dhFr-, в которой отсутствует фермент дигидрофолатредуктаза (DHFR). Кроме того, конструкции также могут быть получены в NM-H9D8-родственной клеточной линии NM-H9D8-E6Q12 (DSM ACC2856) с получением гликозилированных конструкций с низким уровнем фукозилирования, составляющим примерно 10%, в домене CH2 PankoMab конструкций wt.

Анализ различных вариантов PankoMab и IL-15

Пример 2: Связывание антигена

Антигенсвязывающие характеристики PM-IL15wt NA и PM-IL15wt по отношению к гликозилированным и негликозилированным пептидам MUC1 сравнивали с PankoMab методом ELISA. Как PM IL15wt NA, так и PM-IL15wt имеют уровень связывания с гликозилированными пептидами MUC1, сопоставимый с уровнем, наблюдаемым у PankoMab, не демонстрируя при этом значимого уровня связывания с негликозилированным пептидом MUC1 (фиг. 2). Это указывает на адекватную специфичность к опухоли у обеих конструкций PM-IL15.

Связывающие свойства различных вариантов иммуноцитокінов PM-IL15 с ТА-MUC1 на клеточной поверхности анализировали с помощью клеточной линии рака молочной железы T-47D, которая экспрессирует высокие уровни ТА-MUC1. Опухолевые клетки инкубировали с указанными антителами в серийных разведениях, а связанные антитела детектировали с помощью козьего антитела к человеческому IgG (тяжелой и легкой цепи), конъюгированного с фикоэритрином. Связывание анализировали методом проточной цитометрии. Все иммуноцитокіны PM-IL15 демонстрируют высокие уровни связывания с клетками T-47D независимо от варианта IL15 с присоединенным или гликозилированным Fc-доменом (Fc-функциональные варианты на фиг. 3А, Fc-сайленсированные варианты на фиг. 3В). Связывающие свойства (EC₅₀, % от максимального связывания) были идентичны свойствам PankoMab. Кроме того, связывание иммуноцитокінов PM-IL15 было высоко специфичным по отношению к ТА-MUC1, поскольку не было обнаружено связывания контрольных конструкций MOPC-IL15 (нерелевантный Fab-домен).

Связывание PM-IL15wt NA и PM-IL15wt с ТА-MUC1 на клеточной поверхности дополнительно оценивали методом проточной цитометрии с использованием линии опухолевых клеток Panc-1, экспрессирующей высокие уровни ТА-MUC1. Клетки Panc-1 инкубировали с различными концентрациями PM-IL15wt и PM-IL15wt NA и сравнивали с PankoMab. Контрольный человеческий IgG был включен для контроля фонового окрашивания. Связанные антитела детектировали с помощью козьего антитела к человеческому IgG (тяжелая и легкая цепи), конъюгированного с фикоэритрином. Как PM-IL15wt NA, так и PM-IL15wt демонстрируют сильное и специфическое связывание с клетками Panc-1, экспрессирующими ТА-MUC1, а связывающие свойства (EC₅₀, % от максимального уровня) были полностью идентичны таковым у PankoMab (фиг.4).

Пример 3: Связывание рецептора IL-15

Связывающие свойства рецептора IL-15 анализировали в качестве примера с Fc-сайленсированными NA вариантами с помощью ELISA. Либо IL-15R α , либо IL-15R β (IL-2r β , CD122) наносили на 96-луночные планшеты Maxisorp. Иммуноцитокіны PM-IL15 инкубировали в серийных разведениях, и связанные иммуноцитокіны определяли путем инкубации с меченным пероксидазой антителом в формате F(ab')₂-фрагмента человеческого IgG. PM-IL15sushi NA не показало связывания с IL-15R α , а PM-IL15wt NA продемонстрировало связывание с IL-15R α с более высоким сродством по сравнению со сродством, наблюдаемым у PM-IL15mut NA (фиг.5А). Анализ связывания с IL-15R β

показал, что PM-IL15mut NA не способен связываться с цепью IL-15R β рецептора IL-15 (фиг.5B). Вариант PM-IL15sushi NA показал более сильное связывание с IL-15R β , чем вариант PM-IL15wt NA.

Способность PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA связываться с IL-15R α (CD215) и IL-15R β (IL-2r β , CD122) сравнивали с помощью ELISA, как описано выше, после нанесения либо IL-15R α , либо IL-15R β . Анализ связывания с IL-15R β показал, что PM-IL15wt имеет заметно более высокий уровень связывания с CD122, чем PM-IL15wt NA, что может объяснить его более высокую активность, особенно в отношении NK-клеток (фиг.6A). Обе конструкции продемонстрировали сопоставимую степень связывания с IL-15R α (фиг.6B).

Пример 4: Связывание Fc γ RIIIa

Чтобы охарактеризовать связывание Fc-домена антитела иммуноцитоклинов PM-IL15 с Fc γ RIIIa на молекулярном уровне, использовали анализ связывания Fc γ R для Fc γ RIIIa (CD16a), основанный на технологии AlphaScreen® PerkinElmer. Платформа AlphaScreen® основана на простом методе PerkinElmer, в котором используются сферы и который является более эффективной альтернативой традиционному ELISA.

His-меченный Fc γ RIIIa (Glycotop GmbH) захватывается сферами-донорами на основе хелатов Ni. Тестируемые иммуноцитоклины PM-IL15 и сферы-акцепторы, связанные с кроличьим анти-мышиним антителом, конкурируют за связывание с Fc γ RIIIa. В случае взаимодействия Fc γ RIIIa со сферами-акцепторами, связанными с кроличьим анти-мышиним антителом, сферы-доноры и сферы-акцепторы оказываются в непосредственной близости, что приводит при возбуждении лазером при 680 нм к генерации хемилюминесцентного излучения. Максимальный сигнал достигается в отсутствие конкурента. В случае конкуренции, когда тестируемое антитело связывается с Fc γ RIIIa, максимальный сигнал уменьшается в зависимости от концентрации. Выполняли количественное определение хемилюминесценции путем измерения при 520-620 нм с помощью многоканального ридера EnSpire 2300 (PerkinElmer). Все результаты выражали в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение дублированных образцов. В результате получали зависящую от концентрации сигмоидальную кривую доза-ответ, которая определяется верхним плато, нижним плато, наклоном и EC50.

Как показано на фиг.7, PM-IL-15wt показывает сопоставимое связывание Fc γ RIIIa с RankoMab-GEX, тогда как PM-IL-15wt NA, представляющий собой Fc-мутированный вариант N297A, не показал никакого связывания с Fc γ RIIIa.

Пример 5: Индукция природной цитотоксичности

Имеются сообщения о том, что IL-15 способен усиливать природную цитотоксичность иммунных клеток. Для проверки способности иммуноцитоклинов PM-IL-15 индуцировать природную цитотоксичность, в качестве целевых клеток использовали линию клеток лейкемии Jurkat T, а PBMC здорового донора использовали в качестве эффектора. Согласно сообщениям, клетки Jurkat чувствительны к природной цитотоксичности и не экспрессируют TA-MUC1. Анализ природной цитотоксичности выполняли в виде анализа высвобождения европия (Eu). Клетки Jurkat загружали

европием с помощью электропорации и высевали в чашки для анализа. PBMC добавляли при соотношении эффектора к целевой клетке, равном 80:1, при разведении тестируемых иммуноцитоклинов. Все образцы анализированы в трех экземплярах. Для контроля максимального высвобождения европия (MR) целевые клетки лизировали с помощью Тритона X100. Базальное высвобождение европия (BR) измеряли в лунках, содержащих супернатант целевых клеток. Наконец, спонтанное высвобождение европия (SR) целевыми клетками определяли, используя контроли, содержащие только целевые клетки. Все контроли анализировали в шести параллельных испытаниях. Через 5 ч инкубации супернатанты собирали, и определяли высвобождение европия после инкубации с раствором DELFIA DELFIA Enhancement, а затем выполняли измерения на микропланшетном ридере Tecan Infinite F200 при длине волны экстинкции 340 нм и эмиссии 61 нм.

Удельную цитотоксичность вычисляли следующим образом:

% специфического лизиса = (наблюдаемое в эксперименте высвобождение - спонтанное высвобождение)/(максимальное высвобождение - базальное высвобождение) x 100.

Как показано на фиг.8, все протестированные иммуноцитоклины PM-IL-15 увеличивают природную цитотоксичность иммунных клеток к Т-клеткам Jurkat по сравнению с PankoMab. Сила индукции природной цитотоксичности зависит от модуля IL-15 (IL-15sushi> IL-15wt>IL-15mut), и варианты с функциональным Fc-доменом имеют более высокую эффективность по сравнению с Fc-сайленсированными вариантами.

Пример 6: Анализ 1 ADCC

Опосредованная иммунными клетками антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) является основным механизмом противоопухолевых антител. После связывания опухолевых клеток через TA-MUC1 конструкция антитела активирует НК-клетки и Т-клетки с помощью двух разных механизмов. С одной стороны, Fc-область антитела связывается с Fcγ-рецептором 3 на поверхности иммунных клеток, а с другой стороны, IL-15 часть конструкций связывается с рецепторами интерлейкина, образованными β-цепью рецептора IL-2 и общей γ-цепью. Активированные иммунные клетки высвобождают цитотоксические гранулы, содержащие перфорин и гранзимы, которые способствуют гибели TA-MUC1⁺ опухолевой клетки.

Анализ ADCC мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) выполняли в виде анализа высвобождения европия (Eu). 3×10^6 экспрессирующих MUC-1 целевых клеток T47D с жизнеспособностью более 80% собирали, дважды промывали в PBS и ресуспендировали в 100 мкл холодного содержащего европий буфера. После 10-минутной инкубации на льду клетки подвергали электропорации с помощью Amaxa Nucleofector (Lonza). Электропорированные клетки снова инкубировали на льду в течение 10 минут, после чего их 6 раз промывали в среде для анализа (RPMI1640+5% (об./об.) инактивированной нагреванием FCS). Целевые клетки подсчитывали, разбавляли до 5×10^4 клеток/мл в среде для анализа и добавляли 100 мкл/лунку к разведениям антител или

контрольной среде. 10х концентрированные разведения антител готовили в среде для анализа, и 20 мкл/лунку переносили в 96-луночный планшет с круглым дном. РВМС выделяли и ресуспендировали в среде для анализа до плотности 5×10^6 клеток/мл. 80 мкл/лунку эффекторных клеток переносили в аналитические планшеты, содержащие целевые клетки и разведения антител или среду. Все образцы анализированы в трех экземплярах.

Для максимального контроля высвобождения европия (MR) 100 мкл/лунку целевых клеток разбавляли средой в количестве 80 мкл/лунку и добавляли 20 мкл/лунку 10% (об./об.) Тритона X100. Исходное высвобождение европия (BR) измеряли в лунках, содержащих 100 мкл среды для анализа и 100 мкл супернатанта целевых клеток. Наконец, спонтанное высвобождение европия (SR) целевыми клетками регулировали контролями, приготовленными в лаборатории, содержащими 100 мкл среды для анализа и 100 мкл целевых клеток. Все контроли анализировали в шести параллельных испытаниях.

Планшеты центрифугировали в течение короткого периода времени при $300 \times g$ и инкубировали в течение 4-5 часов в стандартных условиях для культивирования клеток. Для измерения уровней европия в супернатанте в лунках для анализа планшеты центрифугировали при $300 \times g$ в течение 5 мин и 25 μ мл/лунку супернатанта переносили в белые 96-луночные планшеты с плоским дном, содержащие 200 мкл/лунку раствора DELFIA. Планшеты инкубировали в темноте в течение 10 мин, а затем измеряли флуоресценцию с помощью микропланшетного ридера Tecan Infinite F200 при длине волны экстинкции 340 нм и эмиссии 61 нм.

Удельную цитотоксичность вычисляли следующим образом:

% специфического лизиса = $(\text{наблюдаемое в эксперименте высвобождение} - \text{спонтанное высвобождение}) / (\text{максимальное высвобождение} - \text{базальное высвобождение}) \times 100$.

% спонтанного лизиса = $(\text{спонтанное высвобождение} - \text{базальное высвобождение}) / (\text{максимальное высвобождение} - \text{базальное высвобождение}) \times 100$.

Используя РВМС в качестве эффекторных клеток, было показано, что различные конструкции слитого белка обеспечивают лизис целевой линии T47D опухолевых клеток, экспрессирующих MUC-1. Активности различных конструкций продемонстрированы в виде различных значений EC50 (концентрация конструкции, необходимая для достижения полумаксимального лизиса). Как и ожидалось, конструкции, содержащие домен sushi IL-15R α в дополнение к IL-15, оказались более активными, чем конструкции, содержащие только IL-15wt, которые, в свою очередь, оказались более активными, чем конструкции с IL-15, содержащим мутацию I67E (см. Фиг.9). Влияние Fc-области антитела продемонстрировано путем сравнения PankoMab wt с конструкциями PankoMab NA. Удивительным оказалось то, что очень сильную литическую активность можно наблюдать даже без активации иммунных клеток с помощью Fc-области антитела (NA-PM-IL-15w и NA-PM-IL-15sushi). За исключением конструкции PankoMab NA с мутированным IL-15, все конструкции были более активными, чем голое антитело PankoMab.

Связывание антигена конструкциями слитых белков является важным для эффекта ADCC, что продемонстрировано путем сравнения конструкций с аналогичными конструкциями с антителами, которые не связываются с опухолевыми клетками (MOPC). Линию опухолевых клеток Ovcар-3, экспрессирующую MUC-1, использовали в качестве целевых клеток. Конструкции MOPC демонстрируют сильно сниженную активность ADCC (см. фиг. 10).

В дальнейшем анализе ADCC клетки MCF-7 использовали в качестве целевых клеток. TA-MUC1-положительные опухолевые клетки MCF-7 выращивали в течение 24 ч в аналитических планшетах перед добавлением нестимулированных PBMC при соотношении 10:1 эффектора к целевой клетке. Добавляли указанные концентрации иммуноцитоклинов, и гибель опухолевых клеток оценивали через 24 часа путем количественного определения лактатдегидрогеназы (LDH), высвобождаемой в клеточный супернатант (набор для определения цитотоксичности (LDH), Roche). Максимальное высвобождение было достигнуто путем инкубации целевых клеток с тритоном-X-100, и независимую от антител гибель клеток измеряли в образцах, содержащих только целевые клетки и PBMC, но без антител.

Как и ожидалось, конструкции, содержащие домен sushi IL-15/IL-15R α , были более активными, чем конструкции с одним IL-15wt (см. фиг. 11). Удивительным оказалось то, что сильную литическую активность можно наблюдать даже без активации иммунных клеток с помощью Fc-области антитела (NA-PM-IL-15w и NA-PM-IL-15sushi). Все протестированные иммуноцитоклины были более активными, чем голое антитело RankoMab, которое продемонстрировало только умеренную активность ADCC при низком соотношении E:T, равном 10:1.

Пример 7: анализы 2 ADCC

Цитотоксичность к опухолевым клеткам является одним из основных механизмов, которые должны индуцироваться иммунотерапевтическими агентами. Нацеливание IL-15 на опухолевые клетки путем использования иммуноцитоклина на основе IL-15, нацеленного на TA-MUC1, приводит к активации иммунных клеток и должно в дальнейшем приводить непосредственно к гибели опухолевых клеток гранзимом В и перфорином. Для оценки цитотоксического потенциала иммуноцитоклинов PM-IL15 TA-MUC1-положительные опухолевые клетки CaOV-3 выращивали в течение 24 ч в аналитических планшетах перед добавлением иммуноцитоклинов PM-IL15 и нестимулированных PBMC при соотношении 10:1 эффекторных клеток к целевым клеткам. Гибель опухолевых клеток оценивали через 24 часа путем количественного определения лактатдегидрогеназы (LDH), высвобождаемой в клеточный супернатант (Kit для определения цитотоксичности (LDH), Roche). Максимальное высвобождение было достигнуто путем инкубации целевых клеток с тритоном X100, и независимую от антител гибель клеток измеряли в образцах, содержащих только целевые клетки и PBMC, но без антител. Как показано на фиг.12, как PM-IL15wt NA, так и PM-IL15wt индуцируют эффективный лизис опухолевых клеток дозозависимым образом. Анализ нескольких

донорских РВМС выявил более высокую активность РМ-IL15wt в отношении индукции лизиса опухолевых клеток (более низкий EC50, более высокий максимальный лизис) по сравнению с РМ-IL15wt NA.

Пример 8: *Рекрутинг иммунных клеток в трехмерной сфероидной модели*

Основным преимуществом иммуноцитокинов РМ-IL15, нацеленных на опухоль, является опосредование локальной активации иммунных клеток в опухолевом участке для преобразования иммуносупрессивной среды в пригодную для получения совместных иммунных ответов. Но также описано, что IL-15 привлекает иммунные клетки благодаря своим хемотаксическим свойствам. Чтобы проанализировать потенциал иммуноцитокинов РМ-IL15 по привлечению иммунных клеток, выполняли анализ путем совместного культивирования РВМС с трехмерными опухолевыми сфероидом.

Использовали клеточную линию рака молочной железы MCF-7, обогащенную клетками с фенотипом раковых стволовых клеток (CSC) (названную MCF-7_{CSC-обогащенной}). В отличие от «классической» клеточной линии MCF-7, CSC-обогащенная клеточная линия имеет значительно увеличенную долю CD44⁺/CD24⁻ и боковую популяцию в нормальной адгезивной 2D-культуре и обладает способностью образовывать трехмерные (3D) сферы. Трехмерные сфероиды получали путем посева TA-MUC1⁺ MCF-7_{CSC-обогащенных} клеток в микропланшетах Corning Spheroid с последующей 3-дневной фазой инкубации в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C. Уплотнение и рост сфероидов подтверждали наблюдением под микроскопом. После образования сфероида в d3, добавляли человеческие РВМС здорового донора, а также 20 нг/мл РМ-IL-15wt NA и РМ-IL-15sushi NA и дополнительно инкубировали в течение 2 дней. Инфильтрацию иммунных клеток в трехмерные сфероиды анализировали с помощью иммуногистохимии. Следовательно, сфероиды собирали, промывали и фиксировали формалином. Затем фиксированные сфероиды формовали в HistoGelTM (Thermo Fisher), окрашивали красителем для тканей (Thermo Fisher), обезживали и помещали в парафин. Окрашивание выполняли на серийных срезах толщиной 3-4 мкм, используя стандартные методы и антитела к CD3 и CD45. Связанные первичные антитела детектировали с помощью конъюгированных с пероксидазой антител и жидкого диаминобензидина (DAB), использованного в качестве субстрата. Контрастное окрашивание ядер выполняли с помощью гематаксилина.

Как показано на фиг.13, добавление РМ-IL-15wt NA и РМ-IL-15sushi NA приводит к значительному увеличению в сфероиде CD45⁺ иммунных и CD3⁺ Т-клеток. Хотя в способности усиливать инфильтрацию иммунных клеток CD45⁺ не наблюдали никаких различий между NA РМ-IL-15wt и РМ-IL-15sushi NA, РМ-IL-15sushi NA имеет более высокую способность рекрутировать CD3⁺ Т-клетки.

Помимо этого, в анализе совместного культивирования РВМС с трехмерными опухолевыми сфероидом (описанным выше способом) сравнивали потенциал РМ-IL-15wt и РМ-IL-15-wt NA по привлечению иммунных клеток.

После образования сфероида в d3 добавляли человеческие РВМС, полученные от здорового донора, а также указанные количества иммуноцитокинов РМ-IL-15 или

PankoMab и дополнительно инкубировали в течение 2 дней. Инфильтрацию иммунных клеток в трехмерные сфероиды анализировали после окрашивания парафиновых сфероидов CD8 и CD45. Связанные первичные антитела детектировали с помощью конъюгированных с пероксидазой антител и жидкого диаминобензидина (DAB), использованного в качестве субстрата. Контрастное окрашивание ядер выполняли с помощью гематаксилина.

Как показано на фиг.14, добавление PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA приводит к значительному увеличению CD45+ иммунных и CD8+ Т-клеток в сфероидах, в то время как использование PankoMab не давало никакого эффекта. Также отсутствовало различие между PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA.

Пример 9: Активация и пролиферация иммунных клеток

Для исследования активации иммунных клеток, используя конструкции слитых белков, экспрессию маркеров CD69 активации через 48 часов анализировали методом проточной цитометрии на NK-клетках и NKT-клетках. Для этого человеческие PBMC, полученные от здоровых доноров, инкубировали с различными конструкциями слитых белков в указанных концентрациях в течение 48 часов. Через 48 ч PBMC собирали и окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами α CD4, α CD8, α CD25, α CD69, α CD56, α CD14 и α CD19, соответственно. Для анализа только жизнеспособных клеток использовали DAPI (Sigma-Aldrich). Клетки анализировали в проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher). Помимо активации иммунных клеток, другим механизмом действия конструкций PankoMab-IL-15 является индукция пролиферации NK и Т-клеток. Для измерения пролиферации иммунных клеток PBMC, полученные от здоровых доноров, метили CellTraceTM Violet (Thermo Fisher) и инкубировали с различными конструкциями слитых белков в течение 5 дней. Если иммунные клетки размножаются, краситель CellTraceTM будет разбавляться при каждой новой генерации пролиферирующих клеток. Через 5 дней PBMC собирали и окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами к CD4, CD8, CD56, CD14 и CD19, соответственно. Для анализа только жизнеспособных клеток использовали 7-AAD (Calbiochem). Клетки анализировали в проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher).

Результаты свидетельствуют о том, что все конструкции слитых белков способны индуцировать активацию NK- и NKT-клеток и пролиферацию NK, NKT и CD8+ Т-клеток (см. фиг. 15 и 16). Сила индукции активации и пролиферации зависит от модуля IL-15 (IL-15sushi>IL-15wt>IL-15mut) и, для NK-клеток, от гликозилирования Fc-части антитела (гликозилированный > негликозилированный).

Иммуностимулирующие свойства иммуноцитокинов PM-IL15 с гликозилированным и негликозилированным Fc (варианты Fc wt и сайленсированный (NA) Fc) также исследовали более детально. Активацию NK-клеток, CD8+ Т-клеток и CD4+ Т-клеток анализировали после инкубации PBMC в течение 5 дней с указанными молекулами. Стимулированные PBMC окрашивали флуоресцентно мечеными антителами α CD3, α CD4, α CD8, α CD14, α CD19, α CD25, α CD45RA, α CD56, α CD69 и

α CD197. Мертвые клетки исключали путем добавления перед анализом DAPI. Как показано на фиг.17, PM IL15wt NA и PM-IL15wt действительно индуцировали экспрессию CD25 и CD69 на NK-клетках, CD4⁺ Т-клетках и CD8⁺ Т-клетках, тогда как PankoMab не был способен активировать эти подмножества клеток в этом анализе. Интересно, что конструкция PM-IL15wt, которая способна связывать Fc γ R, показала более высокую активность в отношении активации NK-клеток, по сравнению с конструкцией PM-IL15wt NA, которая не способна инициировать активность Fc γ R. Однако экспрессия CD25 и CD69 на Т-клетках, индуцированных PM IL15wt NA и PM-IL15wt, была идентичной у обеих конструкций.

Интересно, что анализ подмножеств Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток показал, что PM IL15wt NA и PM-IL15wt способны активировать не только популяции классических эффекторных клеток, но также и наивные (CD45RA⁺ и CCR7⁺) CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, о чем свидетельствует индукция CD69 в этом конкретном подмножестве клеток (фиг. 18). Кроме того, инкубация с PM-IL15wt NA и PM-IL15wt приводила к увеличению CCR7-эффекторных Т-клеток, что указывает на способность иммуноцитокинов PM-IL15 потенцировать популяции эффекторных клеток.

Полная активация NK и Т-клеток приводит к устойчивой пролиферации. Для оценки способности PM-IL15wt NA и PM-IL15wt опосредовать пролиферацию PBMC, меченные CellTraceTM Violet (Thermo Fisher), инкубировали в течение 5 дней с указанными молекулами. Стимулированные PBMC окрашивали флуоресцентно меченными антителами α CD3, α CD4, α CD8, α CD14, α CD19, α CD45 и α CD56. Мертвые клетки исключали путем окрашивания 7-AAD (Sigma-Aldrich) перед анализом методом проточной цитометрии. Как PM-IL15wt NA, так и PM-IL15wt индуцировали пролиферацию NK-клеток, CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток, тогда как только PankoMab не оказывал никакого эффекта (фиг. 19). Аналогично результатам анализа активации иммунных клеток, не наблюдали никаких различий между PM-IL15wt NA и PM-IL15wt в эффективности индуцировать пролиферацию Т-клеток. Однако PM-IL15wt воспроизводимо индуцировала пролиферацию NK-клеток при более низких концентрациях, чем PM-IL15wt NA.

Пример 10: Высвобождение цитокинов

IL-15 является мощным цитокином, и потенциальное высвобождение цитокинов, опосредованное лечением IL-15, является проблемой, которую следует учитывать в доклинических исследованиях. В частности, описана секреция IFN- γ , GM-CSF и MIP1- α иммунными клетками после стимуляции IL-15. PBMC, полученные от восьми здоровых доноров, инкубировали в течение 72 ч с указанными иммуноцитокинами PM-IL-15, добавленными к раствору в анализируемых лунках. Супернатанты анализировали с помощью аналитической платформы UPLEX (MSD). Показана секреция IFN- γ (фиг. 20A) и GM-CSF (фиг. 20B).

Как и ожидалось, все протестированные иммуноцитокины PM-IL-15 индуцировали высвобождение цитокинов, а конструкции, содержащие домен sushi IL-15/IL-15R α ,

индуцировали более высокую секрецию IFN- γ (фиг. 20A) и GM-CSF (фиг. 20B), чем конструкции с одним IL-15wt. Удивительно, но наличие Fc-домена не оказывало никакого влияния на высвобождение тестируемых цитокинов.

Пример 11: Активация иммуносупрессированных клеток

Микроокружение в солидных опухолях, как правило, оказывает сильное супрессивное действие, что является одной из основных проблем для многих вводимых иммунотерапевтических средств. С целью выяснения, обладают ли иммуноцитокينات PM-IL15 способностью преодолевать супрессивную среду и активировать супрессированные иммунные клетки, PBMC, полученные от здоровых доноров, инкубировали с 50 нг/мл иммуносупрессивного цитокина TGF- β . Через 48 ч добавляли PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA в эквимоллярных концентрациях (572 нМ) и после дальнейшей инкубации в течение 5 дней анализировали активацию NK-клеток, CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток. PBMC окрашивали флуоресцентно мечеными α CD3, α CD4, α CD8, α CD25, α CD56 и α CD69. Мертвые клетки исключали путем добавления перед анализом DAPI.

Активация NK-клеток (CD25) показана на фиг.21A и CD8⁺ Т-клеток (CD69) на фиг.21B. Как ожидалось и как описано ранее, PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA сопоставимо активируют несупрессированные Т-клетки, при этом NK-клетки сильнее активируются PM-IL-15wt, чем PM-IL-15wt NA. Интересно, что оба иммуноцитокина PM-IL-15 также были способны активировать иммунные клетки, супрессированные TGF- β . Иммунная супрессия TGF- β была заметной во всех анализируемых подгруппах клеток поскольку количество CD25 и CD69 уменьшилось после обработки TGF- β . В этом случае, PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA продемонстрировали сходную эффективность в отношении активации Т-клеток, а конструкция PM-IL-15wt продемонстрировала более эффективную стимуляцию супрессированных NK-клеток по сравнению с Fc-сайленсированным вариантом PM-IL-15wt NA.

Пример 12: Хемотаксис

Описано, что IL-15 привлекает иммунные клетки благодаря своим хемотаксическим свойствам. Для подтверждения того, что иммуноцитокины PM-IL-15 все еще обладают хемотаксическими свойствами, выполняли классический анализ хемотаксиса. Полученные от здоровых доноров PBMC помещали в верхнюю камеру 96-луночной системы Transwell (поликарбонатная мембрана с размером пор 5 мкм, Corning Costar). Нижнюю камеру заполняли средой, в которую добавляли иммуноцитокины PM-IL-15. После инкубации в 5% CO₂ в течение 4 часов при 37°C количество мигрировавших иммунных клеток определяли путем подсчета клеток в нижней камере с помощью проточного цитометра. Перед анализом клетки окрашивали флуоресцентно мечеными α CD3, α CD4, α CD8, α CD14, α CD19, α CD56 и DAPI.

Показана миграция NK-клеток (фиг. 22A), NKT-клеток (фиг. 22B) и CD8⁺ Т-клеток (фиг. 22C) по направлению к указанным иммуноцитокинам PM-IL-15 относительно контрольных лунок (хемотаксический индекс) без добавления какого-либо стимула. Как PM-IL-15wt, так и PM-IL-15wt NA имели высокий потенциал привлечения NK, NKT и

CD8⁺ Т-клеток. Интересно, что вариант PM-IL15wt с функциональным Fc-доменом был более эффективным в отношении индукции миграции НК-клеток, чем PM-IL-15wt NA, тогда как в отношении NKT и CD8⁺ Т-клеток четкого различия не наблюдали.

Пример 13: Фармакокинетика *in vivo*

Для анализа фармакокинетики PM-IL-15sushi NA и PM-IL-15wt NA мышам C57BL/6 вводили внутривенно 200 пмоль антитела. Сыворотку собирали через 5 мин, 1 и 6 часов и 1, 2, 3, 3, 4, 5 и 8 дней после инъекции. Для определения титров антител в образцах сыворотки планшеты для ELISA Maxisorp F96 покрывали 2 мкг/мл мышинного антитела к легкой к-цепи человеческого Ig в 0,1 М карбонатном буфере с pH 9,6 в течение ночи. Неспецифическое связывание блокировали 5% (по объему) бычьим сывороточным альбумином (BSA) в PBS (BSA/PBS). Образцы сыворотки и стандарт разводили в 1% (об./об.) BSA/PBS. После инкубации образцов использовали козье античеловеческое антитело (IgG, специфический к Fc γ -фрагменту), конъюгированное с пероксидазой хрена, при разведении 1:30000 в 1% (об./об.) BSA/PBS. Для развития окраски на планшеты для ELISA добавляли субстрат TMB One Component HRP Microwell. Реакцию останавливали путем добавления 1,25 М серной кислоты, и сигналы измеряли при 450 нм и 620 нм с помощью микропланшетного ридера Tecan Infinite F200.

Кроме того, образцы крови анализировали до введения и через 8 дней после введения. PBMC окрашивали конъюгированными с флуорофором мышинными антителами к CD45, CD3, CD4, CD8, и клетки анализировали на цитометре с акустической фокусировкой Attune® NxT.

Результаты показали более короткий период полувыведения NA-PM-IL-15 по сравнению с NA-PM-IL-15wt (см. фиг. 23). Кроме того, обработка обеими конструкциями приводит к увеличению CD8⁺ Т-клеток, причем этот эффект более выражен при использовании PM-IL-15sushi NA (см. фиг.24).

Для изучения влияния Fc γ R-связывающего домена PM-IL-15wt на его фармакокинетический профиль по сравнению с PM-IL-15wt NA, мышам C57BL/6 вводили внутривенно 2 мг/кг конструкций (n=3). Сыворотку собирали через 5 мин, 6 часов, 1, 2, 4, 7 и 11 дней после инъекции, и титры антител определяли с помощью ELISA, как описано выше.

Как показано на фиг.25, PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA имеют у мышей C57BL/6 идентичное значение $t_{1/2}$ и аналогичную общую экспозицию (AUC).

Пример 14: Фармакодинамика *in vivo*

Дополнительно изучали фармакодинамические эффекты иммуноцитокинов PM-IL-15 *in vivo*. Мышам (C57BL/6, n=3) вводили внутривенно либо 2 мг/кг PM-IL-15wt NA, либо PM-IL-15wt, а затем забивали на 3-й день для взятия образцов крови, сыворотки, паховых лимфатических узлов (ingLN) и селезенки. Сыворотку анализировали на наличие воздействия на секрецию цитокинов, а иммунные клетки, полученные из крови и лимфоидных органов, были охарактеризованы по фенотипу и частоте встречаемости подмножеств иммунных клеток.

Лечение иммуноцитокинами PM-IL-15 в течение 3 дней приводит к увеличению общего количества клеток в селезенке (фиг.26A) и паховых лимфатических узлах (фиг.26D). Кроме того, наблюдали относительное увеличение CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток и NKT-клеток, в то время как количество CD4⁺ Т-клеток и В-клеток уменьшилось (фиг. 26B, E). В конечном итоге это привело к селективному размножению CD8⁺ Т-клеток, NK-клеток и NKT-клеток в селезенке и ingLN (фиг. 26C, F), при этом общее количество В-клеток и CD4⁺ Т-клеток не изменилось (селезенка) или изменилось незначительно (ingLN). Как правило, не между PM-IL-15wt NA и PM-IL-15wt было различий, за исключением того, что PM-IL-15wt показала более высокую эффективность в отношении стимуляции размножения NK-клеток.

Селективное размножение CD8⁺ Т-клеток, индуцированное обработкой PM-IL-15 в течение 3 дней, изменило соотношение CD8⁺ Т-клеток к CD4⁺ регуляторным Т-клеткам (Treg) в селезенке с начального значения 7:1 до 10:1 с увеличением доминирования CD8⁺ Т-клеток (фиг. 27A). В популяции CD8⁺ Т-клеток обработка PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA привела к относительному сокращению наивных клеток и одновременно к увеличению клеток с фенотипом клеток центральной памяти (TCM) и эффекторных клеток (Teff) (фиг. 2). Между PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA никаких различий не наблюдали. Аналогичные эффекты наблюдали в ingLN (не показано).

Фенотипическая характеристика мышинных иммунных клеток показала, что стимуляция иммуноцитокинами PM-IL-15 в течение 3 дней приводит к увеличению экспрессии ICOS, NKG2D и, неожиданно, также CD122 (IL-2/15R β) на CD8⁺ Т-клетках (фиг.27C). Аналогично, NKG2D и CD122 были активированы на NK-клетках (фиг.27D). Оба эффекта наблюдали в селезенке (показано) и в LN (не показано). Между PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA никаких различий не наблюдали.

В день 3 дополнительно анализировали сыворотку мышей на содержание цитокинов. Инъекция PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA увеличивала уровень цитокинов TNF- α и IFN- γ , при этом PM-IL-15wt индуцировала немного более сильную секрецию обоих цитокинов по сравнению с PM-IL-15wt NA (фиг.28).

Наконец, были проанализированы долгосрочные эффекты иммуноцитокинов PM-IL-15 *in vivo* путем анализа иммунных клеток в крови на день 11. Более высокая частота CD8⁺ Т-клеток и NKT-клеток все еще наблюдалась в крови после инъекции PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA, в то время как более высокую частоту NK-клеток наблюдали только в случае PM-IL15wt (фиг.29). Частота CD4⁺ Т-клеток не изменилась, и процентное содержание гранулоцитов и моноцитов было значительно снижено в результате лечения. Это показывает, что однократная инъекция иммуноцитокинов PM-IL-15 способна оказывать долгосрочное влияние на CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки и NKT-клетки.

Анализ различных конструкций PM-IL-15

Пример 15: Связывание антигена

Связывающие свойства различных вариантов иммуноцитокинов PM-IL15 с TA-MUC1 клеточной поверхности анализировали с помощью клеточной линии рака молочной

железы ZR-75-1, которая экспрессирует высокие уровни TA-MUC1. Опухолевые клетки инкубировали с указанными антителами в серийных разведениях, а связанные антитела детектировали с помощью козьего антитела к человеческому IgG (тяжелой и легкой цепи), конъюгированного с фикоэритрином. Связывание анализировали методом проточной цитометрии. Присоединение IL-15 к домену Ск или СН3 антитела (конструкции СН34GS, СН3oLi-oK, Ск4GS, Ск1GS) не влияло на свойства связывания с TA-MUC1 по сравнению с родительским антителом PankoMab. Присоединение IL-15 к области VL антитела (конструкция VL4GS) уменьшало способность связываться с TA-MUC1 (фигура 30).

Пример 16: Связывание рецептора IL-15

Свойства связывания различных конструкций PM-IL-15wt с субъединицами рецептора IL-15 анализировали методом ELISA. IL-15R (CD215) наносили на 96-луночные планшеты Maxisorp. Иммуноцитокнины PM-IL15 инкубировали в серийных разведениях, и связанные иммуноцитокнины определяли путем инкубации с меченным пероксидазой антителом в формате F(ab')₂-фрагмента человеческого IgG. Все протестированные конструкции были способны связываться с CD215 (фиг.31). PM-IL-15-CH34GS показал превосходное связывание с CD215 по сравнению с конструкциями слияния легкой цепи PM-IL-15-Ск4GS и PM-IL-15-Ск1GS.

Пример 17: Индукция клеточной пролиферации

IL-15 важен для выживания NK-клеток и CD8⁺ Т-клеток памяти, и существует несколько клеточных линий, происходящих от NK- или Т-клеток, пролиферация которых в равной степени зависит от этого цитокина. Линию мышиных Т-клеток CTLL-2 обычно используют для тестирования биологической активности рекомбинантного IL-15 с помощью анализа пролиферации, и клеточная линия лейкемии KHYG-1 mCD16 природных киллеров (KHYG 1, трансфицированная мышиным CD16) также отвечает на IL-15 путем пролиферации. Эти две клеточные линии использовали для тестирования биологической активности IL-15, слитого либо с СН3-, либо с Ск-доменом конструкций PM-IL15, по сравнению с рекомбинантным IL-15 (Miltenyi). Рекомбинантный IL-15 обладал более высокой способностью индуцировать пролиферацию клеток CTLL-2 (фиг. 32A) и KHYG-1 mCD16 (фиг. 32B) по сравнению с PM-IL-15-CH34GS и PM-IL-15-Ск4GS при нормализации на молярную концентрацию применяемого IL-15. Кроме того, хотя PM-IL-15-CH34GS и PM-IL-15-Ск4GS обладали одинаковой активностью в отношении индукции пролиферации клеток KHYG-1 mCD16 (фиг. 32B), PM-IL-15-CH34GS индуцировал более сильную пролиферацию CTLL-2 клеток по сравнению с PM-IL-15-Ск4GS (фиг. 32A), что, вероятно, связано с дифференциальной экспрессией цепей IL-15R на клеточных линиях.

Пример 18: Индукция противоопухолевой цитотоксичности

СН3- или Ск-слитые конструкции PM-IL-15 сравнивали с рекомбинантным IL-15 по их способности активировать первичные иммунные клетки. РВМС, полученные от здорового донора, инкубировали в течение 5 дней с указанными молекулами. Стимулированные РВМС окрашивали флуоресцентно меченными антителами к αCD3,

α CD4, α CD8, α CD14, α CD25, α CD45 и α CD56. Мертвые клетки исключали путем добавления перед анализом DAPI. Как показано на фиг.33, все протестированные молекулы были способны индуцировать экспрессию CD25 на NK-клетках (фиг.33А) и CD8+ Т-клетках (фиг.33В). Опять же, при нормализации на молярную концентрацию IL-15, присутствующего в анализе, по эффективности активации иммунных клеток рекомбинантный IL-15 превосходил обе конструкции PM-IL-15. Кроме того, PM-IL-15-CH34GS обладал несколько более высокой активностью индуцировать активацию иммунных эффекторных клеток по сравнению с PM-IL-15-Ск4GS.

Пример 19: *Индукция противоопухолевой цитотоксичности*

Затем изучали, можно ли наблюдать сходные различия между рекомбинантными IL-15 и CH3- или Ск-слитыми конструкциями PM-IL-15 в анализе гибели опухолевых клеток. Для этой цели TA-MUC1-положительные опухолевые клетки CaOV-3 выращивали в течение 24 ч в аналитических планшетах перед добавлением PM-IL-15-CH34GS, PM-IL-15-Ск4GS или рекомбинантного IL-15 и нестимулированных PBMC при соотношении 10:1 эффекторных клеток к целевым клеткам. Гибель опухолевых клеток оценивали через 24 часа путем количественного определения лактатдегидрогеназы (LDH), высвобождаемой в клеточный супернатант (Kit для определения цитотоксичности (LDH), Roche). Максимальное высвобождение достигали путем инкубации целевых клеток с тритоном X100, и независимую от антител гибель клеток измеряли в образцах, содержащих только целевые клетки и PBMC, но без антител. Как показано на фиг. 34, PM-IL-15-CH34GS и -Ск4GS индуцировали специфический лизис опухолевых клеток CaOV-3, при этом CH3-слитая конструкция показала более высокую активность по сравнению с Ск-слитой конструкцией, как наблюдалось ранее. Важно отметить, что хотя рекомбинантный IL-15 превосходно стимулировал активацию NK-клеток и CD8+ Т-клеток (фиг. 33), он не приводил к эффективному лизису опухолевых клеток, опосредованному иммунными клетками, как это наблюдалось в случае PM-IL-15-CH34GS и -Ск4GS (фиг.34, максимальный лизис с использованием рекомбинантного IL-15 составил ~20% по сравнению с 40% в случае использования PM-IL-15).

Пример 20: *Влияние структуры конструкции на фармакокинетику in vivo.*

Для изучения, влияет ли слияние IL-15 с доменом CH3 или Ск антитела на его фармакокинетический профиль, мышам C57BL/6 вводили внутривенно 2 мг/кг конструкций (n=3). Сыворотку собирали через 5 мин, 6 часов, 1, 2, 4, 7 и 11 дней после инъекции, и титры антител определяли с помощью ELISA. Планшеты Maxisorp F96 ELISA покрывали 2 мкг/мл мышинового антитела к легкой к-цепи человеческого Ig в 0,1 М карбонатном буфере, pH 9,6, в течение ночи. Неспецифическое связывание блокировали 5% (по объему) бычьим сывороточным альбумином (BSA) в PBS (BSA/PBS). Образцы сыворотки и стандарт разводили в 1% (по объему) BSA/5% (по объему) мышиной сыворотки/PBS и определяли с помощью козьего античеловеческого антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) (IgG, специфический к Fc γ -фрагменту). Для развития окраски в планшет для ELISA добавляли субстрат TMB One Component HRP

Microwell. Реакцию останавливали путем добавления 1,25 М серной кислоты, и сигналы измеряли при 450 нм и 620 нм с помощью микропланшетного ридера Tecan Infinite F200.

Как показано на фиг. 35, PM-IL-15-CH34GS демонстрировал более длинный $t_{1/2}$ и более высокую общую экспозицию (AUC) у мышей C57BL/6 по сравнению с PM-IL-15-Ск4GS. Такие же результаты наблюдали после подкожной инъекции обеих конструкций.

Пример 21: *Влияние структуры конструкции на фармакодинамику in vivo*

Затем исследовали, имеются ли различия в фармакодинамическом профиле PM-IL-15-CH34GS и -Ск4GS in vivo. Мышам (C57BL/6, n=3) вводили внутривенно и подкожно 2 мг/кг PM-IL-15wt CH34GS или Ск4GS и затем забивали в день 11 для сбора крови. Иммунные клетки из крови были охарактеризованы по фенотипу и частотам методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентно-меченных антител к CD3, CD4, CD8, CD44, CD45, CD45R, CD62L, CD122 и NK1.1. Применение PM-IL-15-CH34GS приводит к размножению NK-клеток (в 2 раза) после в/в и подкожной инъекции, в то время как использование PM-IL-15-Ск4GS не оказывало значительного влияния на компартмент NK-клеток в этот момент времени (фиг.36А). Тем не менее, инъекция обеих конструкций приводила к аналогичному увеличению экспрессии CD122 на NK-клетках, что подразумевает, что конструкция Ск4GS также способна рекрутировать NK-клетки (фиг. 36С). Анализ CD8⁺ Т-клеток показал, что обе конструкции способны увеличить общую частоту и экспрессию CD122 в этом подмножестве, но опять-таки PM-IL-15-CH34GS индуцировали более сильное размножение (в 1,5 раза) и активацию CD122, чем PM-IL-15-Ск4GS (1,3-кратное размножение) (фиг. 36В и D).

В популяции CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток обработка PM-IL-15-CH34GS и PM-IL-15-Ск4GS приводит к относительному сокращению наивных клеток и одновременно к увеличению клеток с фенотипом клеток центральной памяти (TCM) и эффекторных клеток (Teff) после в/в (фиг. 37А и С) и подкожной инъекции (фиг. 37В и D). Кроме того, PM-IL-15-CH34GS превосходила по мобилизации эффекторных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и клеток памяти по сравнению с конструкцией PM-IL-15-Ск4GS, независимо от используемого пути инъекции.

Пример 22: *Терапевтическая эффективность на модели опухоли in vivo*

Затем проанализировали, обладает ли нацеленный на ТА-MUC1 иммуноцитокин IL-15 потенциалом для улучшения результатов у мышей с опухолями. Поскольку гликоспецифический эпитоп ТА-MUC1 у мышей не обнаружен, клеточную линию 4Т1 карциномы молочной железы мыши трансфицировали MUC1, и ТА-MUC1-экспрессирующий трансфектант MUC1-4Т1 использовали в качестве модели опухоли для исследований in vivo. Описано, что опухоли, полученные из клеток 4Т1, являются высокоиммуносупрессивными, содержащими преимущественно миелоидные супрессорные клетки. Клетки MUC1-4Т1 инъецировали в жировую подушку молочной железы (mfp) и обрабатывали 0,25 мг/кг PM-IL-15-CH34GS в дни 1, 8 и 15. Объемы опухолей контролировали, затем, когда опухоли достигали объема 1 см³, мышей умерщвляли в соответствии с государственными рекомендациями. На фиг.38А показан

объем опухолей у мышей, обработанных PBS и PM-IL-15-CH34GS, в зависимости от времени; стрелки показывают дни введения доз. На фиг.38В показано выживание мышей. Применение PM-IL-15-CH34GS привело к задержке роста опухоли у 3 из 6 мышей (фиг. 38А) в этой высоко супрессивной модели, что также отражено в более длительной выживаемости мышей, обработанных PM-IL-15-CH34GS, по сравнению с группой PBS (фиг.38В).

Комбинация PM-IL-15 с другими терапевтическими агентами

Пример 23: *Активация иммунных клеток с помощью PM-IL-15 в комбинации с PM-CD3*

Идея терапии иммуноцитоклином PM-IL-15 заключается в том, что он не только сам активирует иммунные клетки, но и дополнительно усиливает имеющиеся иммунные ответы, стимулируя NK и Т-клетки. Для проверки этой гипотезы, объединяли рекрутер Т-клеток, нацеленный на TA-MUC1 (PM-CD3; биспецифическое антитело, в котором фрагменты scFv к CD3 слиты с С-концом тяжелых цепей анти-TA-MUC1 антитела панкомаб) с PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA, и анализировали активацию Т-клеток, пролиферацию Т-клеток и цитотоксичность.

Для анализа активации Т-клеток PBMC, полученные от здорового донора, инкубировали с PM-IL-15-CH34GS в отсутствие или в присутствии субоптимальной концентрации (0,4 мкг/мл и 2 мкг/мл, соответственно) PM-CD3. Активацию Т-клеток анализировали через 2 дня путем окрашивания стимулированных PBMC флуоресцентно мечеными антителами к α CD4, α CD8, α CD14, α CD19, α CD25, α CD45, α CD56 и α CD69. Мертвые клетки исключали путем добавления перед анализом DAPI методом проточной цитометрии.

На фиг.39 показано, что PM-CD3 в виде однократной терапии в субоптимальных концентрациях индуцировал слабую экспрессию CD25 на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках. PM-IL-15wt индуцировала зависимое от концентрации увеличение CD25 в обеих подгруппах Т-клеток, которое на CD4⁺ Т-клетках дополнительно усиливалось в присутствии опухолевых клеток CaOV-3. Интересным оказалось то, что комбинация PM-IL-15wt только с PM-CD3 в дозе 0,4 мкг/мл (2 нМ) сильно усиливала экспрессию CD25 на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках. Важно отметить, что наблюдаемые эффекты были не только аддитивными, но и высоко синергетическими и могли быть дополнительно усилены путем увеличения количества PM-CD3 до 2 мкг/мл (10 нМ).

Пример 24: *Пролиферация иммунных клеток с помощью PM-IL-15 в комбинации с PM-CD3*

Для анализа влияния иммуноцитоклинов PM-IL-15 на пролиферацию Т-клеток, индуцированную PM-CD3, PBMC, полученные от здорового донора, инкубировали с PM-CD3 в отсутствие или в присутствии 1 мкг/мл PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA. PBMC, меченные CellTraceTM Violet (Thermo Fisher), инкубировали в течение 5 дней с указанными молекулами и TA-MUC1-положительными опухолевыми клетками CaOV-3. Стимулированные PBMC окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами к CD4,

CD8, CD14, CD19, CD45 и CD56. Мертвые клетки исключали путем окрашивания перед анализом 7-AAD (Sigma-Aldrich) методом проточной цитометрии.

Только PM-CD3 был способен индуцировать пролиферацию Т-клеток CD4⁺ (фиг. 40A) и CD8⁺ Т-клеток (фиг. 40B) в присутствии опухолевых клеток CaOV-3. Удивительным оказалось то, что, хотя PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA не могли сами по себе индуцировать пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в этой концентрации, они в значительной степени усиливали опосредованную PM-CD3 пролиферацию высоко синергетическим образом. PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA продемонстрировали сопоставимую активность в отношении стимуляции пролиферации, индуцированной PM-CD3.

Пример 25: *Цитотоксичность PM-IL-15 в комбинации с PM-CD3*

Также оценивали эффективность комбинации иммуноцитокинов PM-IL-15 и PM-CD3 в отношении гибели опухолевых клеток. TA-MUC1-положительные опухолевые клетки CaOV-3 выращивали в течение 24 ч в аналитических планшетах перед добавлением нестимулированных PBMC при соотношении 10:1 эффекторных клеток к целевым клеткам. PM-CD3 добавляли отдельно или в комбинации с указанными концентрациями PM-IL-15wt и PM-IL-15wt NA. Гибель опухолевых клеток оценивали через 24 часа путем количественного определения лактатдегидрогеназы (LDH), высвобождаемой в клеточный супернатант (Kit для определения цитотоксичности (LDH), Roche). Максимальное высвобождение было достигнуто путем инкубации целевых клеток с тритоном X100, и независимую от антител гибель клеток измеряли в образцах, содержащих только целевые клетки и PBMC, но без антител.

При однократной терапии иммуноцитокины PM-CD3 и PM-IL-15 были способны индуцировать лизис опухолевых клеток CaOV-3 от легкой до умеренной степени (фиг. 41). Удивительным оказалось то, что добавление PM-IL-15wt или PM-IL-15wt NA снова приводило не только к аддитивному, но и синергетическому усилению специфического лизиса опухолевых клеток (фиг. 41A и B). При добавлении только 1 мкг/мл PM-IL-15wt к 200 нМ PM-CD3 специфический лизис опухолевых клеток CaOV-3 увеличился с 34% до 75%. Конструкция PM-IL-15wt NA оказалась немного менее эффективной (максимальный лизис 62%). На фиг.41C показано, что комбинированный эффект также зависит от концентрации используемых иммуноцитокинов PM-IL-15. Путем увеличения концентрации PM-IL-15wt NA от 1 мкг/мл до 5 мкг/мл, можно было дополнительно снизить значения EC50 и увеличить максимальный лизис опухолевых клеток.

Пример 26: *Комбинация иммуноцитокина PM-IL-15 с PD-L1 или PD-1-таргетной терапией*

Как описано выше, иммуноцитокин PM-IL-15 сам по себе опосредует активацию иммунных клеток, но также способен усиливать ответы НК и Т-клеток, индуцированные другим лекарственным средством (например, биспецифическим рекрутером Т-клеток). Ингибиторы контрольных точек, нацеленные на PD-1/PD-L1, широко используются в клинике, и, таким образом, для анализа, имеются ли основания для комбинации этих

агентов с нацеленным на TA-MUC1 иммуноцитокинном IL-15, проводили исследования *in vitro*. Сначала анализировали, изменяется ли экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках и моноцитах после инкубации с PM-IL-15-CH34GS. TA-MUC1-положительные клетки плоскоклеточной карциномы языка HSC-4 выращивали в течение 24 ч в аналитических планшетах перед добавлением свежевыделенных PBMC при соотношении 10:1 эффекторных клеток к целевым клеткам. Добавляли PM-IL-15-CH34GS (20 нМ) или PBS, и планшеты культивировали в течение 48 часов. Опухолевые клетки и PBMC собирали и анализировали на экспрессию PD-L1. Как показано на фиг. 42, добавление PM-IL-15-CH34GS значительно увеличивало экспрессию PD-L1 на опухолевых клетках HSC-4 (фиг.42A) и моноцитах (фиг.42B).

Затем исследовали возможность объединения иммуноцитокиннов PM-IL-15 с нацеленным на PD-L1 антителом авелумабом (Bavencio®) в анализе гибели опухолевых клеток. TA-MUC1-положительные опухолевые клетки HSC-4 выращивали в течение 24 ч в аналитических планшетах перед добавлением нестимулированных PBMC при соотношении 10:1 эффекторных клеток к целевым клеткам. PM-IL-15-CH34GS добавляли отдельно или в комбинации с указанными концентрациями авелумаба или hIgG1 в качестве контроля. Гибель опухолевых клеток оценивали через 24 часа путем количественного определения лактатдегидрогеназы (ЛДГ), высвобождаемой в клеточный супернатант, как описано ранее.

При однократной терапии PM-IL-15-CH34GS и авелумаб были способны индуцировать слабый лизис (~9%) опухолевых клеток HSC-4 (фиг. 43). Удивительным оказалось, что комбинация PM-IL-15-CH34GS с авелумабом в значительной степени увеличивала специфический лизис опухолевых клеток не только аддитивно, но и синергически. Концентрация PM-IL-15-CH34GS, составляющая всего 0,8 нМ, оказалась достаточной для трехкратного увеличения лизиса опухолевых клеток, индуцированного только авелумабом (от 8,9 до 26,5%). Этот эффект может быть дополнительно усилен путем увеличения концентрации PM-IL-15-CH34GS (макс. наблюдаемый лизис 54%).

Другим общепринятым методом исследования способности ингибиторов контрольных точек PD-1/PD-L1 активировать Т-клетки *in vitro* является аллогенная реакция смешанных лимфоцитов (MLR), в которой дендритные клетки, полученные из моноцитов (moDC), и Т-клетки, полученные от разных доноров, инкубируют совместно, для имитации иммуносупрессивных эффектов, возникающих при взаимодействии PD-L1 и PD-1. Моноциты выделяли из PBMC, полученных от здорового донора, и moDC получали путем культивирования моноцитов в среде, дополненной кондиционированной средой GM-CSF и IL-4. Через семь дней moDC собирали и культивировали в 96-луночных планшетах вместе с аллогенными Т-клетками в соотношении 1:10 в присутствии 1 мкг/мл каждого тестируемого антитела. Клетки собирали через 5 дней и анализировали методом проточной цитометрии на экспрессию CD25 на CD8⁺ Т-клетках. Добавление PM IL-15-CH34GS и авелумаба приводило к увеличению активации CD8 Т-клеток, которую определяли по увеличенному уровню экспрессии CD25, по сравнению с контролем

(увеличение на 5,4% и 3,9% соответственно; фиг.44). Однако комбинация РМ IL-15-CH34GS с авелумабом привела к увеличению экспрессии CD25 с 7,1% до 24,3% (увеличение на 17,2%), что подразумевает синергизм обоих антител.

Пример 27: Комбинация иммуноцитокина РМ-IL-15 с анти-EGFR-терапией

Затем исследовали возможность усиления действия нацеленных на EGFR терапевтических средств. Erbitux® (классический hIgG1, цетуксимаб) и CetuGEX® (томузотуксимаб, гликозип-глико-оптимизированный цетуксимаб второго поколения) тестировали в комбинации с РМ-IL-15-CH34GS в анализе гибели опухолевых клеток, как описано в примере 19. Опухолевые клетки HSC-4, которые экспрессируют сходные количества TA-MUC1 и EGFR (внутренний анализ), использовали в качестве целевых клеток. Как показано на фиг.45, использование только CetuGEX® индуцировало зависимое от концентрации высвобождение LDH, которое было выше, чем при использовании только Erbitux®. Добавление только 20 нМ (3,5 мкг/мл) РМ-IL-15-CH34GS значительно увеличивало высвобождение LDH в комбинации с Erbitux® и CetuGEX® при определенных пороговых концентрациях (>0,1 нг/мл для CetuGEX® и >1 нг/мл для Эрбитукс®). Это указывает на то, что иммуноцитокин РМ-IL-15 обладает потенциалом для усиления ответа на анти-EGFR терапию синергетическим образом.

Пример 28: Усиление экспрессии IL-15R с помощью агониста CD40

Другими представляющими интерес партнерами для комбинации с иммуноцитокином РМ-IL-15 являются другие иммуностимулирующие препараты, такие как анти-CD40 антитела. На фиг.46 показана экспрессия IL-15R α (CD215) на NK, NKT, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, проанализированная методом проточной цитометрии после инкубации РВМС в течение 3 дней с увеличивающимися концентрациями глико-оптимизированного анти-CD40 IgG1 (Glycotope GmbH) по сравнению с необработанными клетками. Обработка анти-CD40 антителом приводила к повышенной экспрессии CD215 на NK, NKT и CD8⁺ Т-клетках, но не на CD4⁺ Т-клетках (фиг.46). Эти данные подразумевают, что перекрестная презентация IL-15 может быть улучшена в присутствии анти-CD40mAb, тем самым увеличивая активность иммуноцитокина на основе IL-15.

Идентификация депонированного биологического материала

Линии клеток DSM ACC 2806, DSM ACC 2807 и DSM ACC 2856 были депонированы в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) компанией Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin (DE) в даты, указанные в приведенной ниже таблице.

Название клеточной линии	Номер доступа	Депозитарий	Дата депонирования
NM-H9D8	DSM ACC 2806	Glycotope GmbH	15 сентября 2006 г.
NM-H9D8-E6	DSM ACC 2807	Glycotope GmbH	5 октября 2006 г.
NM-H9D8-E6Q12	DSM ACC 2856	Glycotope GmbH	8 августа 2007 г.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция слитого белка, содержащая

- (i) модуль антитела, специфически связывающийся с MUC1, и
- (ii) модуль IL-15.

2. Конструкция слитого белка по п.1, в которой модуль антитела имеет одну или более из следующих характеристик:

(a) содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи;

(c) содержит две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела;

(d) представляет собой модуль антитела типа IgG, в частности модуль антитела типа IgG1;

(e) специфически связывается с эпитопом TA-MUC1;

(f) содержит набор последовательностей CDR с CDR-H1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR-H2, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, CDR-H3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, CDR-L1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR-L2, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и CDR-L3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

(g) содержит набор последовательностей CDR с CDR-H1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR-H2, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, CDR-H3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, CDR-L1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR-L2, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и CDR-L3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

(h) содержит по меньшей мере одну, в частности две вариабельные области тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или 34 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична ей, и по меньшей мере одну, в частности две вариабельные области легкой цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична ей.

3. Конструкция слитого белка по п.1 или п.2, в которой модуль IL-15 содержит человеческий IL-15 или его фрагмент.

4. Конструкция слитого белка по п.3, в которой человеческий IL-15 или его фрагмент имеет одну или более из следующих характеристик:

(a) специфически связывается с рецептором интерлейкина, содержащим β -цепь рецептора IL-2, общую γ -цепь и α -цепь рецептора IL-15;

(b) содержит последовательность SEQ ID NO: 21;

(c) содержит мутацию, уменьшающую связывание рецептора, такую как I67E.

5. Конструкция слитого белка по п.3 или п.4, в которой модуль IL-15 дополнительно содержит α -цепь человеческого рецептора IL-15 или ее фрагмент, который специфически связывается с человеческим IL-15.

6. Конструкция слитого белка по любому из пп.1-4, в которой модуль IL-15 не содержит α -цепь рецептора IL-15 или ее фрагмент, который специфически связывается с IL-15.

7. Конструкция слитого белка по любому из пп.1-6, в которой модуль антитела содержит сайт N-гликозилирования в любом домене CH2 в тяжелых цепях антитела.

8. Конструкция слитого белка по любому из пп.1-7, содержащая:

(i) один модуль антитела, который содержит две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела; и

(ii) два модуля IL-15, причем один модуль IL-15 слит с C-концом каждой тяжелой цепи антитела через пептидный линкер.

9. Конструкция слитого белка по любому из пп.1-7, содержащая:

(i) один модуль антитела, который содержит две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела; и

(ii) два модуля IL-15, причем один модуль IL-15 слит с C-концом каждой легкой цепи антитела через пептидный линкер.

10. Конструкция слитого белка по любому из пп.1-9, содержащая дополнительный агент, конъюгированный с ней.

11. Нуклеиновая кислота, кодирующая конструкцию слитого белка по любому из пп.1-10.

12. Экспрессионная кассета или вектор, содержащие нуклеиновую кислоту по п.11 и промотор, функционально связанный с указанной нуклеиновой кислотой.

13. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.11 или экспрессионную кассету или вектор по п.12.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию слитого белка по любому из пп.1-10 и один или более дополнительных компонентов, выбранных из группы, состоящей из растворителей, разбавителей и вспомогательных веществ.

15. Конструкция слитого белка по любому из пп. 1-10 или фармацевтическая композиция по п. 14 для применения в качестве лекарственного средства.

16. Конструкция слитого белка по любому из пп.1-10 или фармацевтическая композиция по п.14 для применения для лечения, прогнозирования, диагностики и/или мониторинга заболеваний, ассоциированных с аномальным ростом клеток, таких как рак, инфекций, таких как бактериальные, вирусные, грибковые или паразитарные инфекции, и заболеваний, ассоциированных со снижением иммунной активности, таких как иммунодефициты.

17. Конструкция слитого белка или фармацевтическая композиция для применения для лечения, прогнозирования, диагностики и/или мониторинга рака по п.16, причем рак выбирают из группы, состоящей из рака молочной железы, толстой кишки, желудка,

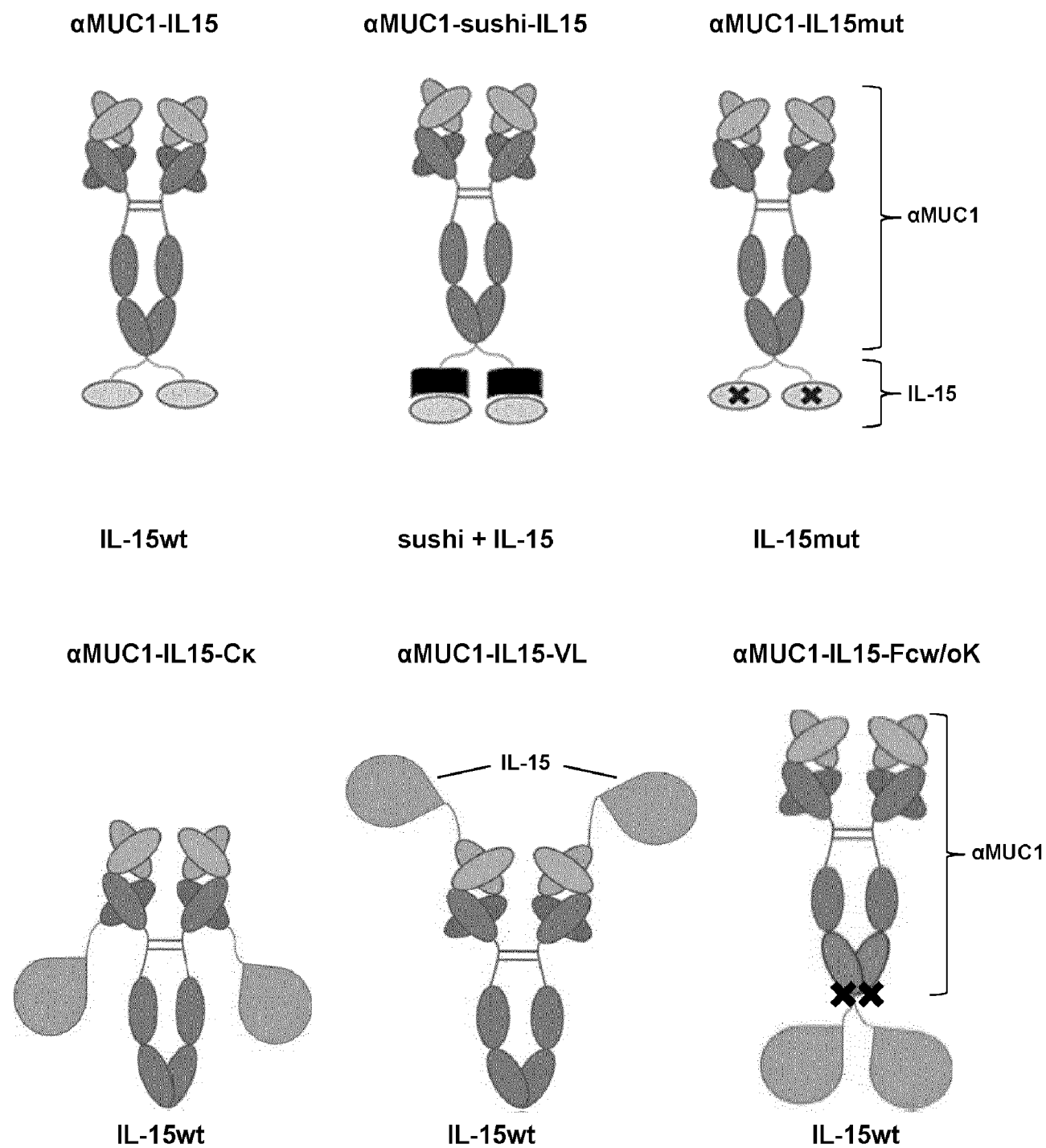
печени, поджелудочной железы, почек, крови, легких, эндометрия, щитовидной железы и яичника.

18. Конструкция слитого белка или фармацевтическая композиция для применения в медицине по любому из пп.15-17, причем конструкцию слитого белка используют в комбинации с дополнительным агентом.

19. Конструкция слитого белка или фармацевтическая композиция для применения в медицине по п.18, причем дополнительный агент выбирают из группы, состоящей из биспецифического антитела, нацеленного на MUC1 и CD3, анти-PD-L1 антитела, анти-EGFR антитела и анти-CD40 антитела.

1/40

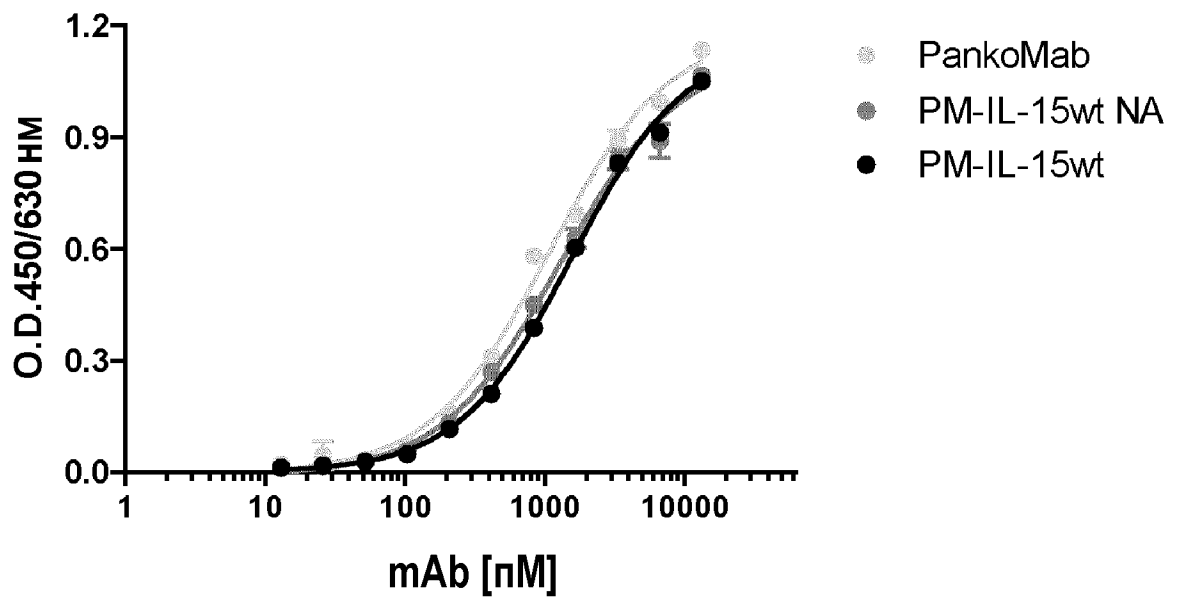
ФИГ.1



ФИГ.2

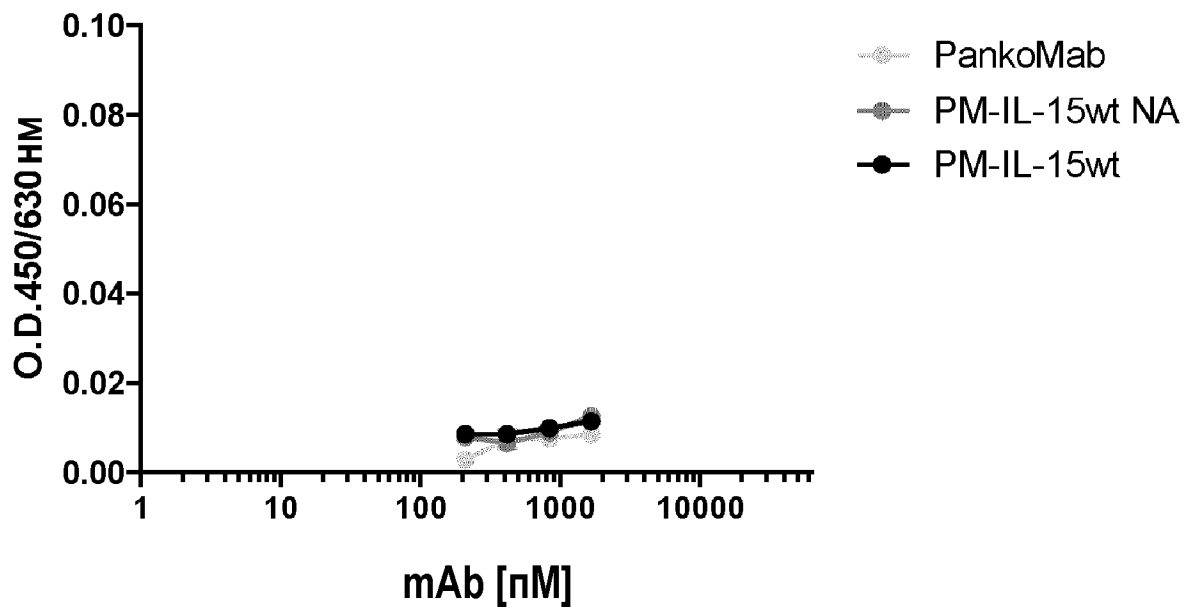
A)

Гликозилированный MUC1 пептид



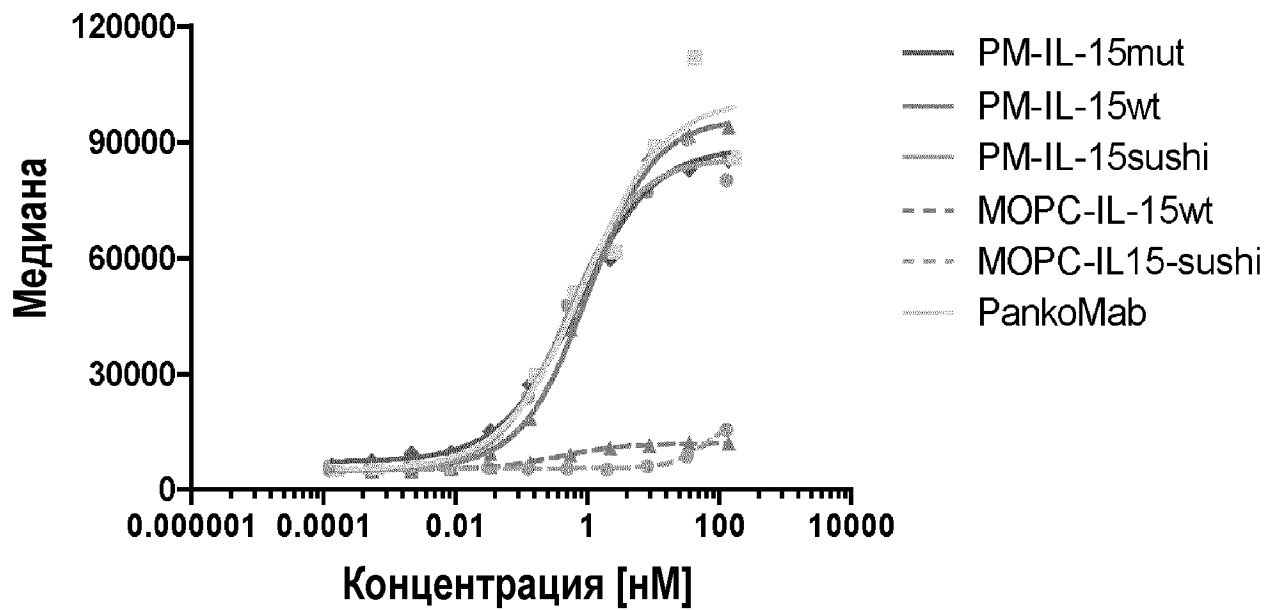
B)

Негликозилированный MUC1 пептид

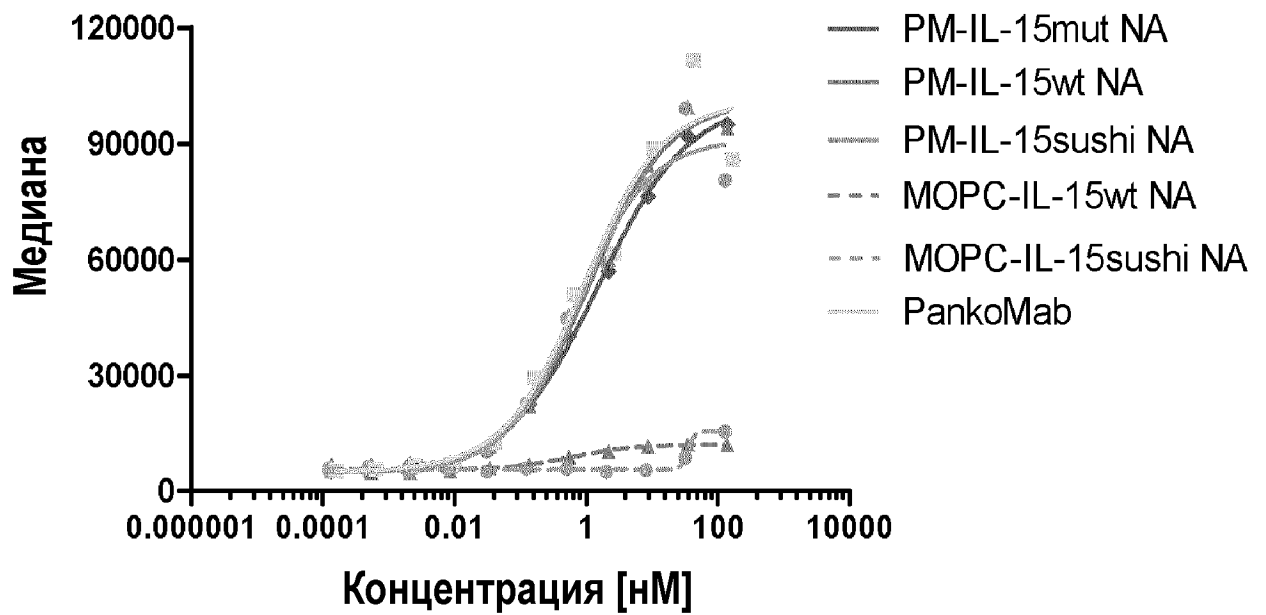


ФИГ.3

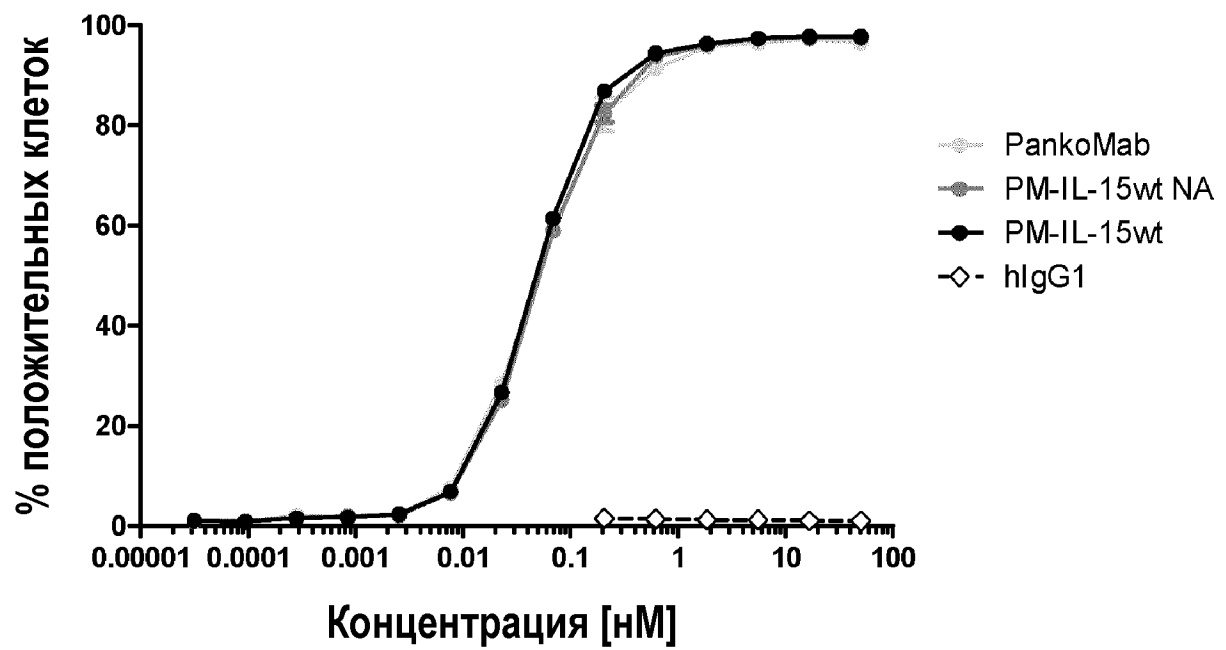
A)



B)

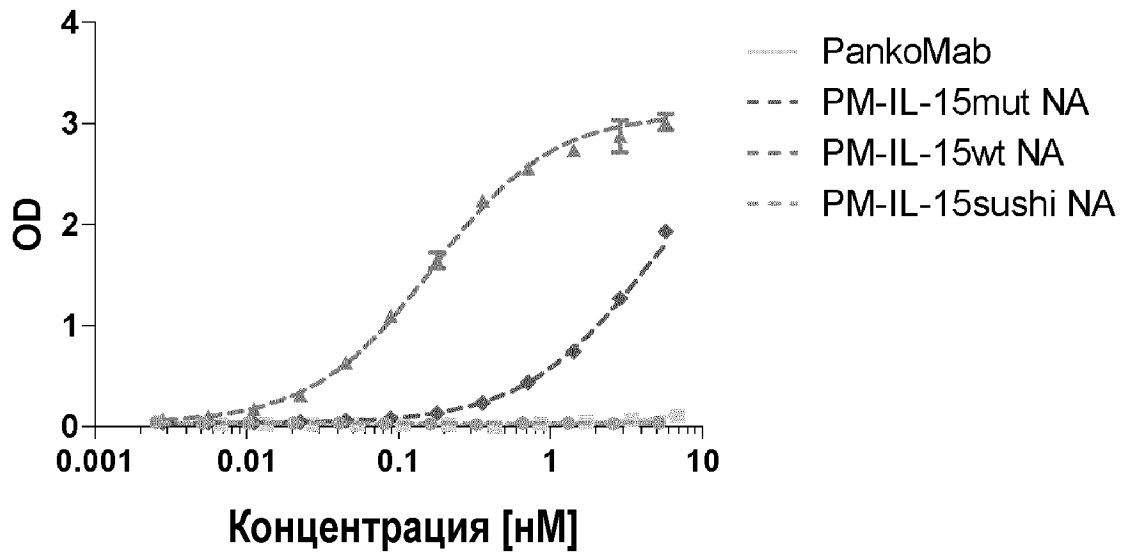


ФИГ.4

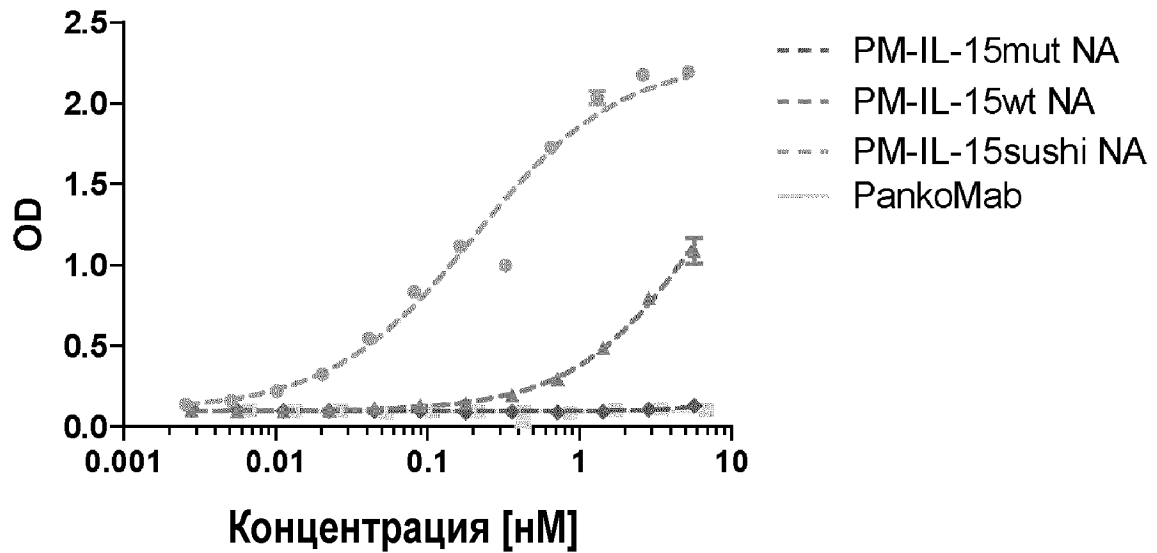


ФИГ.5

A)

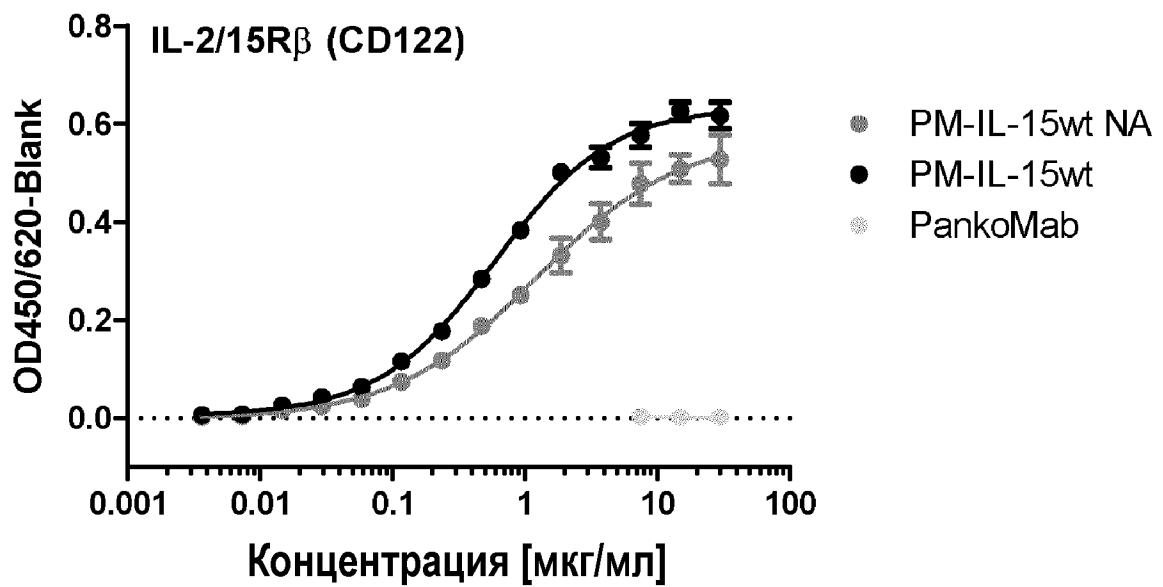


B)

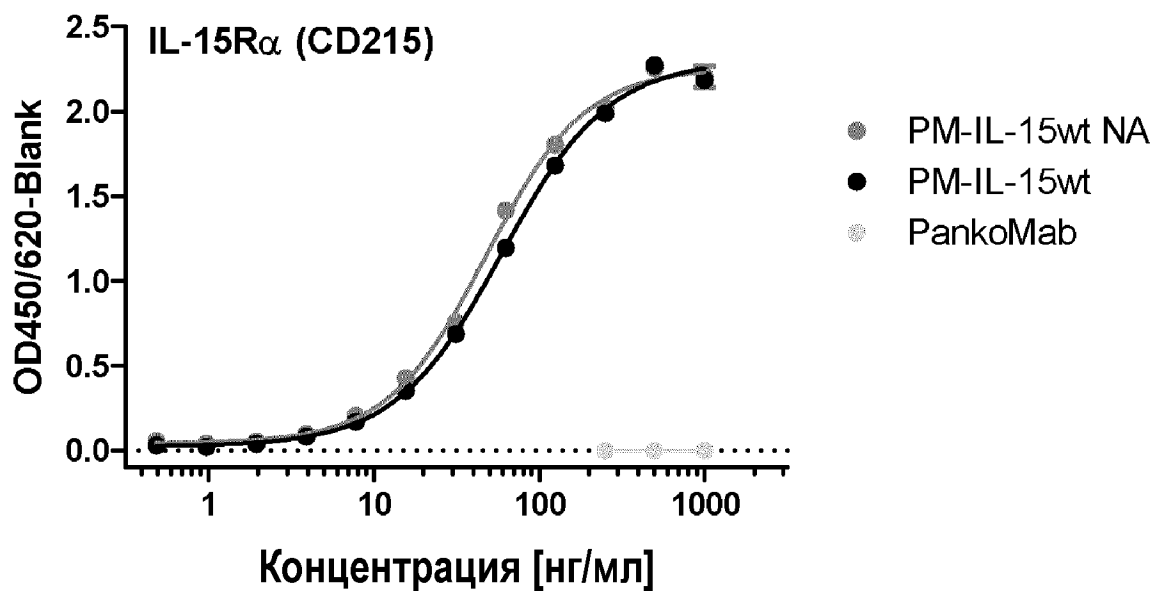


ФИГ.6

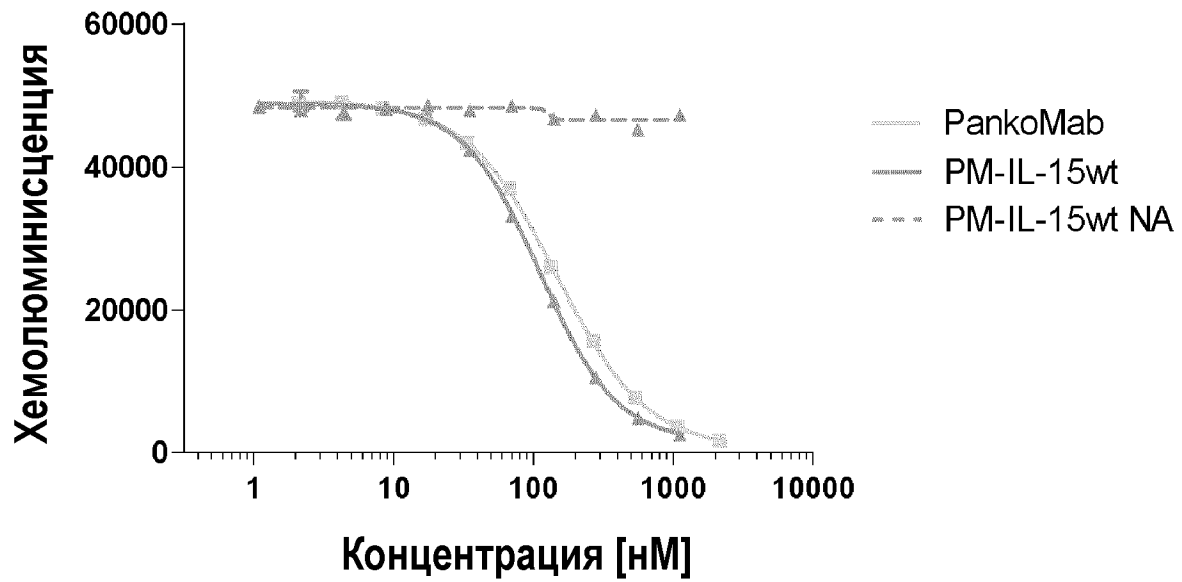
A)



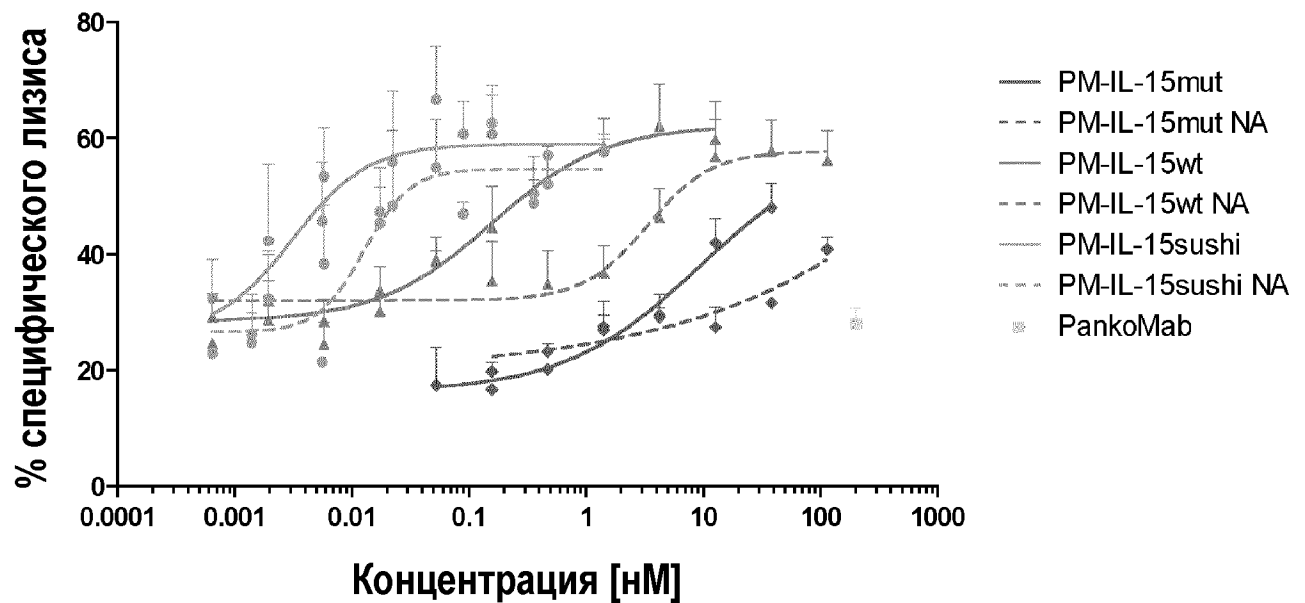
B)



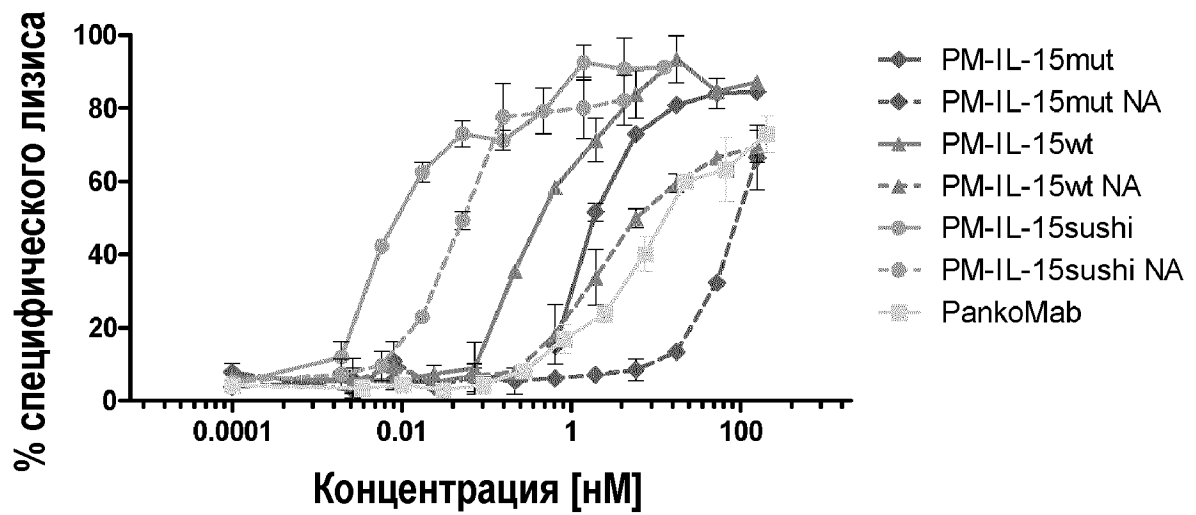
ФИГ.7



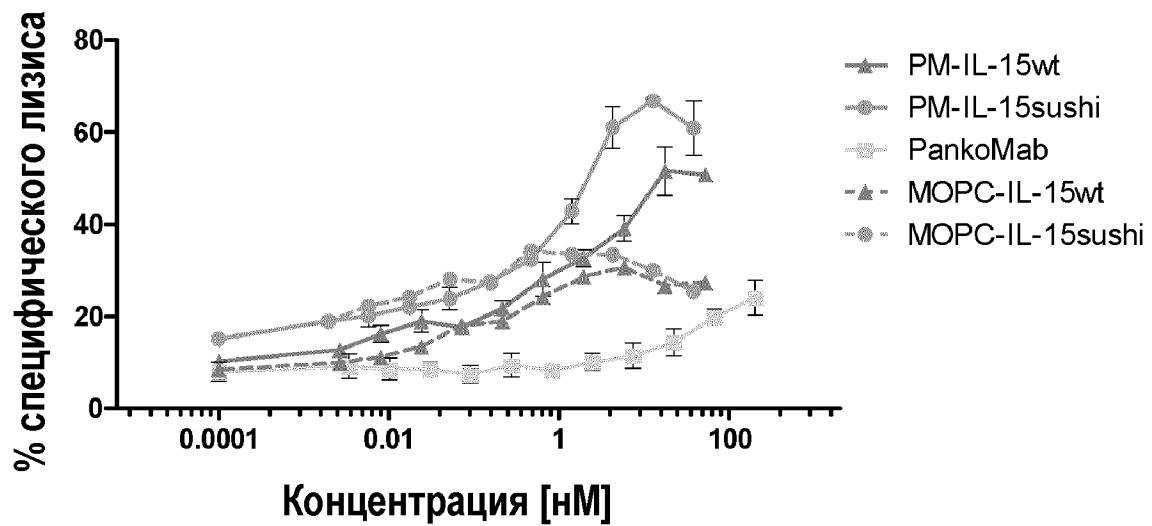
ФИГ.8



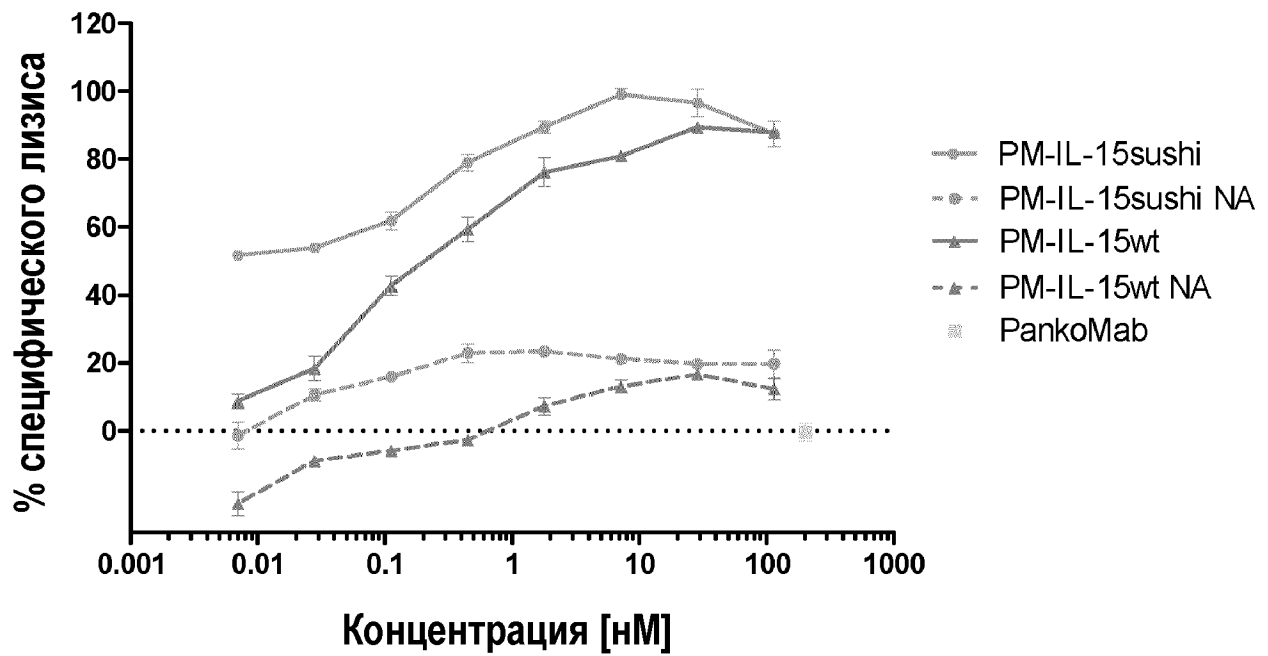
ФИГ.9



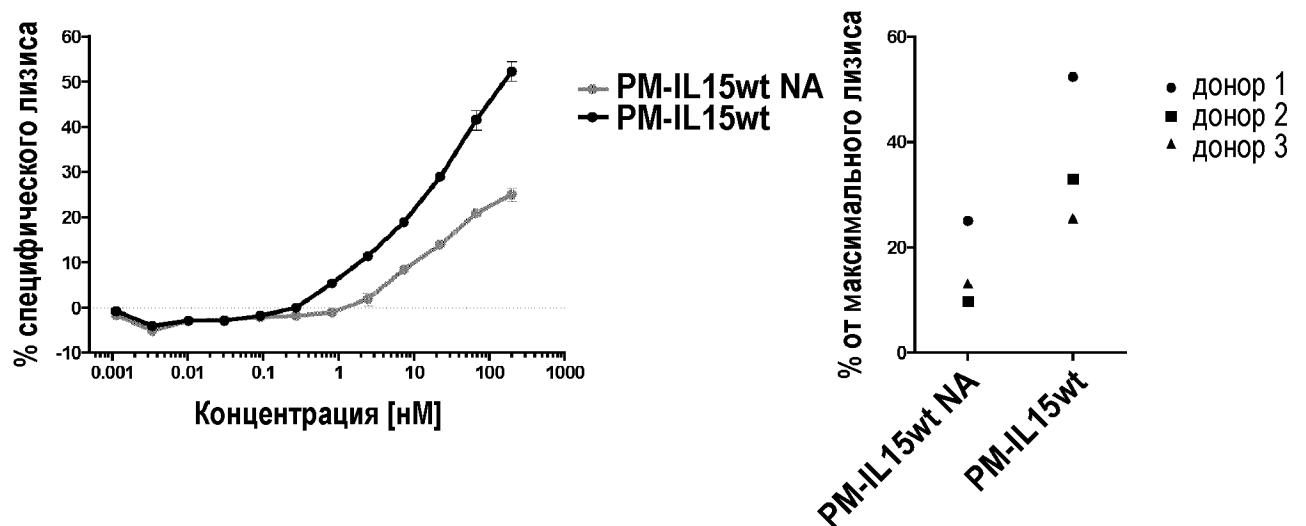
ФИГ.10



ФИГ.11

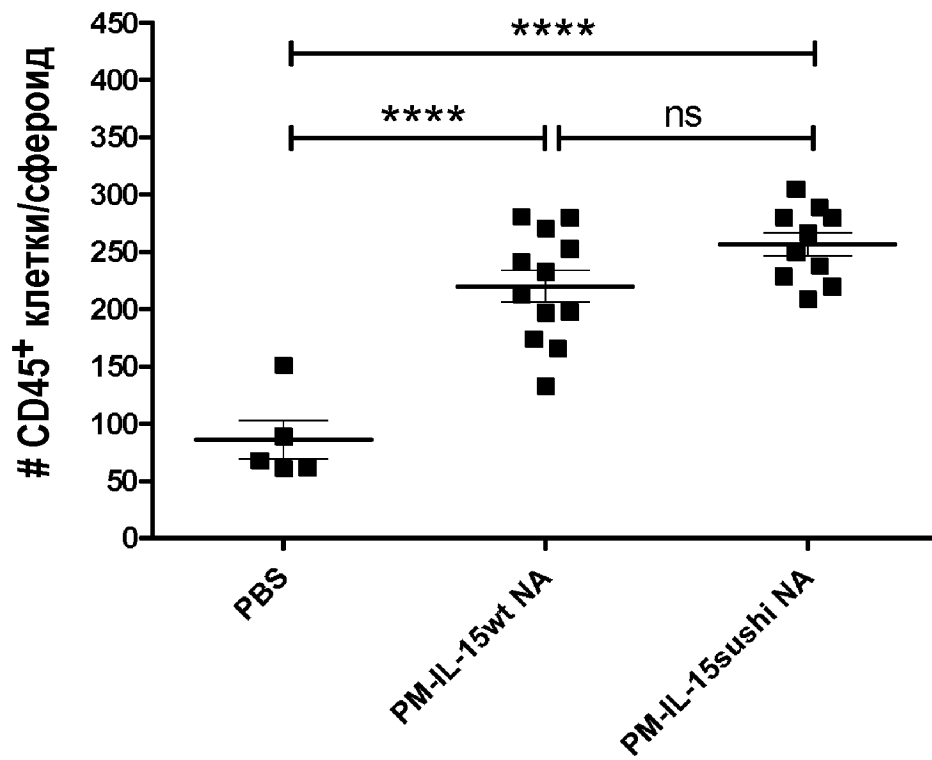


ФИГ.12

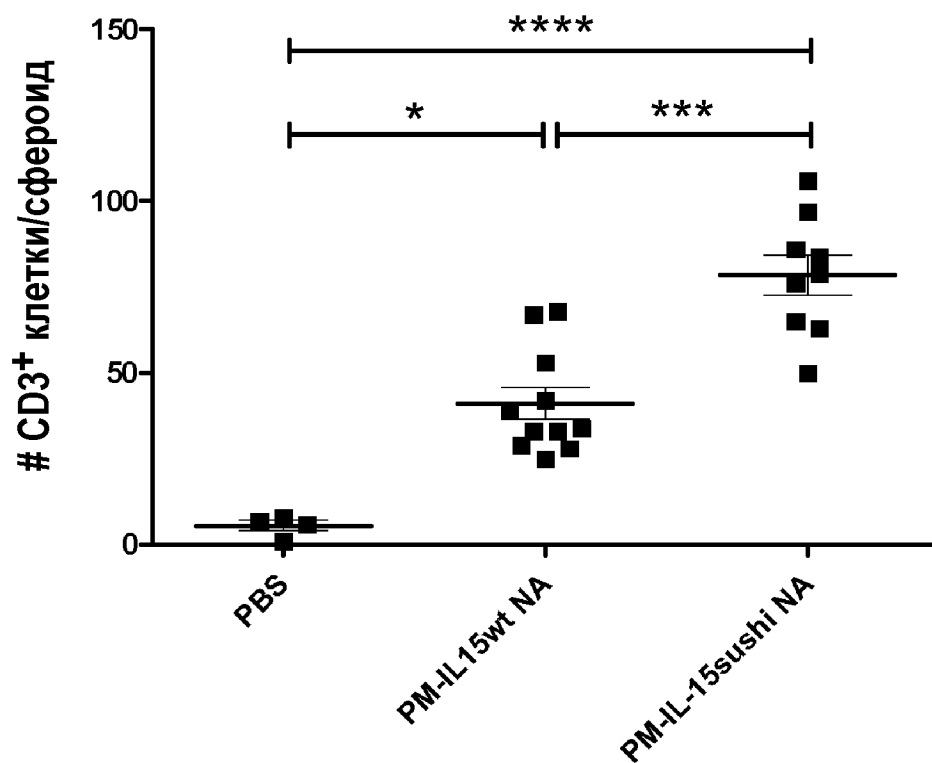


ФИГ.13

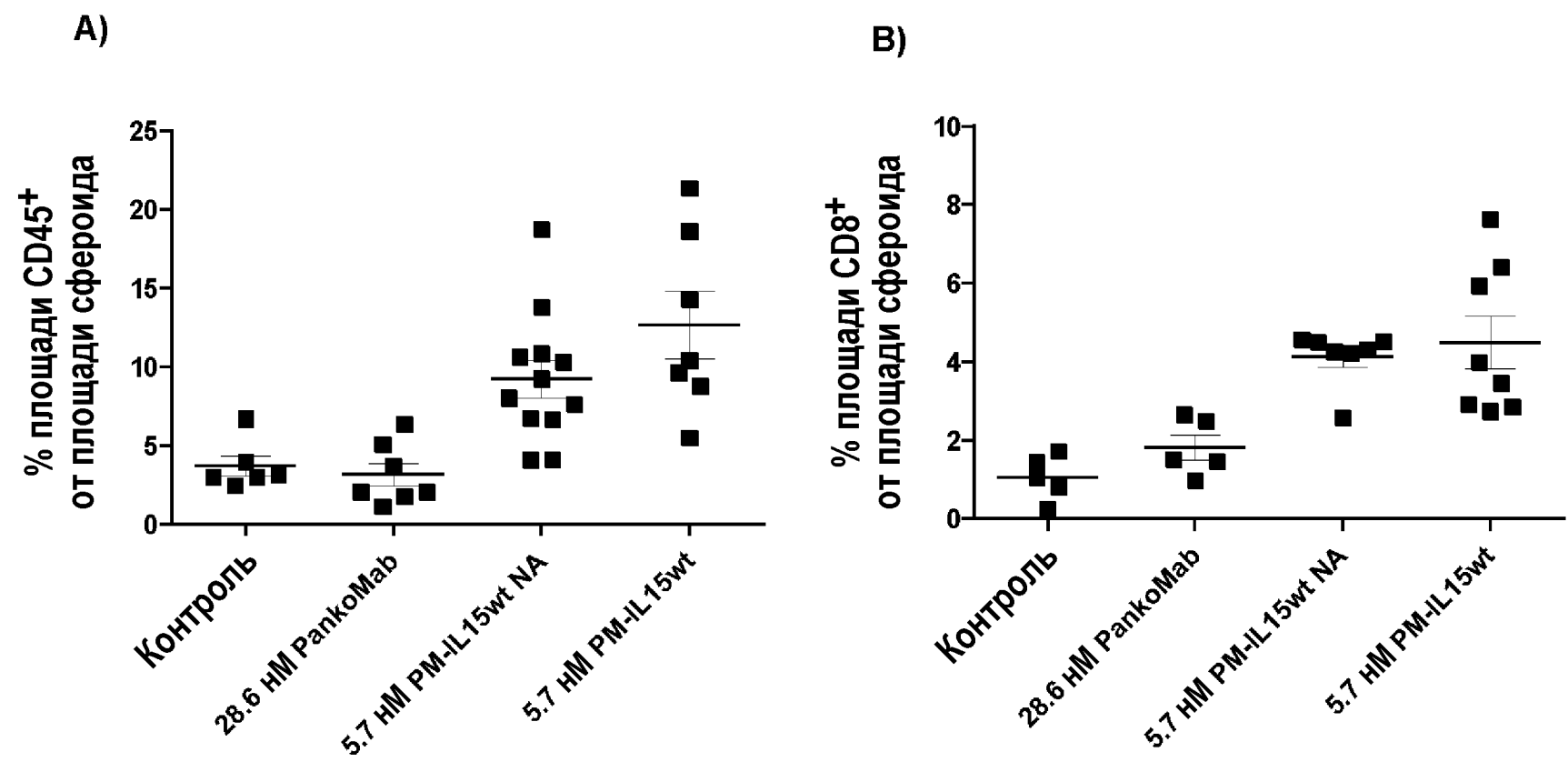
A)



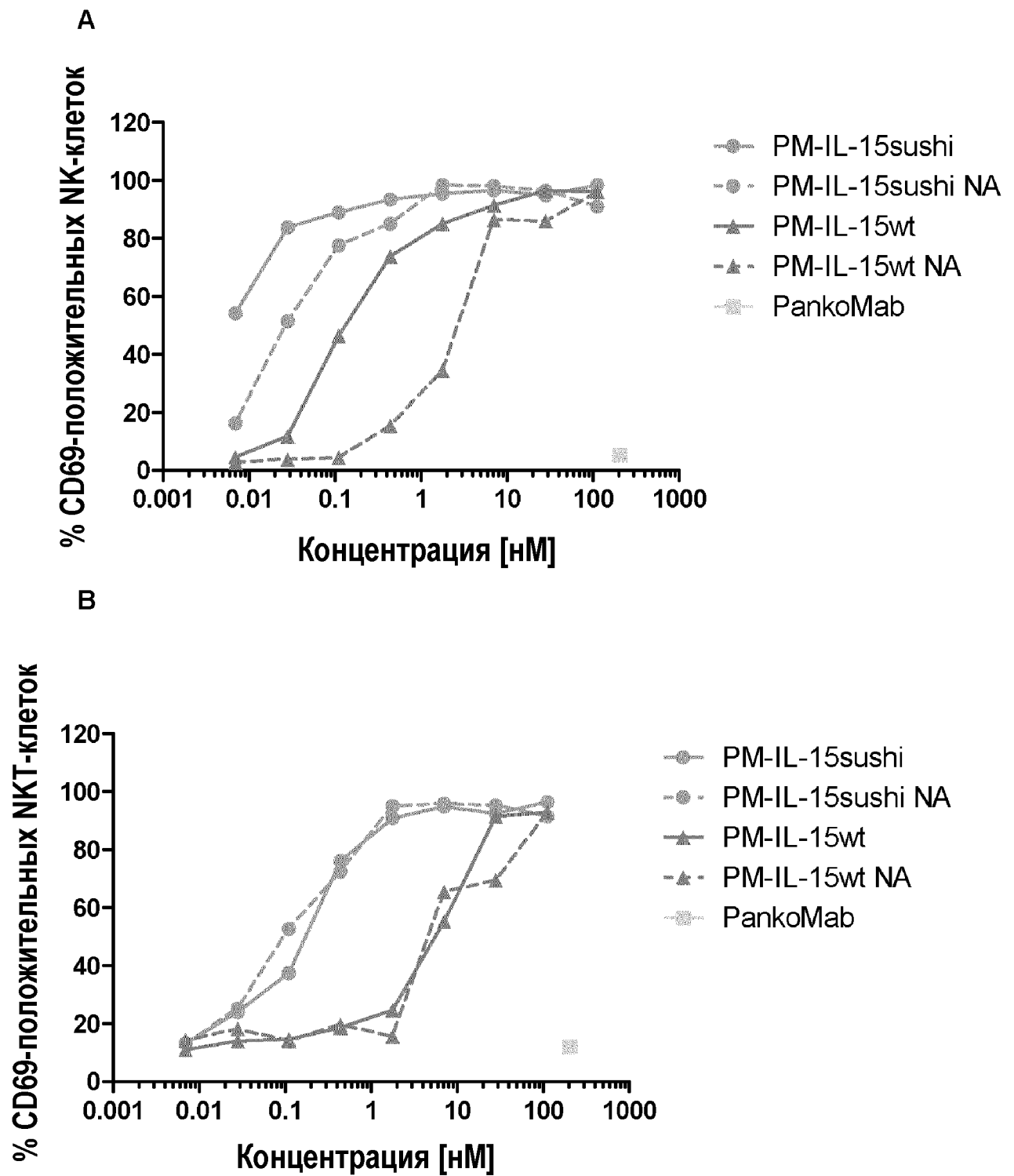
B)



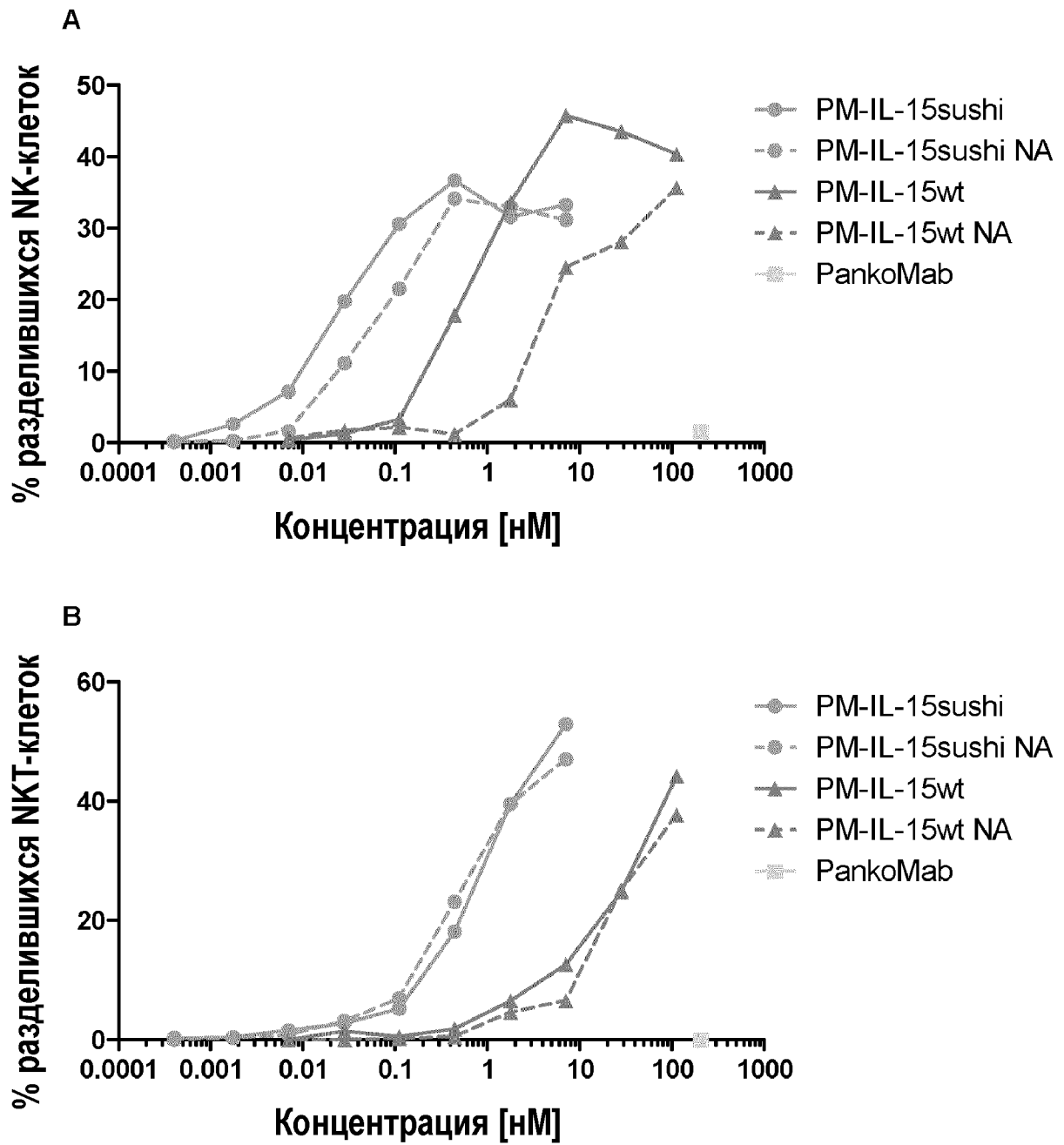
ФИГ.14



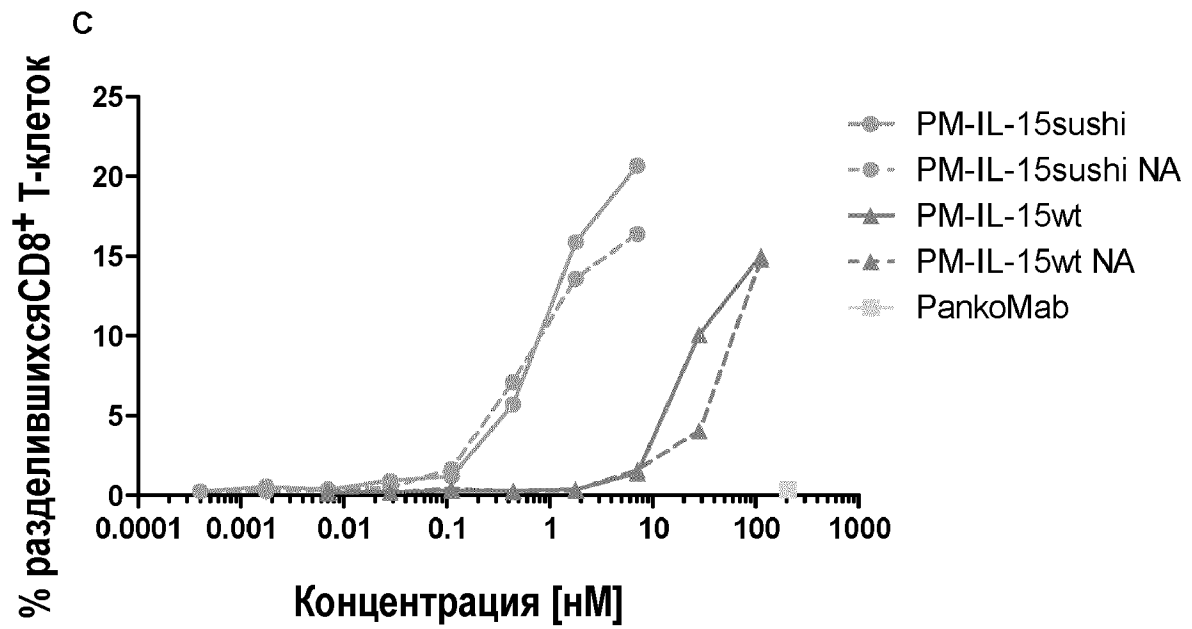
ФИГ.15



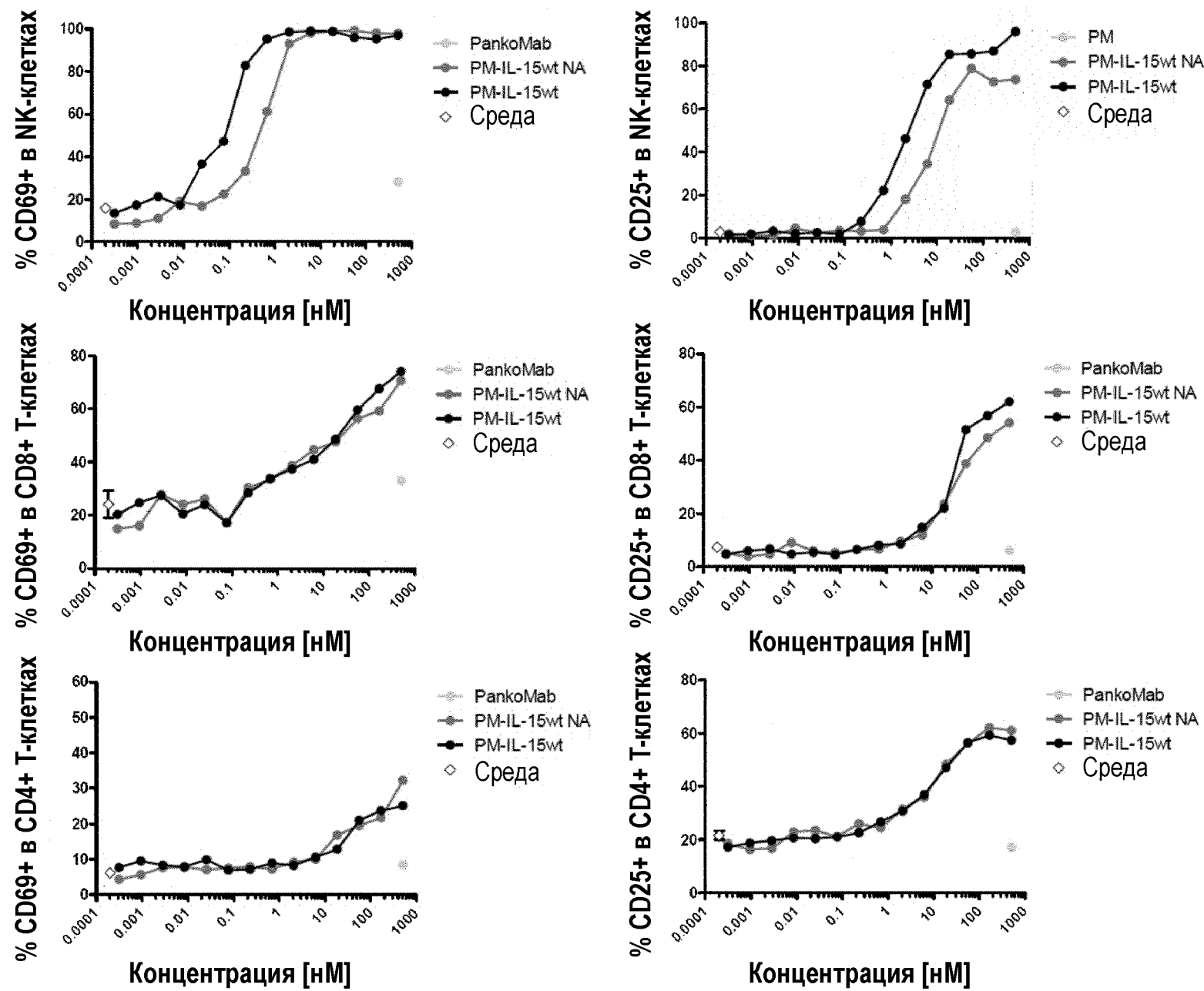
ФИГ.16



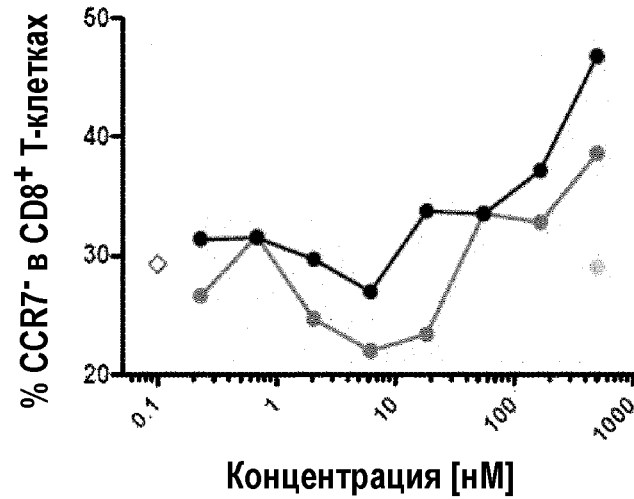
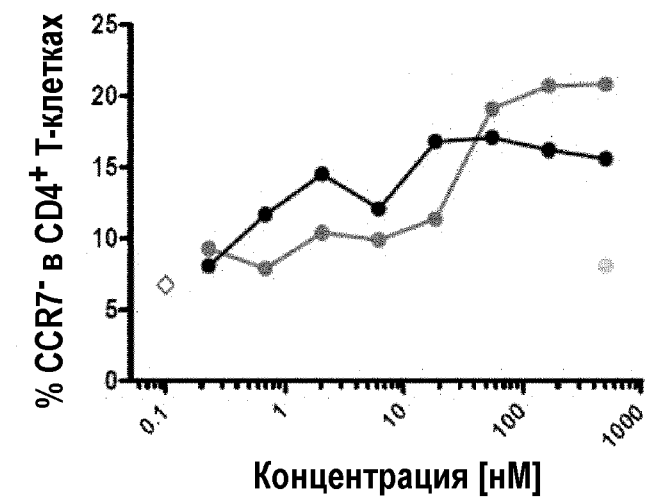
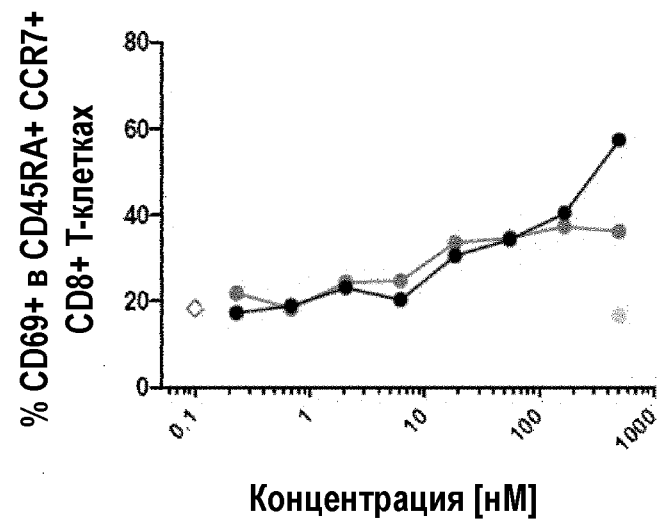
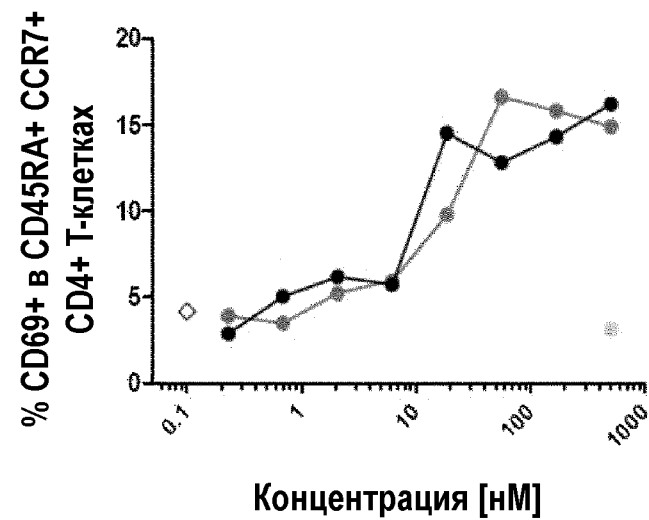
ФИГ.16, продолжение



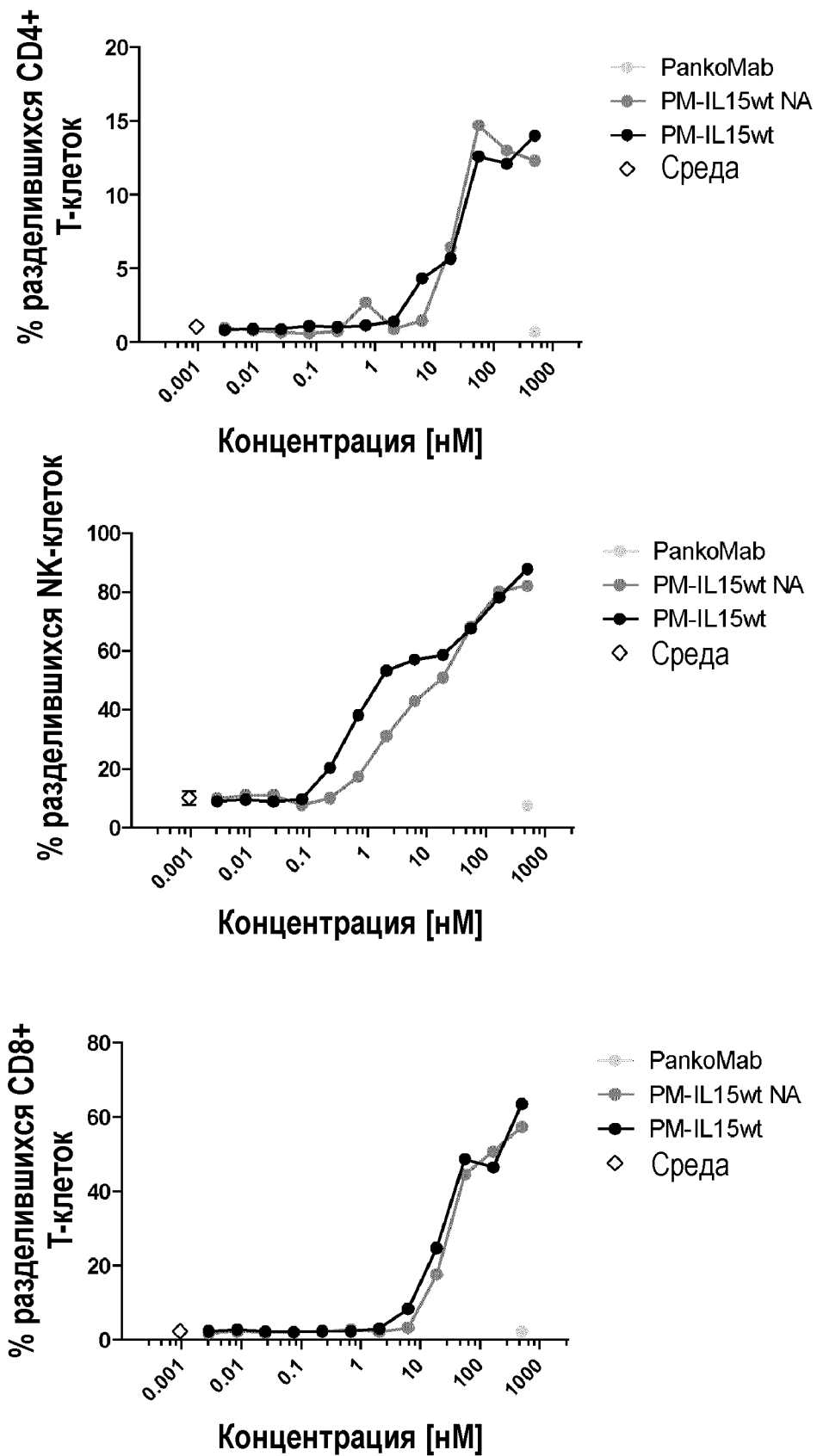
ФИГ.17



ФИГ.18

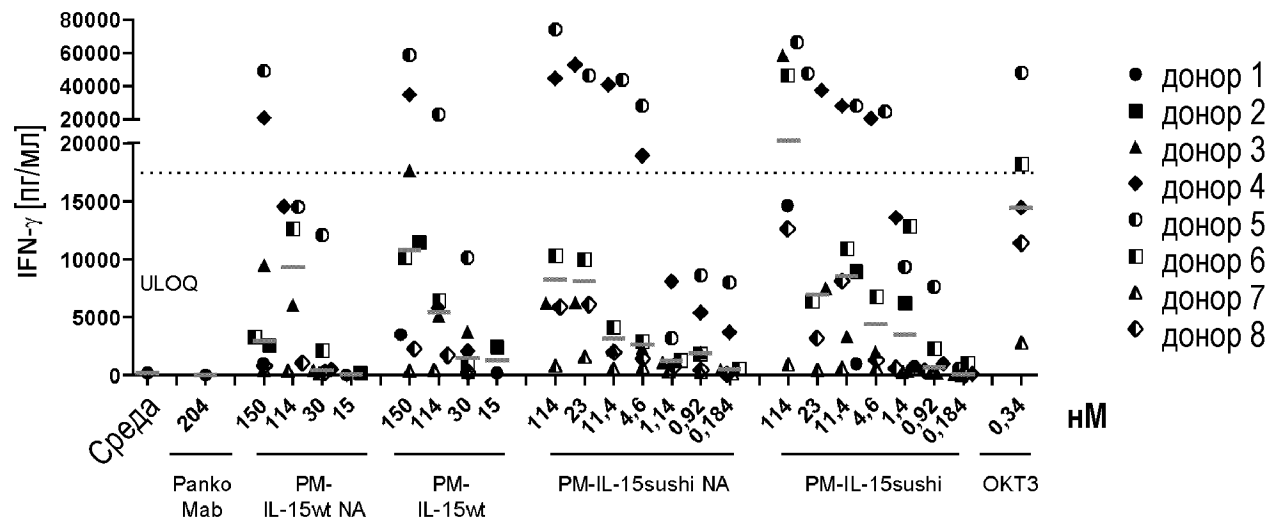


ФИГ.19

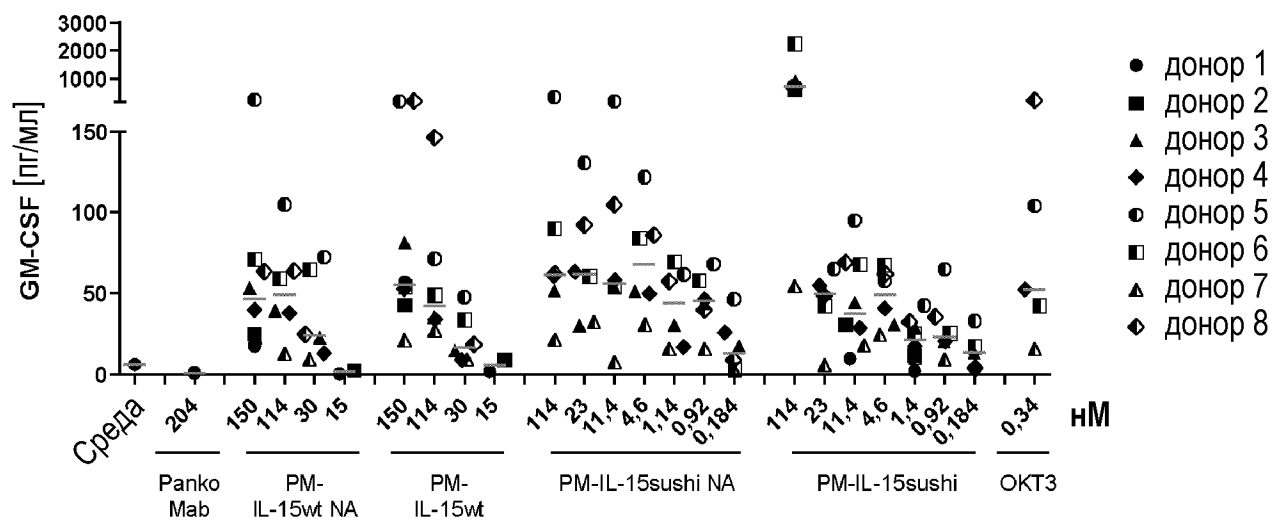


ФИГ.20

A)

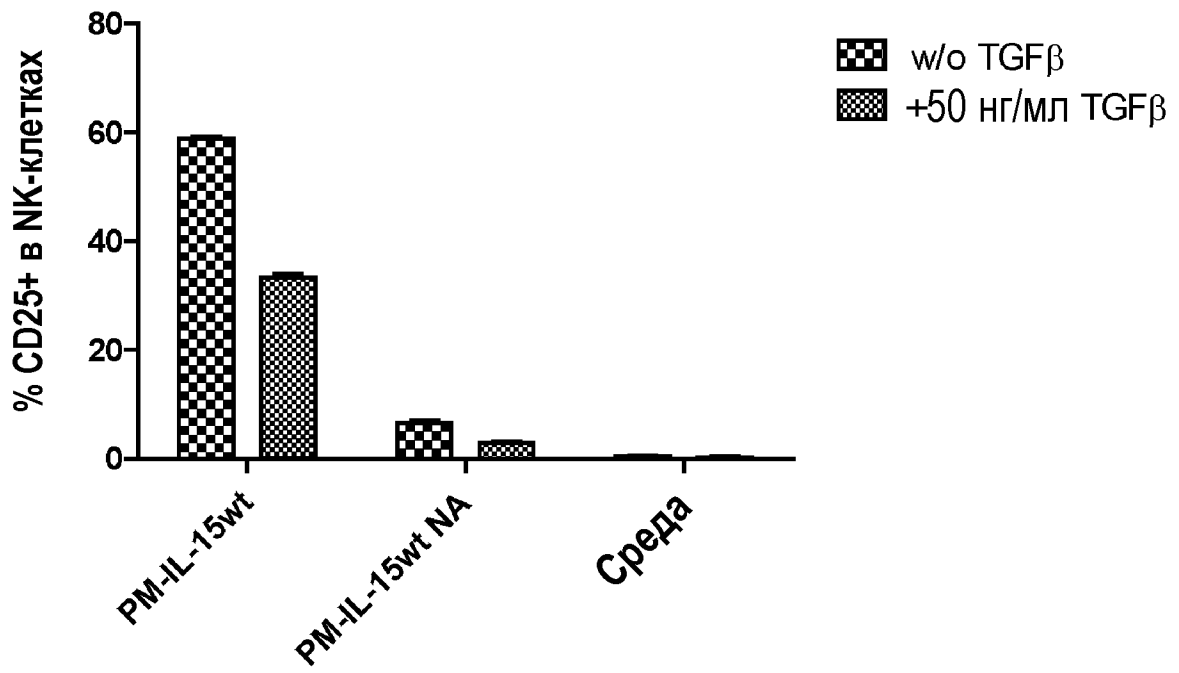


B)

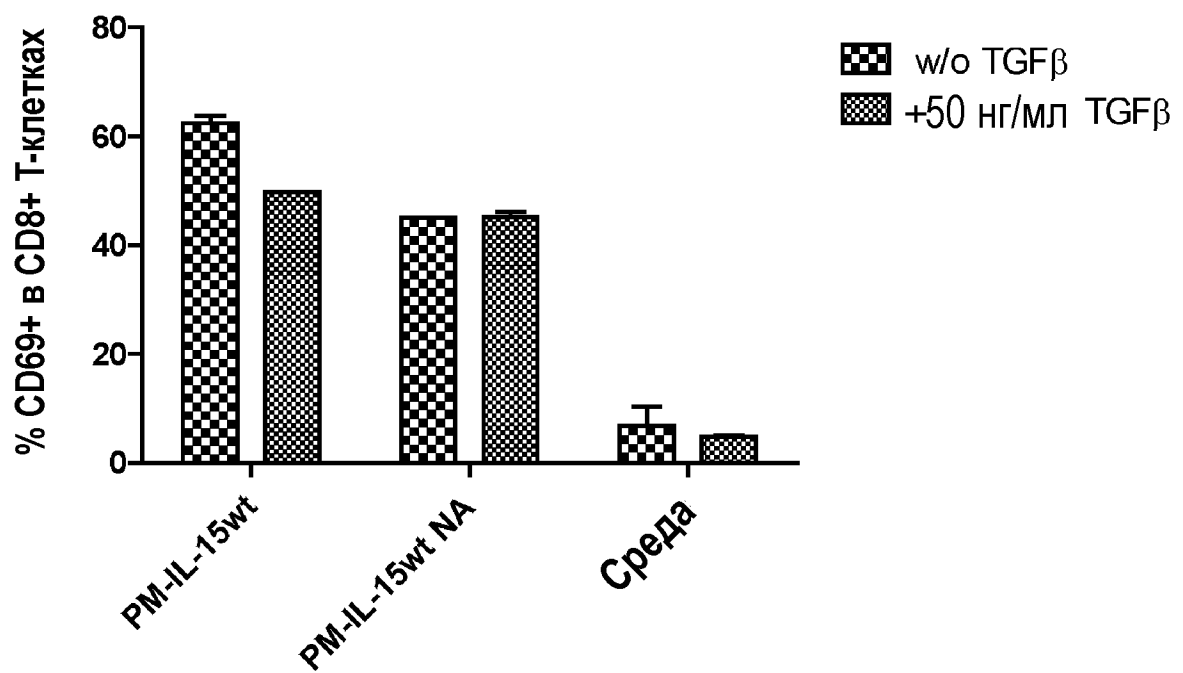


ФИГ.21

А)

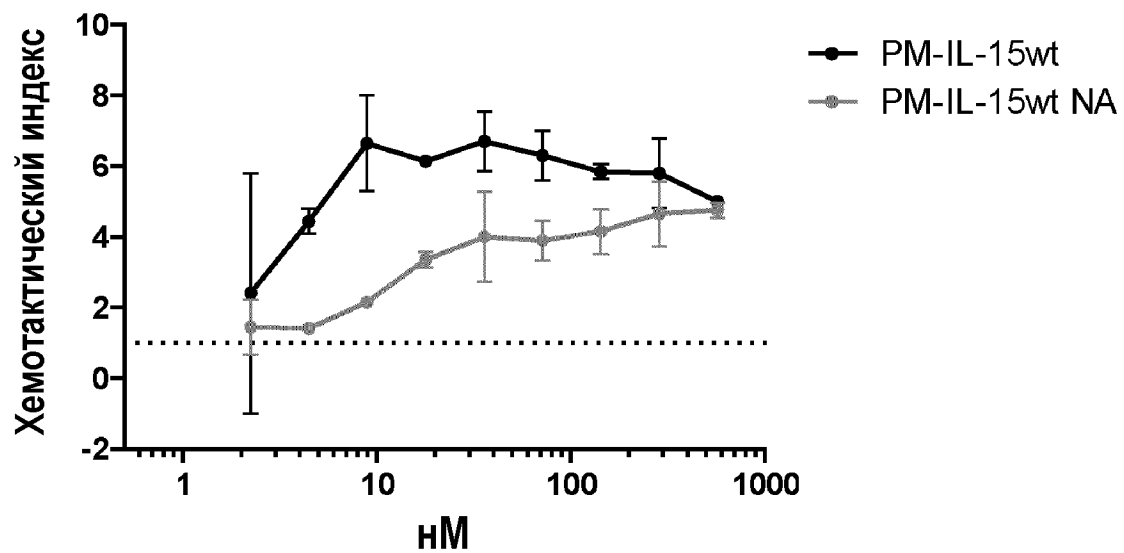


В)

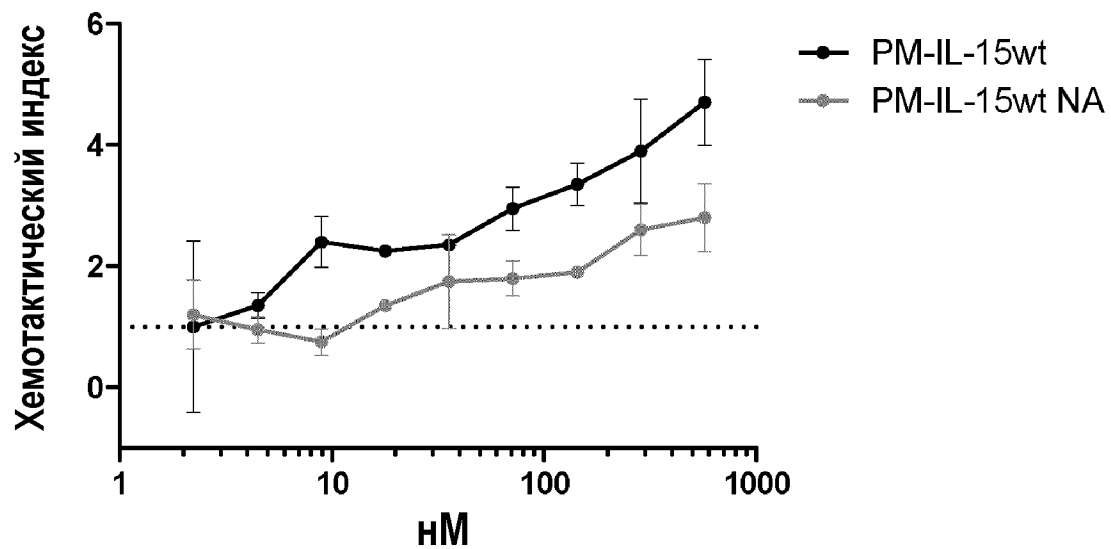


ФИГ.22

A)

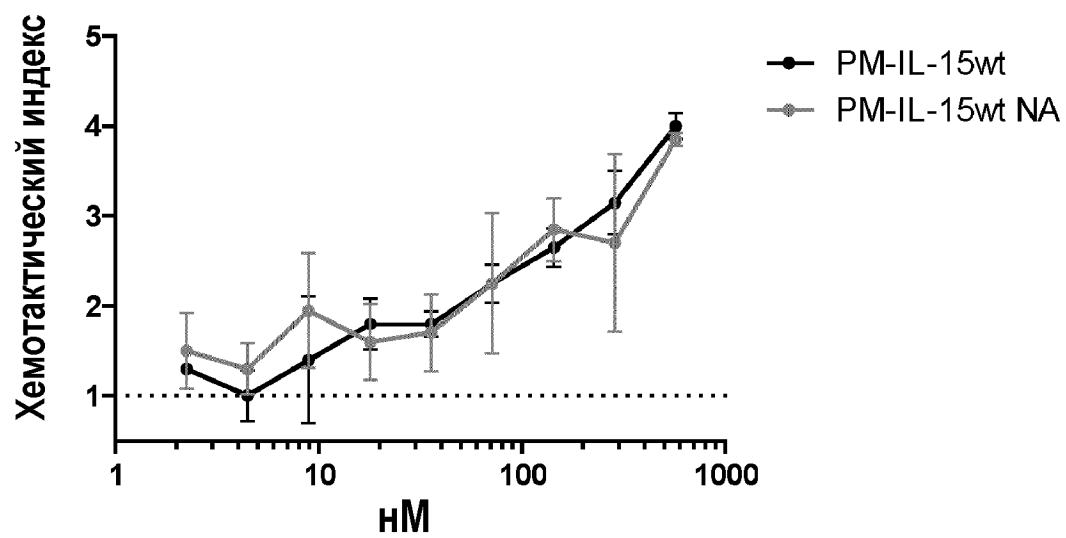


B)

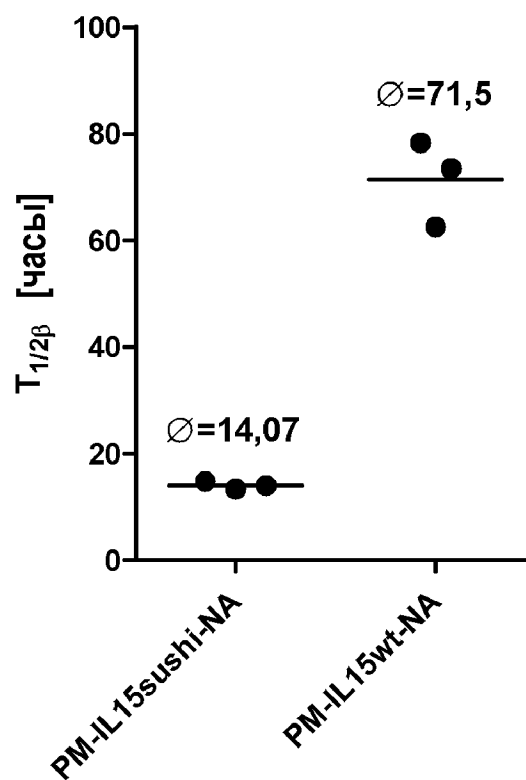


ФИГ.22, продолжение

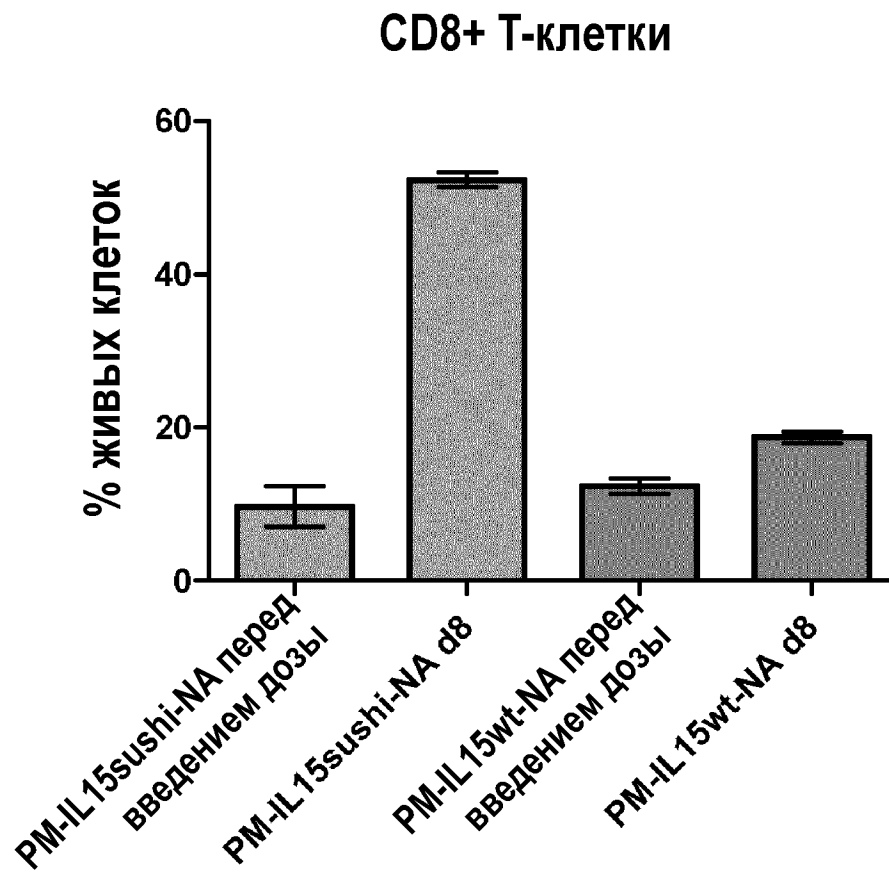
с)



ФИГ.23

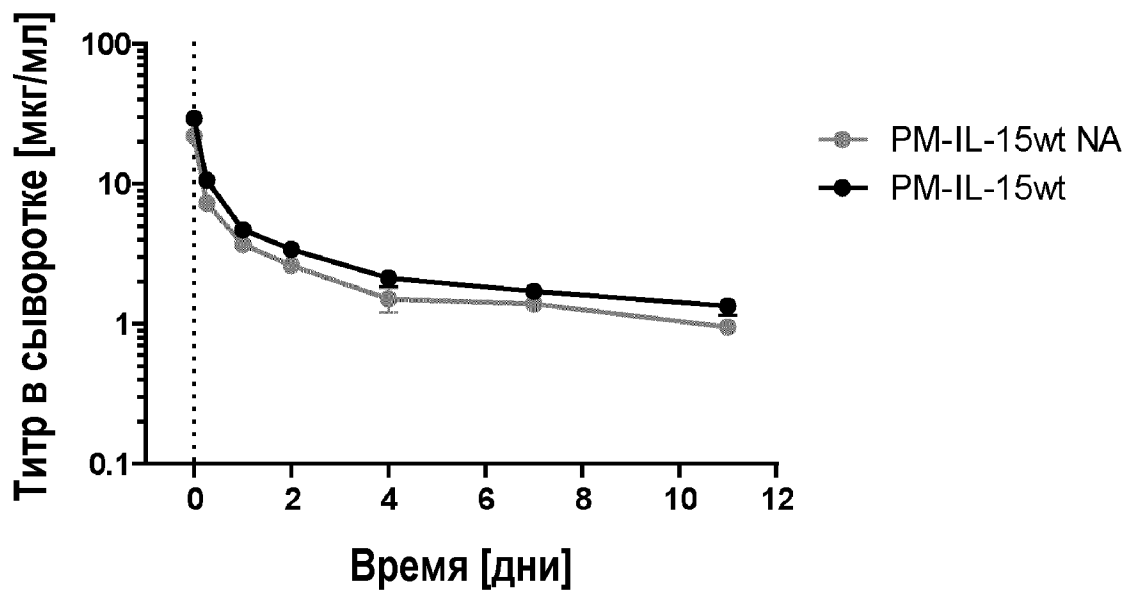


ФИГ.24

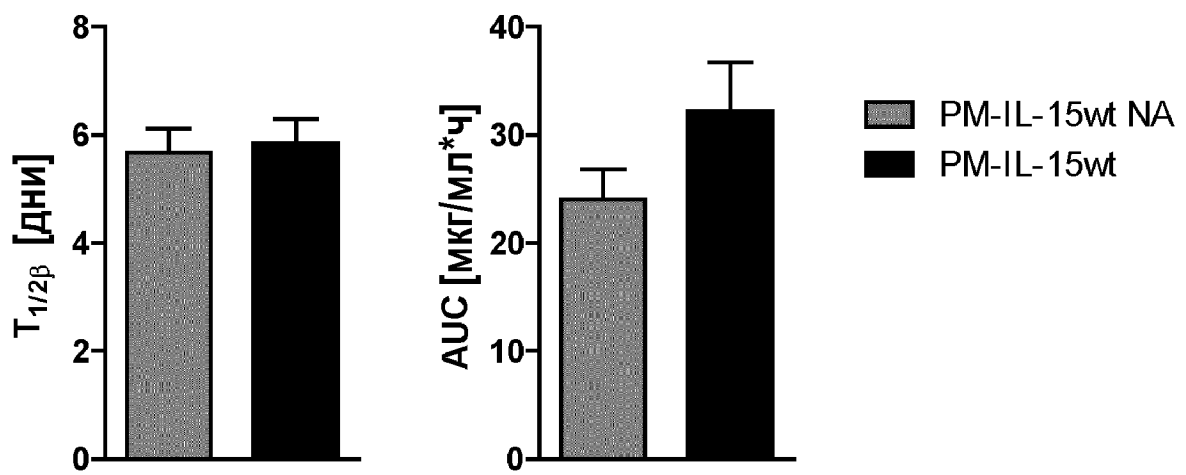


ФИГ.25

А)

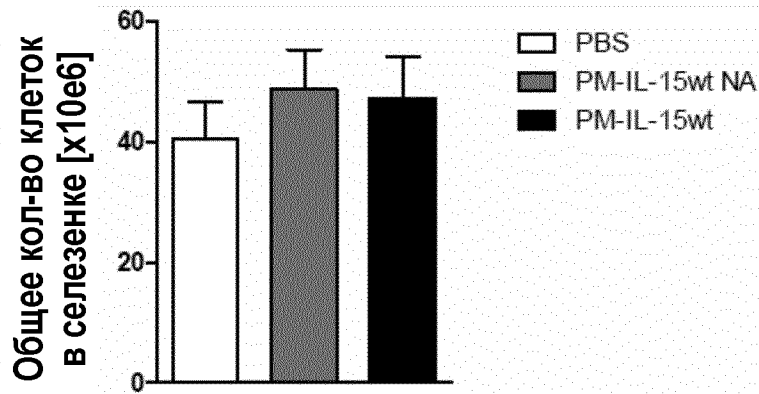


В)

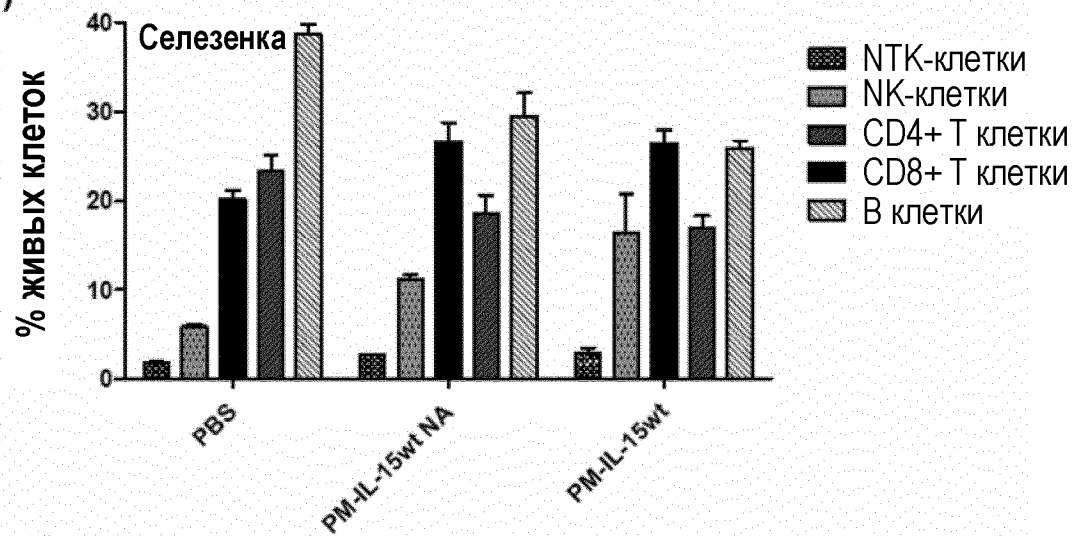


ФИГ.26

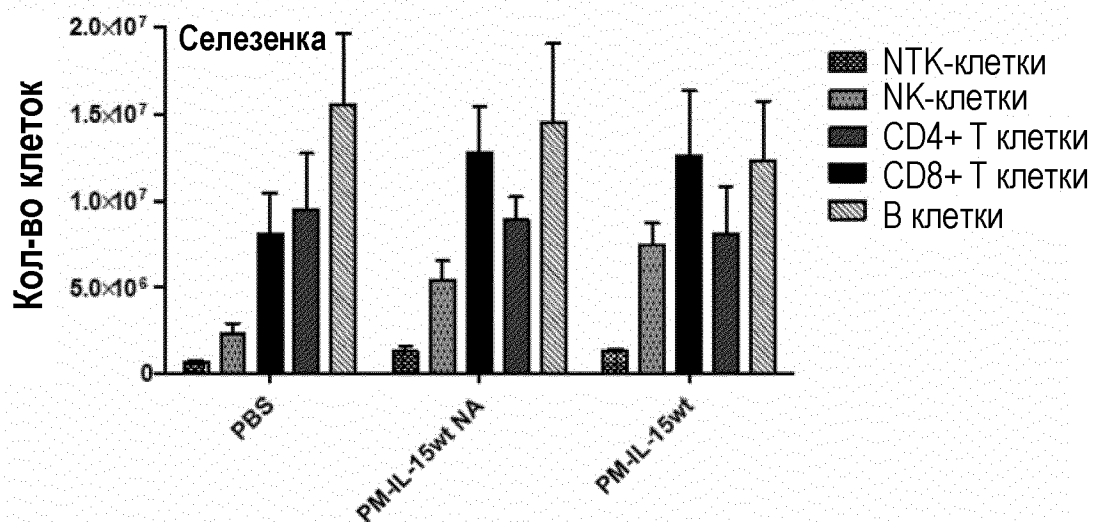
А)



В)

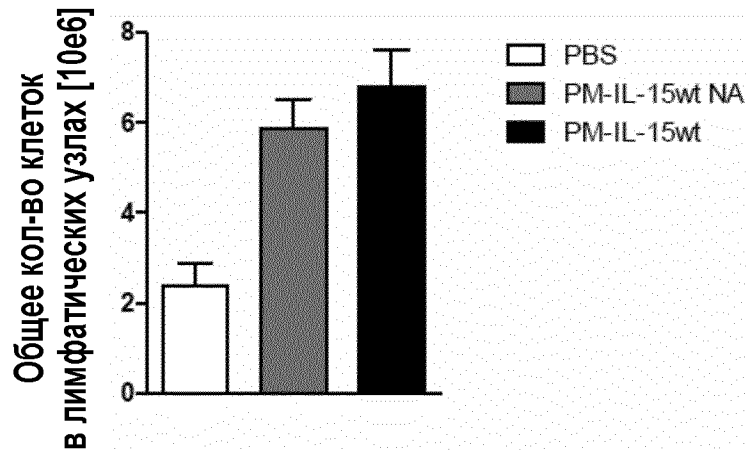


С)

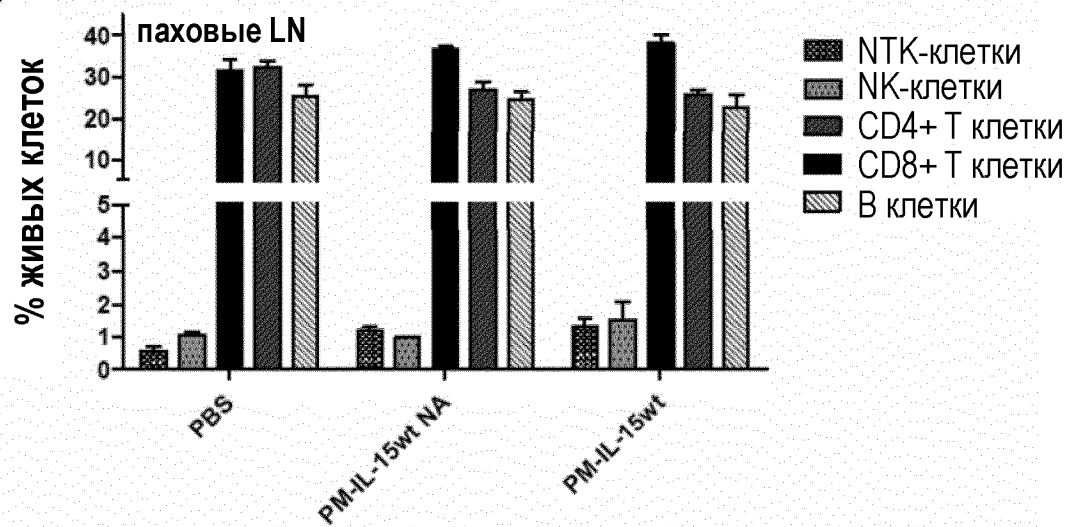


ФИГ.26, продолжение

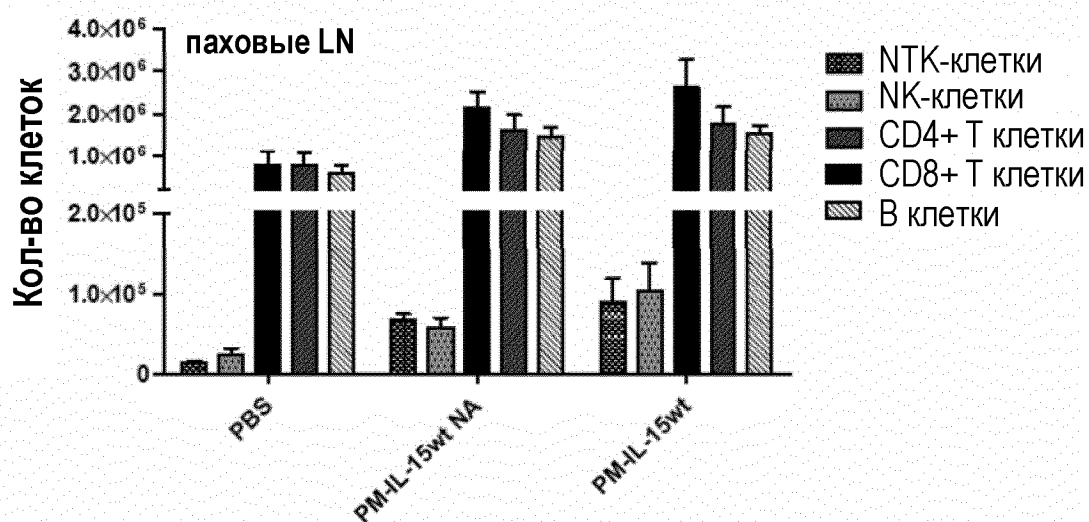
D)



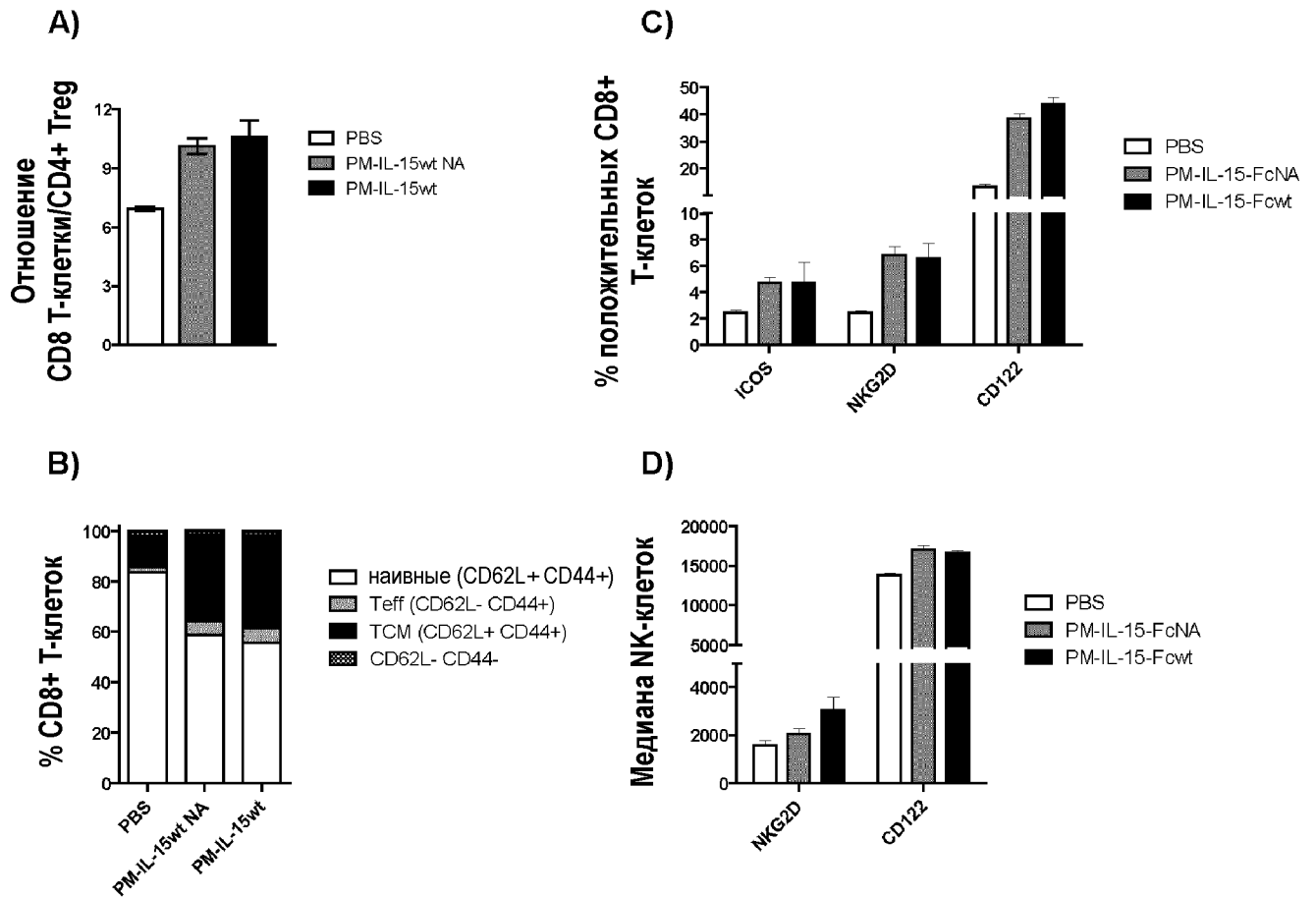
E)



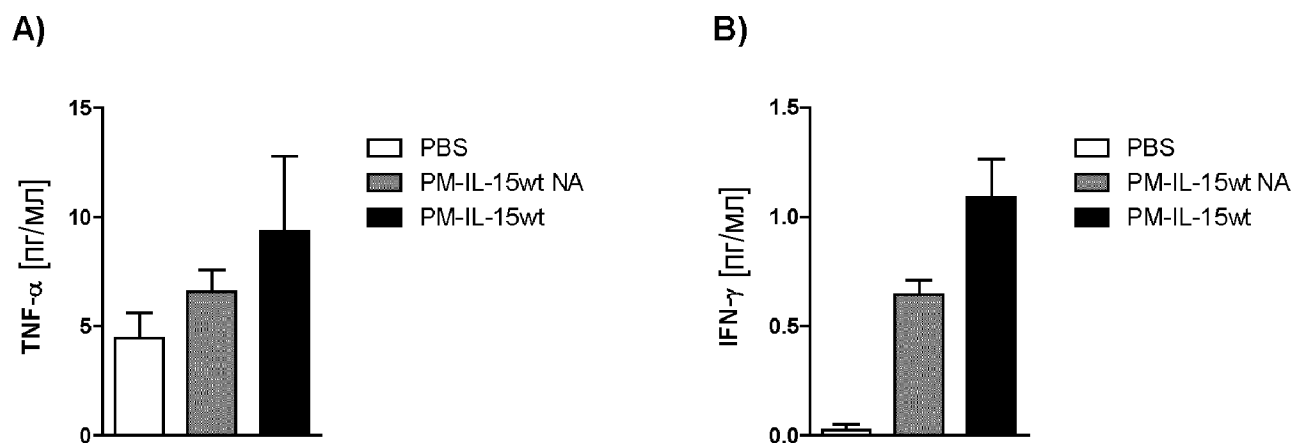
F)



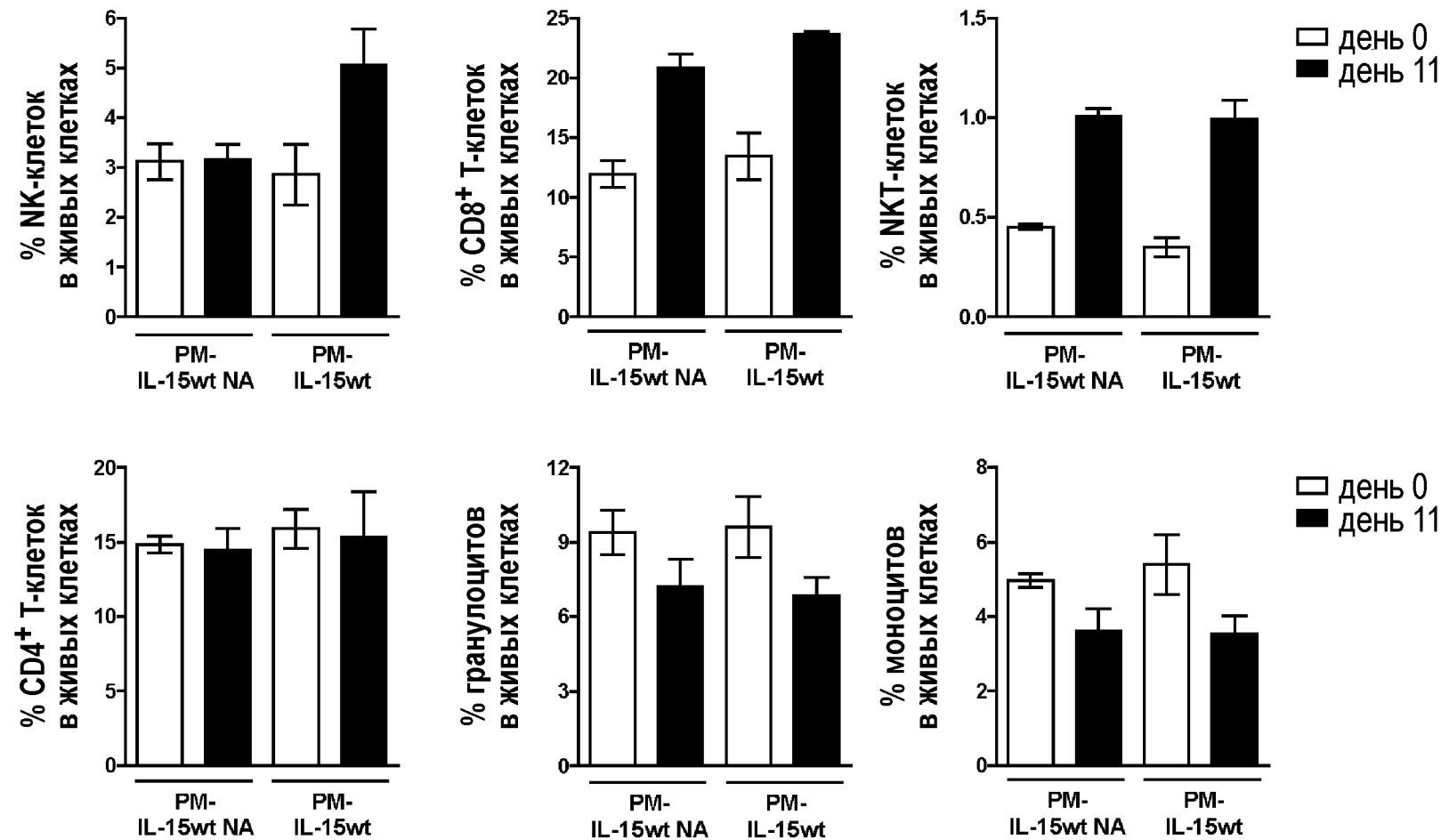
ФИГ.27



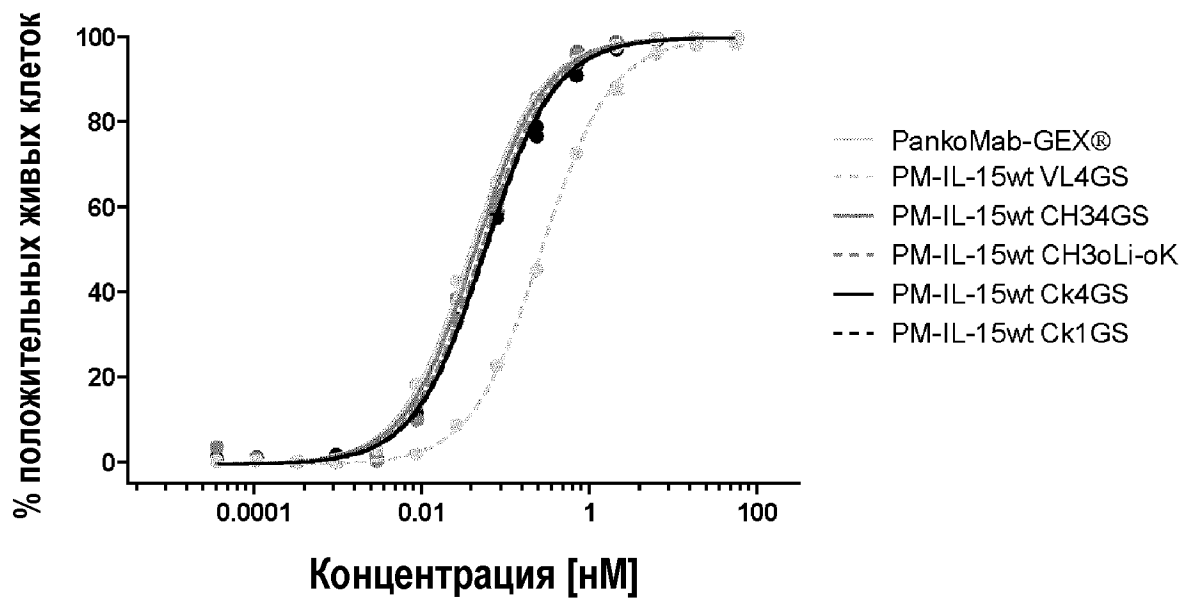
ФИГ.28



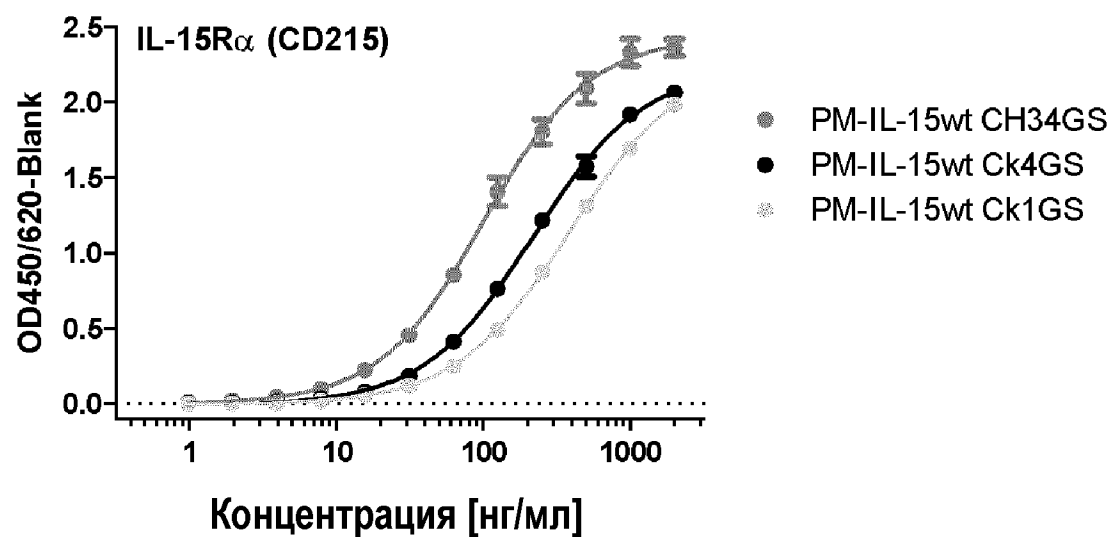
ФИГ.29



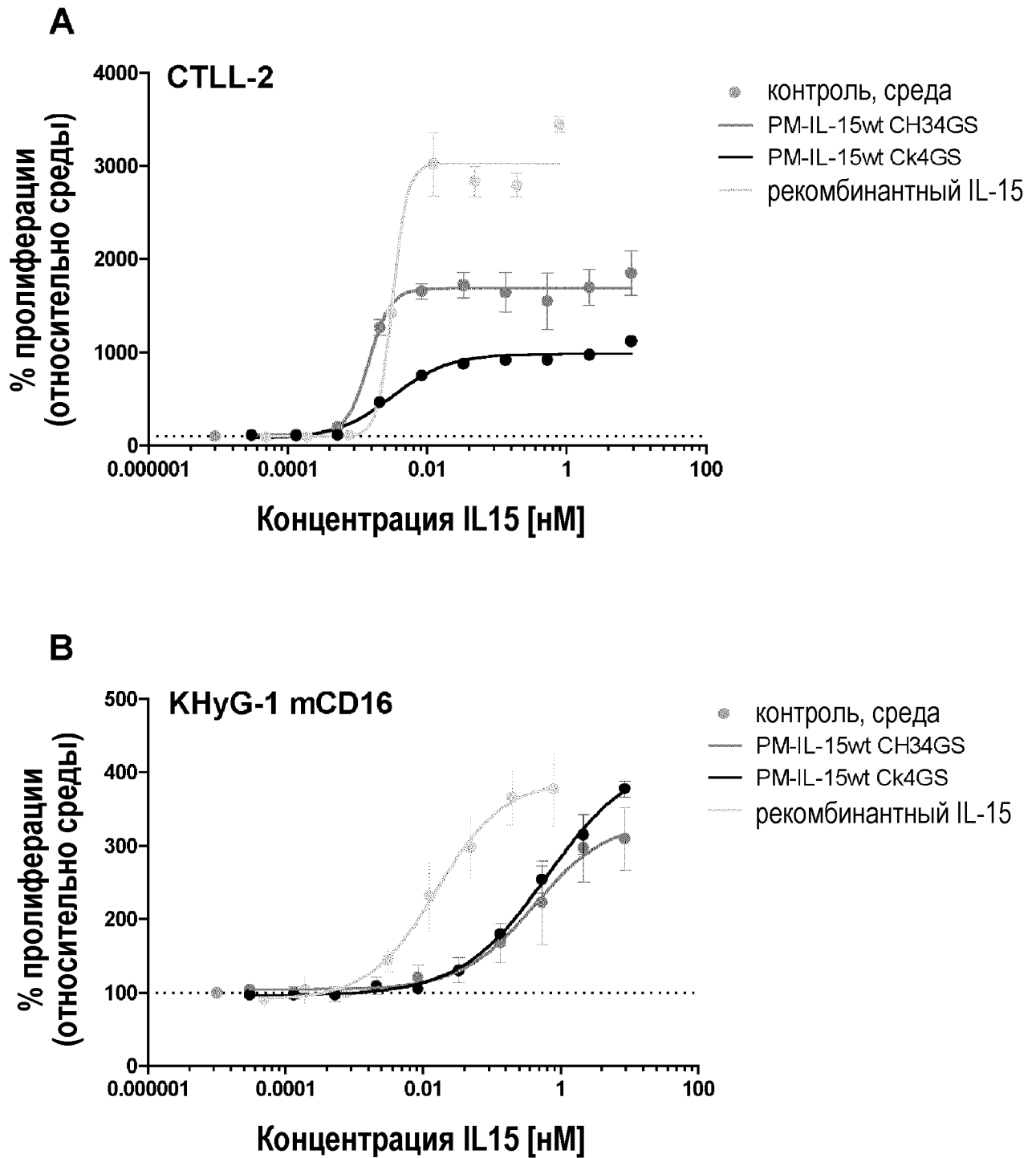
ФИГ.30



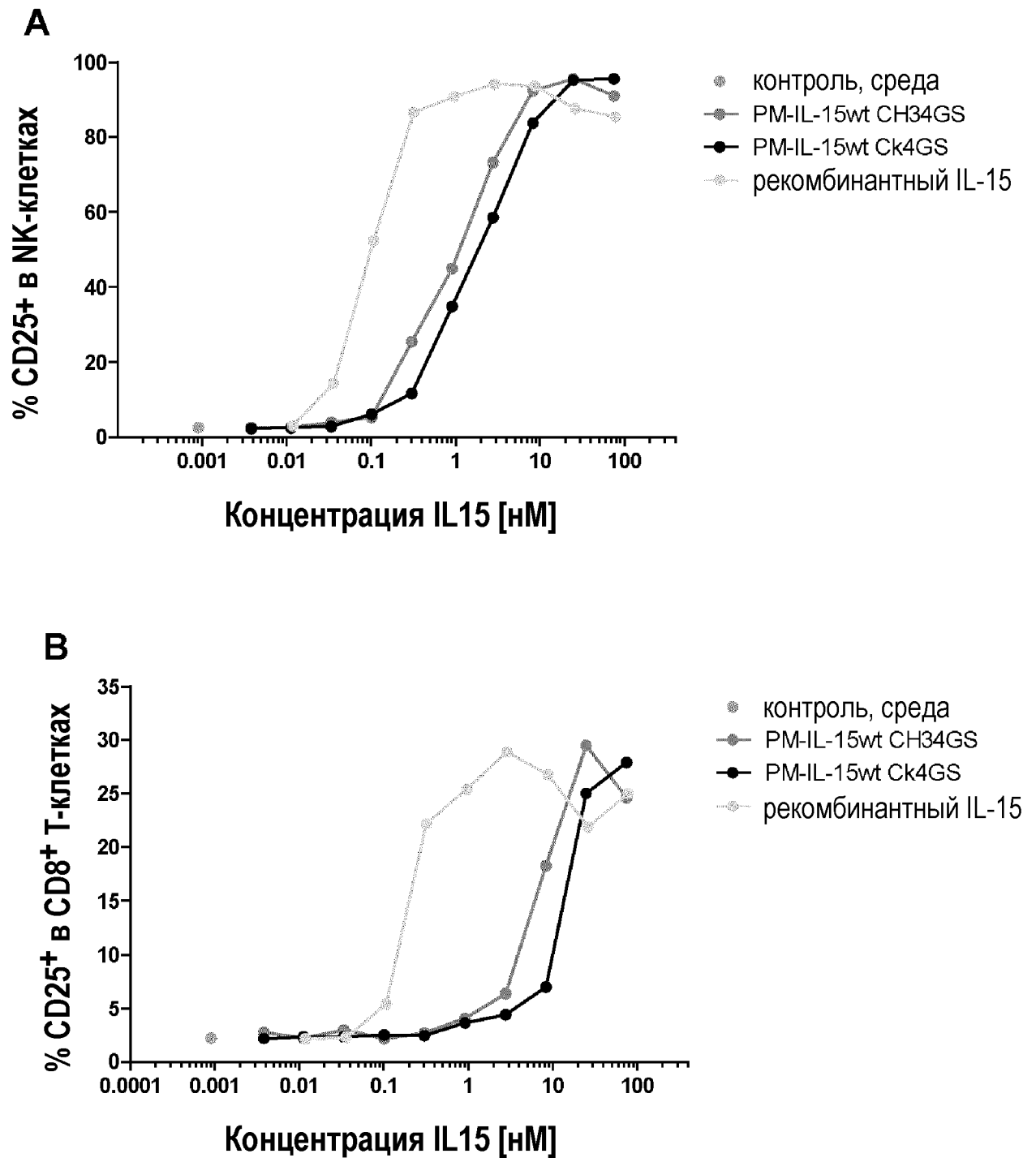
ФИГ.31



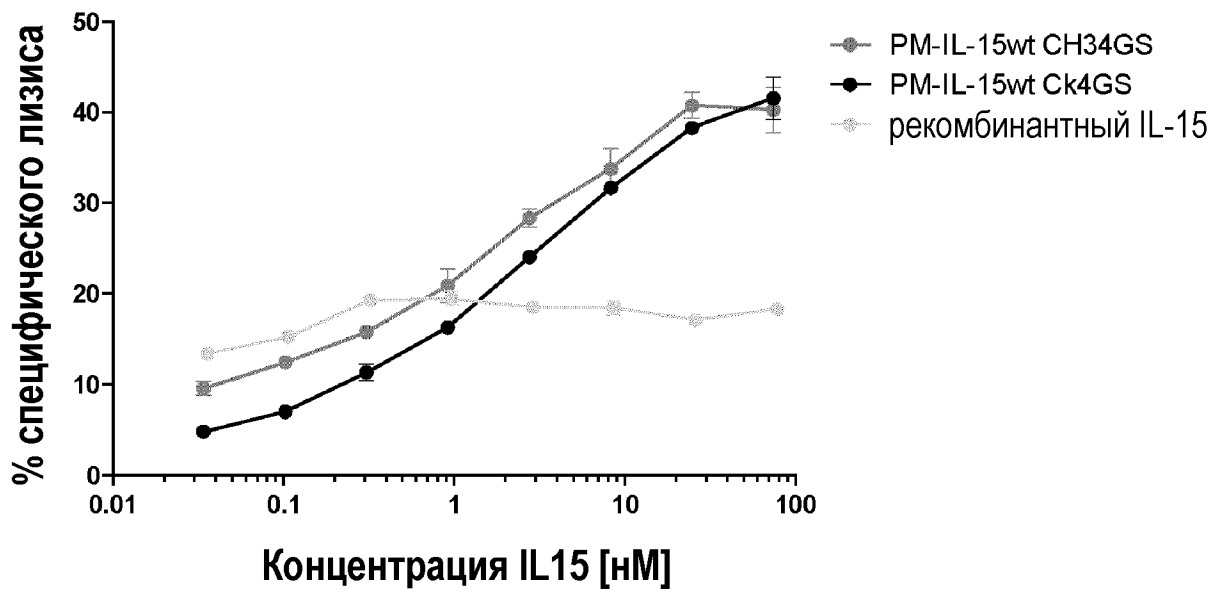
ФИГ.32



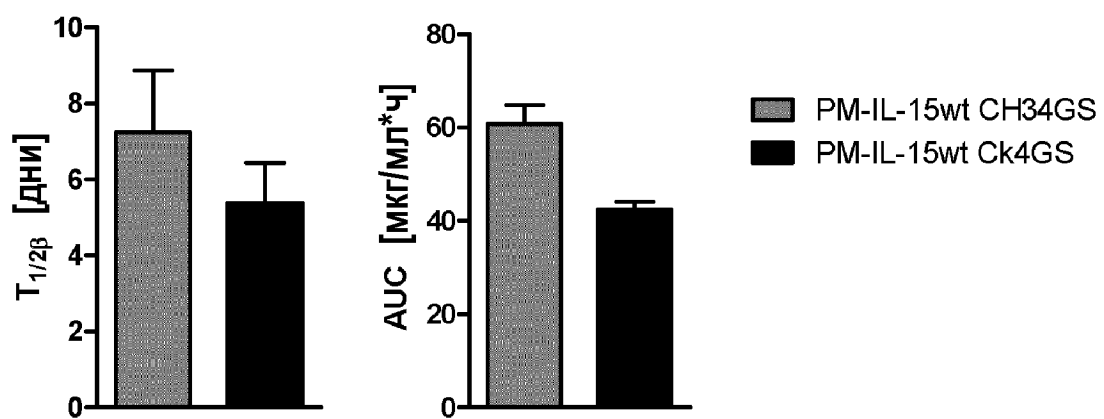
ФИГ.33



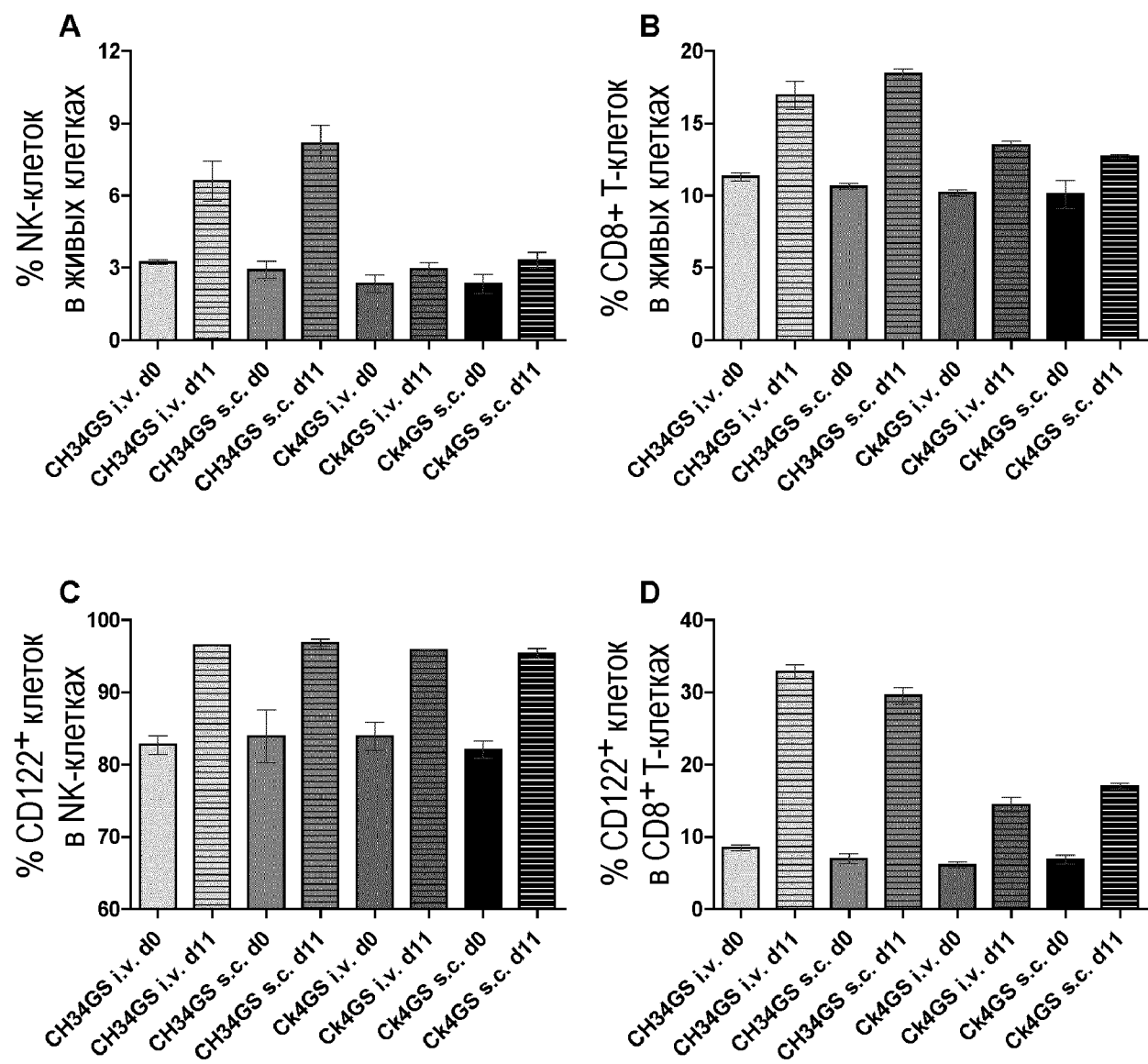
ФИГ.34



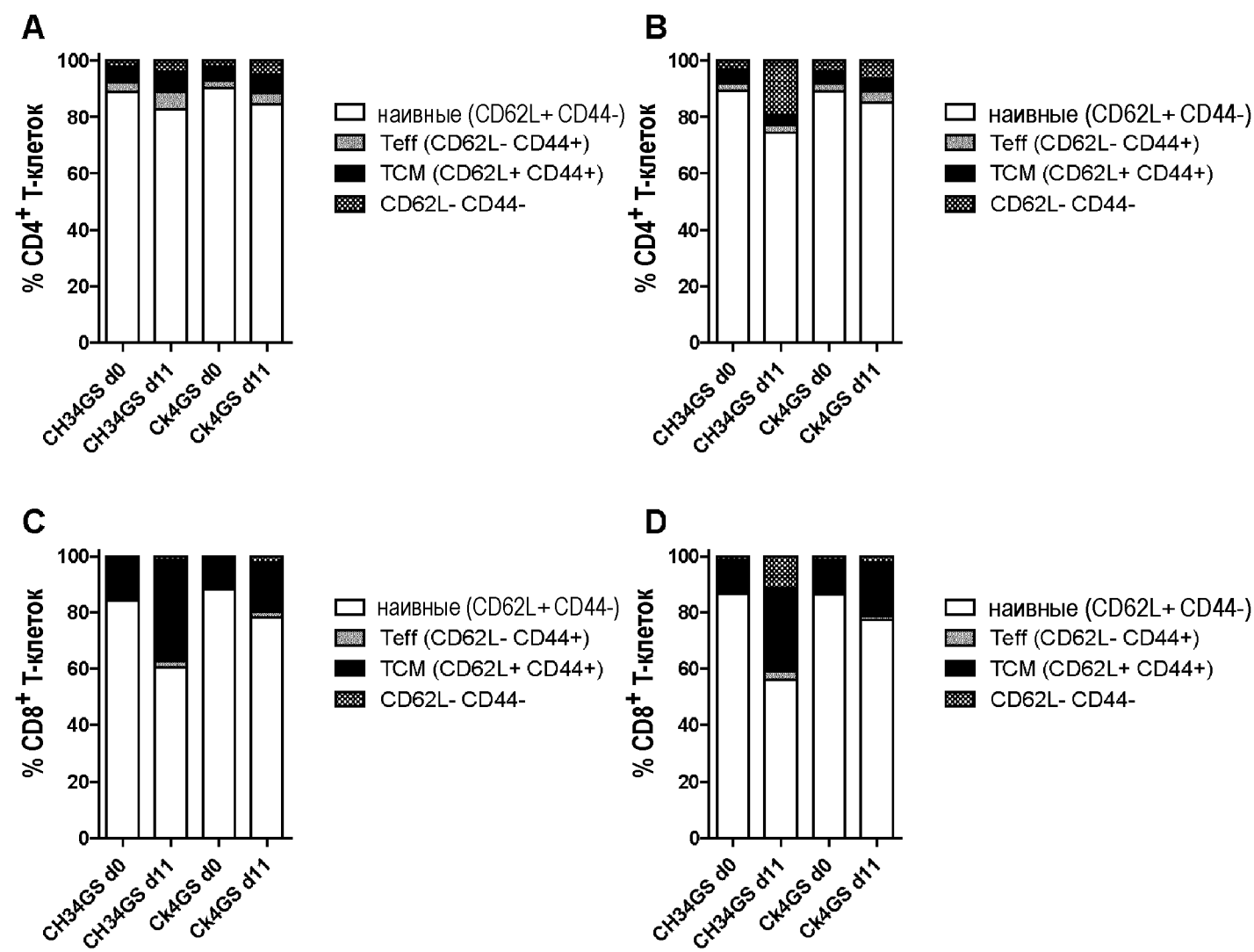
ФИГ.35



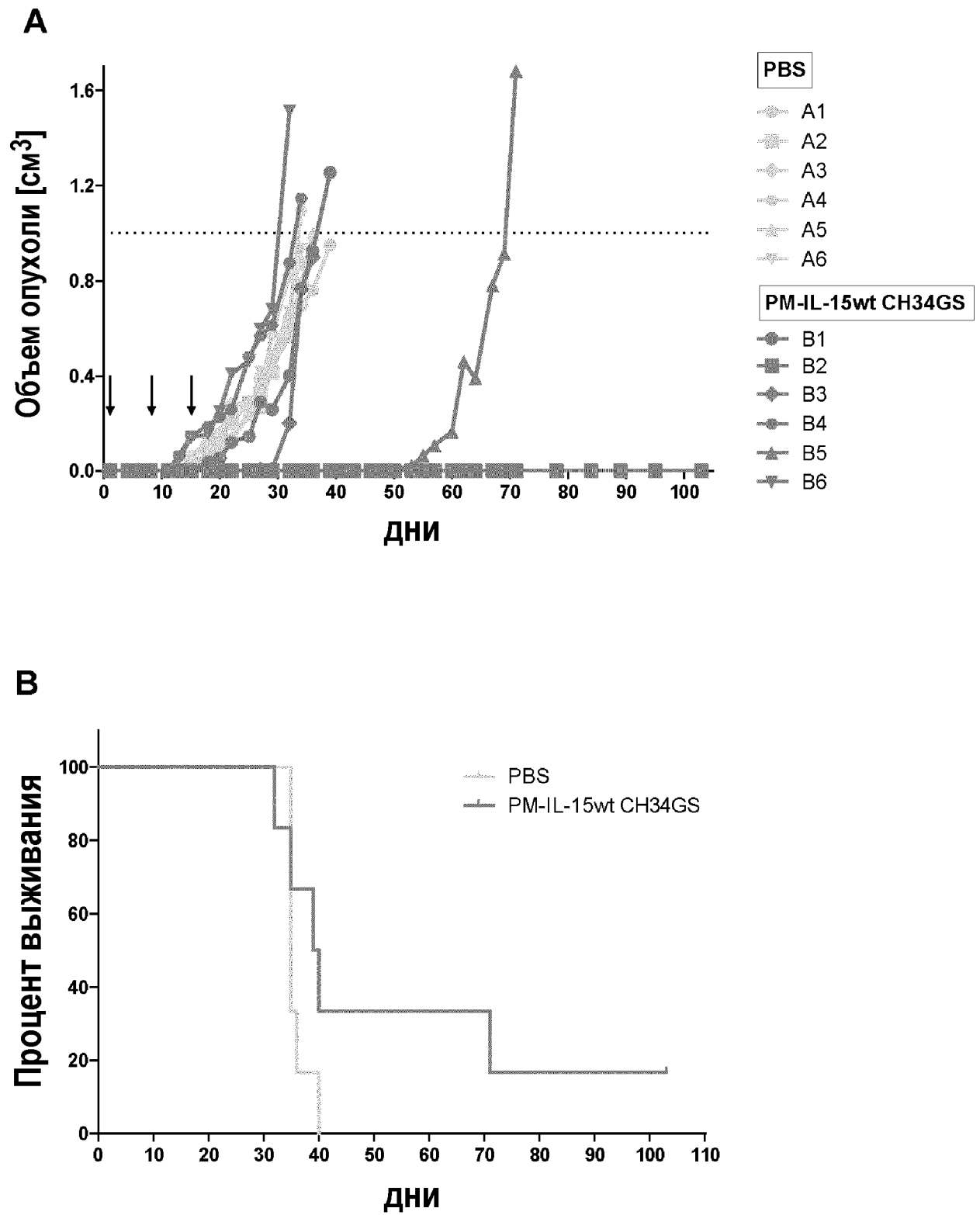
ФИГ.36



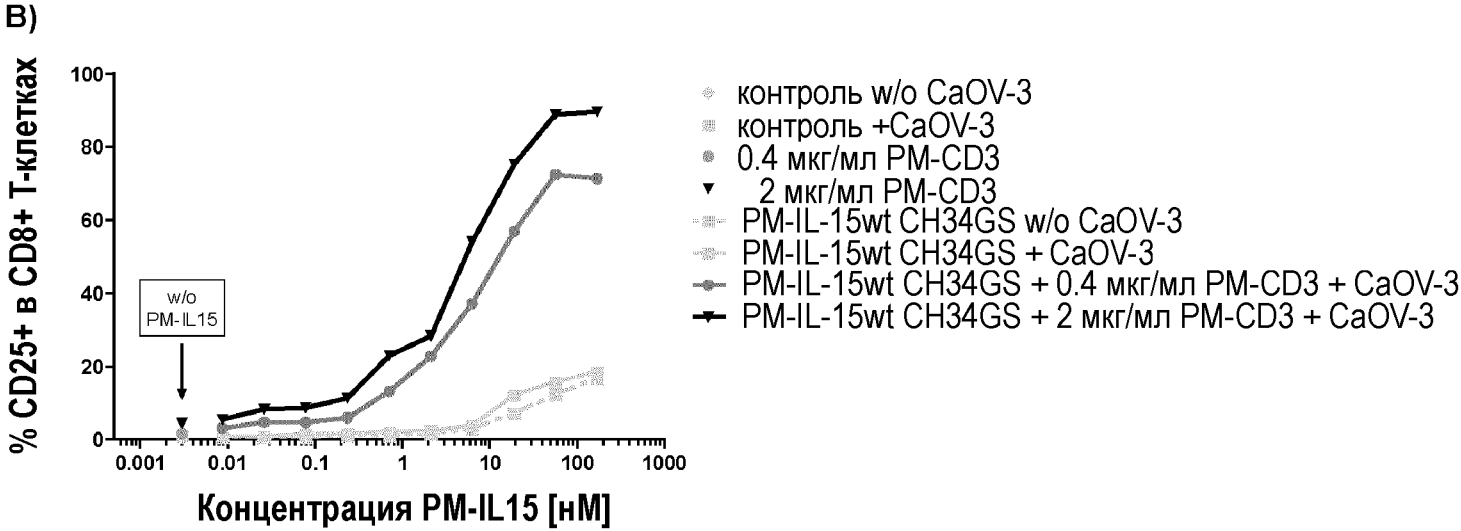
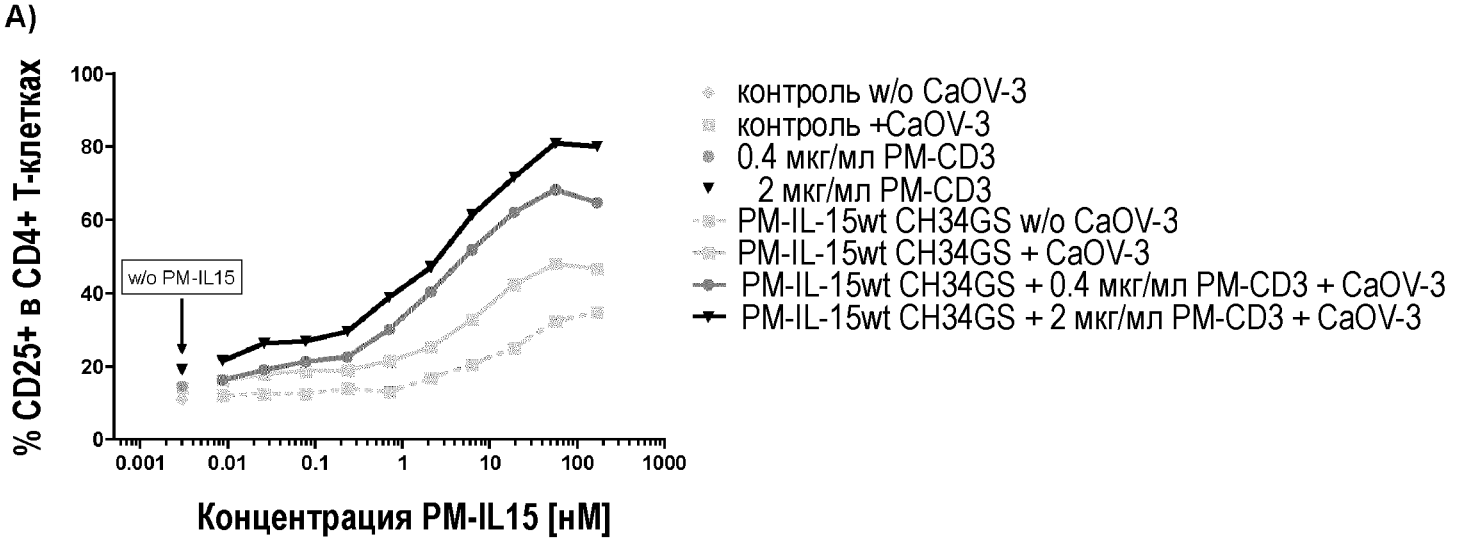
ФИГ.37



ФИГ.38

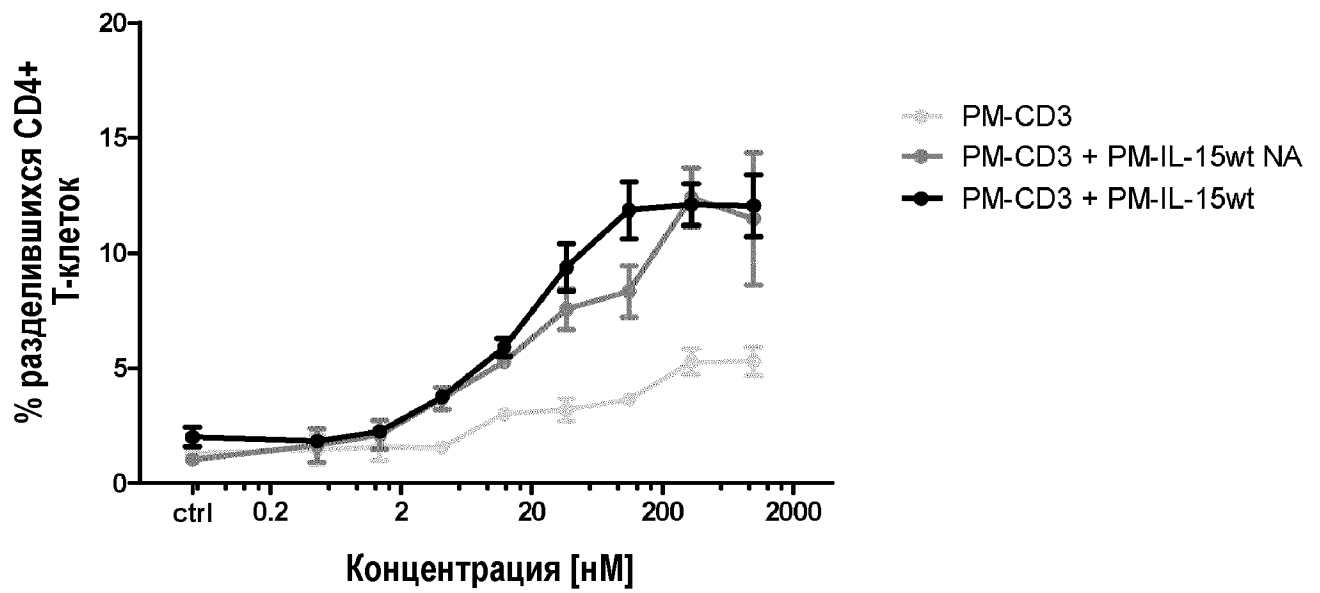


ФИГ.39

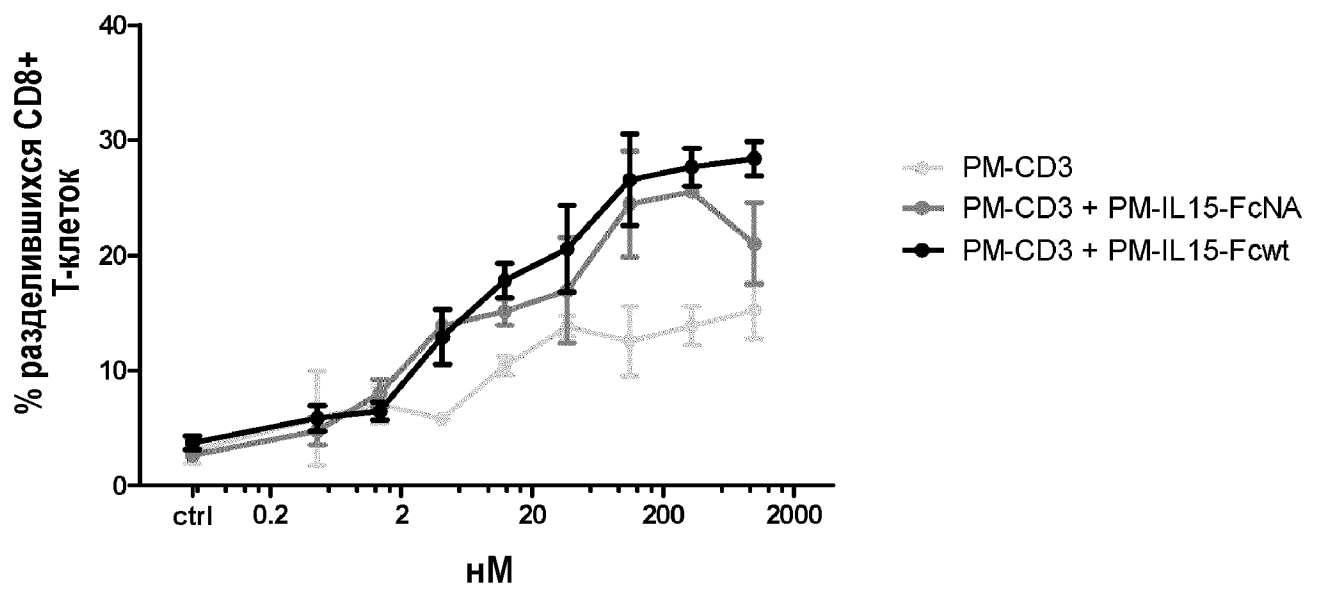


ФИГ.40

А)

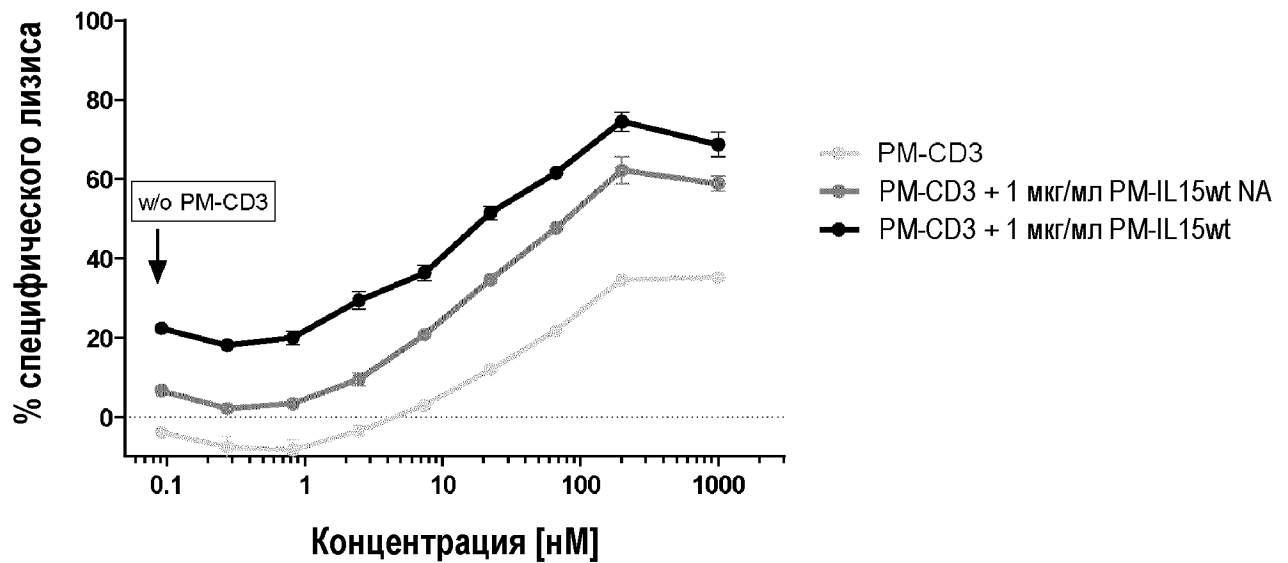


В)

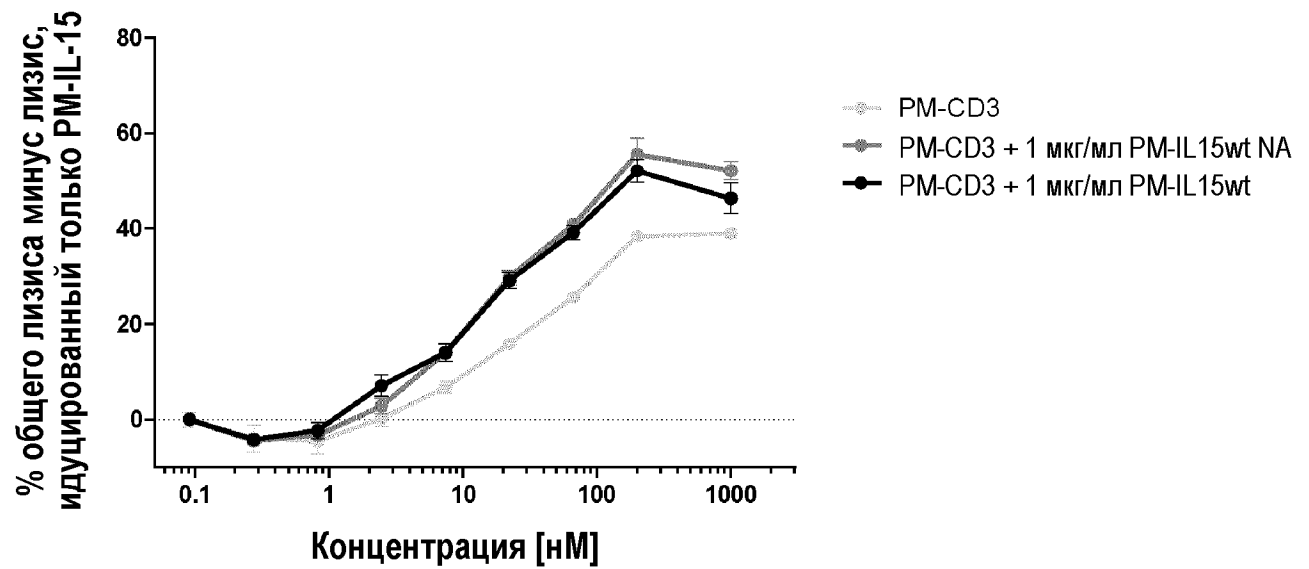


ФИГ.41

А)

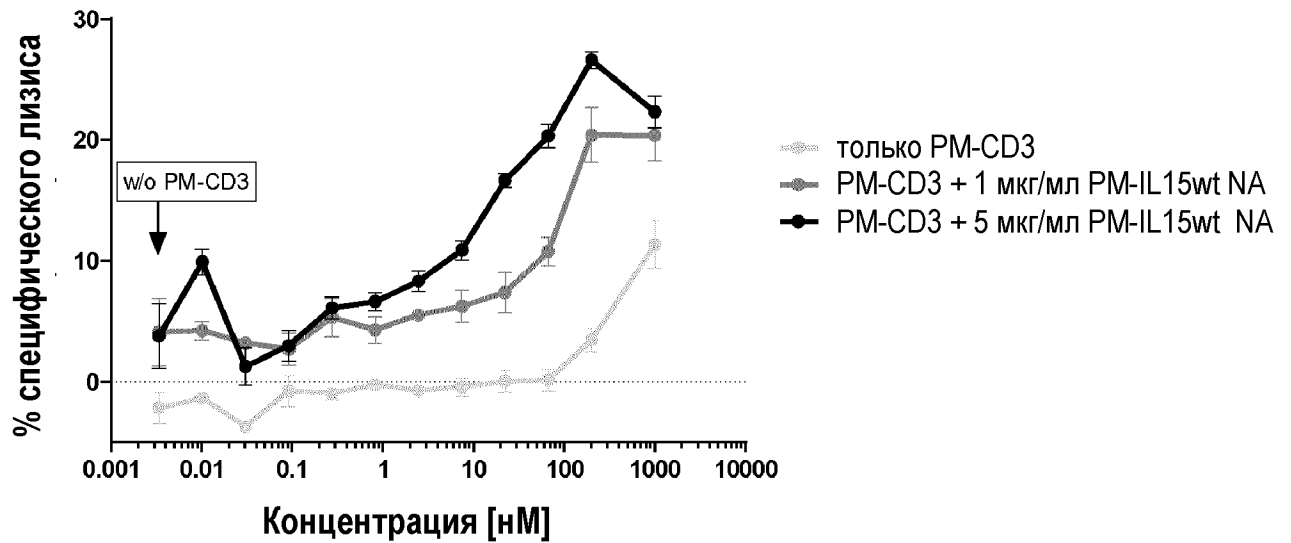


В)

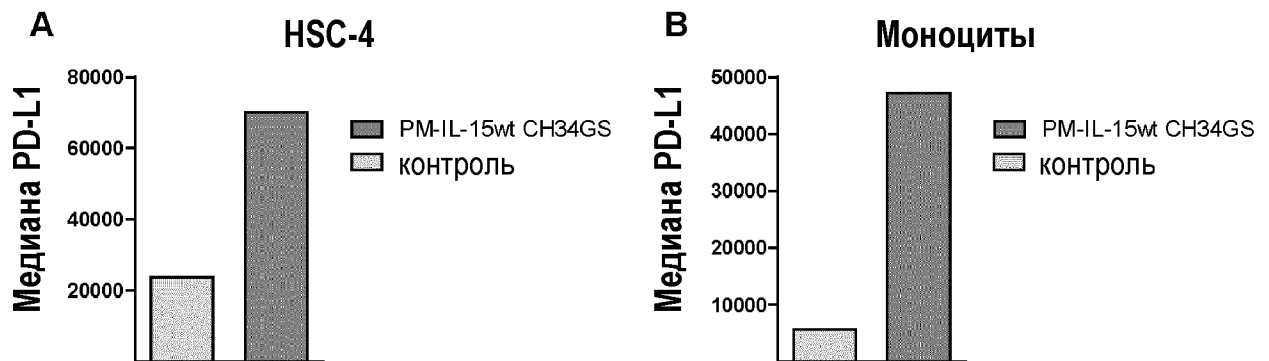


ФИГ.41, продолжение

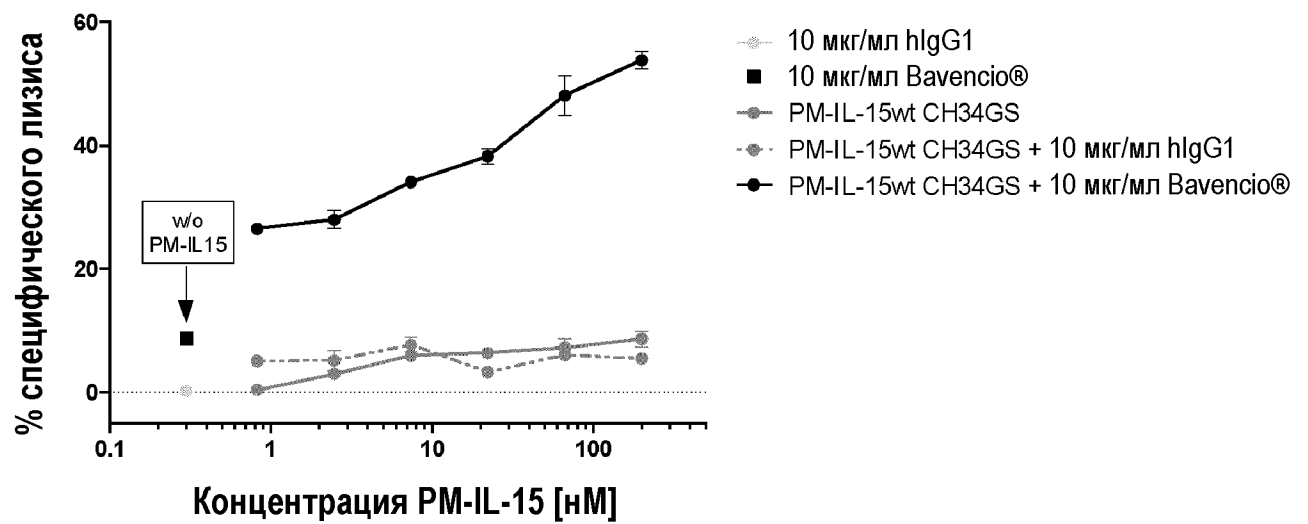
С)



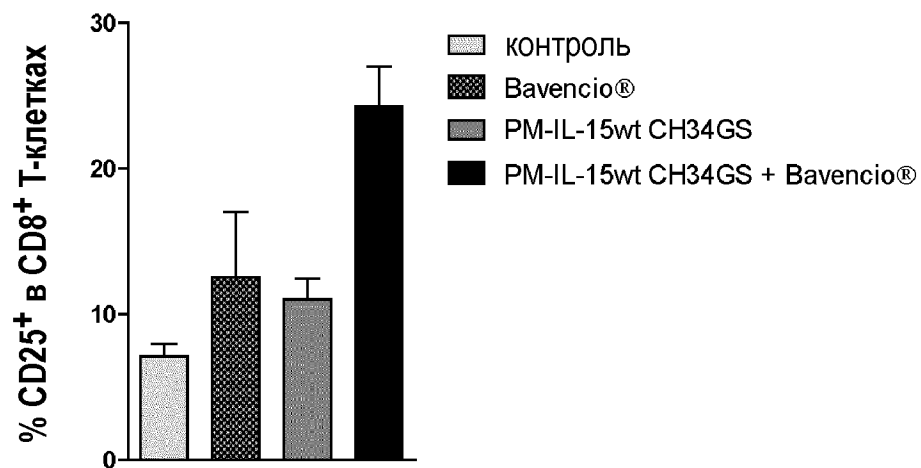
ФИГ.42



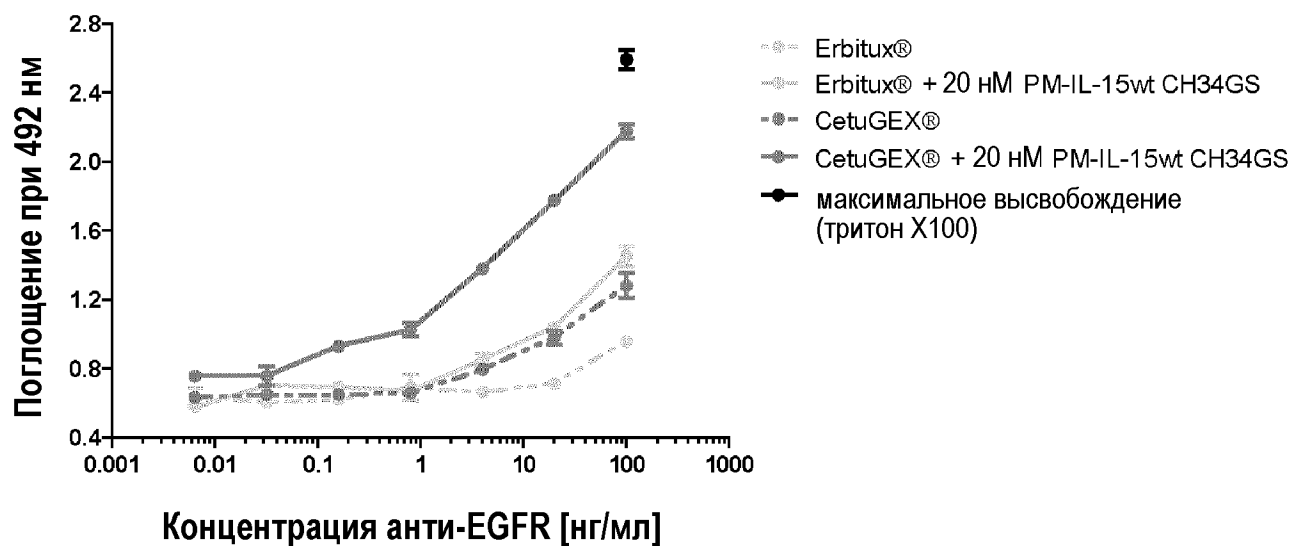
ФИГ.43



ФИГ.44



ФИГ.45



ФИГ.46

