

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040858**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.08.08**

(21) Номер заявки  
**201892619**

(22) Дата подачи заявки  
**2012.02.07**

(51) Int. Cl. **C07K 14/55** (2006.01)  
**C12N 15/26** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)

---

(54) **ИММУНОКОНЬЮГАТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ МУТАНТНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ  
ИНТЕРЛЕЙКИНА-2**

---

(31) **11153964.9; 11164237.7**

(32) **2011.02.10; 2011.04.29**

(33) **EP**

(43) **2019.04.30**

(62) **201300896; 2012.02.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**РОШЕ ГЛИКАРТ АГ (CH)**

(72) Изобретатель:  
**Аст Оливер, Брюнкер Петер,  
Фраймозер-Грундшобер Анне, Хертер  
Зильвия, Хофер Томас У., Хоссе  
Ральф, Клайн Кристиан, Мёсснер  
Эккхард, Николини Валерия Г.,  
Умана Пабло (CH)**

(74) Представитель:  
**Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,  
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов  
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,  
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) **WO-A2-2005086798  
WO-A2-2008003473  
US-A1-2003166163  
SHANAFELT A. B. ET AL.: "A T-cell-  
selective interleukin 2 mutein exhibits potent  
antitumor activity and is well tolerated in  
vivo", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE  
PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol.  
18, no. 11, 1 November 2000 (2000-11-01), pages  
1197-1202, XP002307306, ISSN: 1087-0156, DOI:  
10.1038/81199, page 1198; figure 1  
US-A1-2003124678  
US-A1-2004175357**

(57) В изобретении описан иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид интерлейкина-2 (IL-2) с тремя аминокислотными мутациями, соответствующими аминокислотным заменам F42A, Y45A и L72G в последовательности человеческого IL-2 (SEQ ID NO: 1), где указанные мутации аннулируют или снижают аффинность мутантного полипептида IL-2 к высокоаффинному рецептору IL-2 и сохраняют аффинность мутантного полипептида IL-2 к рецептору IL-2 с промежуточной аффинностью по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. Кроме того, в изобретении описаны выделенный полинуклеотид, кодирующий указанный иммуноконъюгат, экспрессионный вектор и клетки-хозяева, содержащие этот выделенный полинуклеотид. А также раскрыты способ получения иммуноконъюгата, содержащие его фармацевтические композиции, способы лечения рака и стимуляции иммунной системы, в которых применяются эти композиции.

**B1****040858****040858****B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится в целом к мутантным полипептидам интерлейкина-2. Более конкретно изобретение относится к мутантным полипептидам IL-2, которые обладают улучшенными свойствами при применении в качестве иммунотерапевтических агентов. Кроме того, изобретение относится к иммуноконъюгатам, содержащим указанные мутантные полипептиды IL-2, к полинуклеотидным молекулам, кодирующим мутантные полипептиды IL-2 или иммуноконъюгаты, и векторам и клеткам-хозяевам, содержащим указанные полипептидные молекулы. Изобретение относится также к способам получения мутантных полипептидов IL-2 или иммуноконъюгатов, содержащим их фармацевтическим композициям и их применению.

### Предпосылки создания изобретения

Интерлейкин-2 (IL-2), который называют также фактором роста Т-клеток (TCGF), представляет собой глобулярный гликопротеин с молекулярной массой 15,5 кДа, который играет основную роль в образовании, выживании и гомеостазе лимфоцитов. Он включает 133 аминокислоты и состоит из четырех антипараллельных амфипатических  $\alpha$ -спиралей, которые формируют четвертичную структуру, необходимую для его функционирования (Smith, Science 240, 1988, сс. 1169-1176; Bazan, Science 257, 1992, сс. 410-413). Последовательности IL-2 из различных видов находятся в базе данных RefSeq NCBI под №№ NP000577 (человеческая), NP032392 (мышьяная), NP446288 (крысиная) или NP517425 (шимпанзе).

IL-2 осуществляет свое действие посредством связывания с рецепторами IL-2 (IL-2R), которые содержат вплоть до трех индивидуальных субъединиц, различная ассоциация которых может приводить к образованию форм рецепторов, которые отличаются по их аффинности к IL-2. Ассоциация субъединиц  $\alpha$  (CD25),  $\beta$  (CD122) и  $\gamma$  ( $\gamma_c$ , CD132) приводит к образованию тримерного высокоаффинного рецептора для IL-2. Димерный рецептор IL-2, состоящий из субъединиц  $\beta$  и  $\gamma$ , обозначают как IL-2R с промежуточной аффинностью. Субъединица  $\alpha$  образует мономерный низкоаффинный рецептор IL-2. Хотя димерный рецептор IL-2 с промежуточной аффинностью связывается с IL-2 с более низкой примерно в 100 раз аффинностью по сравнению с тримерным высокоаффинным рецептором, как димерные, так и тримерные варианты рецептора IL-2 обладают способностью передавать сигналы после связывания с IL-2 (Minami и др., Annu Rev Immunol 11, 1993, сс. 245-268). Поэтому  $\alpha$ -субъединица, т.е. CD25, не имеет решающего значения для передачи сигналов IL-2. Она обеспечивает высокую аффинность связывания со своим рецептором, в то время как  $\beta$ -субъединица, т.е. CD122, и  $\gamma$ -субъединица имеют решающее значение для трансдукции сигналов (Krieg и др., Proc Natl Acad Sci 107, 2010, сс. 11906-11911). Тримерные рецепторы IL-2, включающие CD25, экспрессируются (покоящимися) регуляторными CD4<sup>+</sup>, forkhead box P3 ((FoxP3)<sup>+</sup>-Т-клетками (T<sub>reg</sub>). Они кратковременно индуцируются также на обычных активированных Т-клетках, в то время как в покоящемся состоянии эти клетки экспрессируют только димерные рецепторы IL-2. T<sub>reg</sub>-клетки постоянно экспрессируют наиболее высокий уровень CD25 in vivo (Fontenot и др., Nature Immunol 6, 2005, сс. 142-151).

IL-2 синтезируется главным образом активированными Т-клетками, в частности CD4-Т-клетками-хелперами. Он стимулирует пролиферацию и дифференцировку Т-клеток, индуцирует образование цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) и дифференцировку лимфоцитов периферической крови в цитотоксические клетки и лимфокин-активированные клетки-киллеры (LAK), усиливает экспрессию цитокинов и цитолитических молекул Т-клетками, способствует пролиферации и дифференцировке В-клеток и синтезу иммуноглобулинов В-клетками и стимулирует образование, пролиферацию и активацию естественных клеток-киллеров (NK) (см., например, обзор у Waldmann, Nat Rev Immunol 6, 2009, сс. 595-601; Olejniczak и Kasprzak, Med Sci Monit 14, 2008, RA179-89; Malek, Annu Rev Immunol 26, 2008, сс. 453-479).

Способность IL-2 увеличивать популяции лимфоцитов in vivo и усиливать эффекторные функции этих клеток определяет противоопухолевые действия IL-2, что делает иммунотерапию на основе IL-2 привлекательным средством лечения определенных метастатических видов рака. По этой причине для пациентов с метастатической почечно-клеточной карциномой и злокачественной меланомой разрешено лечение высокими дозами IL-2.

Однако IL-2 обладает двойной функцией с позиций иммунного ответа, поскольку он не только опосредует размножение и активность эффекторных клеток, но также играет решающую роль в поддержании периферической иммунной толерантности.

Основным механизмом, лежащим в основе периферической самотолерантности, является индуцируемая IL-2 индуцированная активацией клеточная гибель (AICD) Т-клеток. AICD представляет собой процесс, при котором полностью активированные Т-клетки подвергаются запрограммированной клеточной гибели в результате взаимодействия с экспрессируемыми на клеточной поверхности рецепторами смерти, такими как CD95 (известный также как Fas) или TNF-рецептор. Когда активированные антигеном Т-клетки, которые экспрессируют высокоаффинный IL-2-рецептор (после предварительного воздействия IL-2) в процессе пролиферации, повторно стимулируются антигеном с помощью комплекса Т-клеточный рецептор (TCR)/CD3, то индуцируется экспрессия лиганда Fas (FasL) и/или фактора некроза опухолей (TNF), что делает клетки чувствительными к опосредуемому Fas апоптозу. Это процесс зависит от IL-2 (Lenardo, Nature 353, 1991, сс. 858-861) и опосредуется STAT5. С помощью процесса AICD у

T-лимфоцитов может создаваться толерантность не только к аутоантигенам, но также и к персистентным антигенам, таким как опухолевые антигены, которые, как очевидно, не являются созданным хозяином компонентом.

Кроме того, IL-2 участвует также в поддержании периферических регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-клеток (T<sub>reg</sub>) (Fontenot и др., *Nature Immunol* 6, 2005, сс. 1142-1145; D'Cruz и Klein, *Nature Immunol* 6, 2005, сс. 1152-1159; Malou и Powrie, *Nature Immunol* 6, 2005, сс. 1171-1172), которые известны также как супрессорные T-клетки. Они подавляют разрушение эффекторными T-клетками их (собственной) мишени либо путем контакта типа клетка-клетка посредством ингибирования хелперной функции и активации T-клеток, либо посредством высвобождения иммуносупрессорных цитокинов, таких как IL-10 или TGF- $\beta$ . Установлено, что истощение T<sub>reg</sub>-клеток повышает индуцируемый IL-2 противоопухолевый иммунитет (Imai и др., *Cancer Sci* 98, 2007, сс. 416-423).

Таким образом, IL-2 не является оптимальным агентом для ингибирования роста опухолей, поскольку в присутствии IL-2 либо образовавшиеся CTL могут распознавать опухоль как "свою" и подвергаться AICD, либо иммунный ответ может ингибироваться зависимыми от IL-2 T<sub>reg</sub>-клетками.

Другой проблемой, связанной с иммунотерапией на основе IL-2, являются побочные действия лечения рекомбинантным человеческим IL-2. У пациентов, получающих высокие дозы IL-2, часто обнаружены серьезные сердечно-сосудистые, легочные, почечные, печеночные, желудочно-кишечные, неврологические, кожные, гематологические и системные нежелательные явления, которые требуют интенсивного мониторинга и устранения в организме пациента. Большинство этих побочных действий можно объяснить развитием, так называемого синдрома васкулярного (или капиллярного) просачивания (VLS), т.е. патологического повышения сосудистой проницаемости, приводящей к трансудации жидкости во многих органах (что вызывает, например, отек легких или кожи и поражение клеток печени) и внутрисосудистому истощению жидкости (что вызывает падение кровяного давления и компенсирующее увеличение частоты сердечных сокращений). Не существует другого лечения VLS, кроме отказа от IL-2. На пациентах изучали режимы, основанные на применении IL-2 в низких дозах с целью избегания VLS, однако полученные терапевтические результаты оказались ниже оптимальных. Предполагалось, что VLS вызывается высвобождением провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухолей (TNF)- $\alpha$  из активированных IL-2 NK-клеток, однако в последние годы было установлено, что индуцированный IL-2 легочный отек возникает в результате непосредственного связывания IL-2 с эндотелиальными клетками легких, в которых происходит экспрессия от низкого до среднего уровня функциональных  $\alpha\beta\gamma$  IL-2-рецепторов (Krieg и др., *Proc Nat Acad Sci USA* 107, 2010, сс. 11906-11911).

Для преодоления этих проблем, связанных с иммунотерапией на основе IL-2, применяли несколько подходов. Например, было установлено, что комбинация IL-2 с некоторыми моноклональными антителами к IL-2 повышает действия лечения IL-2 *in vivo* (Kamimura и др., *J Immunol* 177, 2006, сс. 306-314; Woyma и др., *Science* 311, 2006, сс. 1924-1927). Согласно альтернативному подходу IL-2 подвергали мутации различными путями для снижения его токсичности и/или повышения его эффективности. Ни с соавторами (*Blood* 101, 2003, сс. 4853-4861, публикация патента США № 2003/0124678) заменяли остаток аргинина в положении 38 IL-2 на триптофан для элиминации активности IL-2 в отношении сосудистой проницаемости. Shanafelt с соавторами (*Nature Biotechnol* 18, 2000, сс. 1197-1202) заменяли посредством мутации аспарагин 88 на аргинин для повышения избирательности в отношении T-клеток относительно NK-клеток. Heaton с соавторами (*Cancer Res* 53, 1993, сс. 2597-2602; US № 5229109) интродуцировали две мутации, Arg38Ala и Phe42Lys, для снижения секреции провоспалительных цитокинов из NK-клеток. Gillies с соавторами (публикация патента США № 2007/0036752) заменяли три остатка IL-2 (Asp20Thr, Asn88Arg и Gln126Asp), с которыми связана аффинность к рецептору IL-2 с промежуточной аффинностью, для снижения VLS. Gillies с соавторами (WO 2008/0034473) изменяли также путем мутации поверхность раздела IL-2 с CD25 путем аминокислотной замены Arg38Trp и Phe42Lys для снижения взаимодействия с CD25 и активации T<sub>reg</sub>-клеток с целью повышения эффективности. Для этой же цели Wittrup с соавторами (WO 2009/061853) получали мутанты IL-2 с повышенной аффинностью к CD25, но не активирующие рецептор, которые в результате действовали в качестве антагонистов. Мутации интродуцировали с целью нарушения взаимодействия с  $\beta$ -и/или  $\gamma$ -субъединицей рецептора.

Однако было установлено, что ни один из известных мутантов IL-2 не позволял преодолевать все вышеуказанные проблемы, связанные с иммунотерапией на основе IL-2, а именно, токсичность, которая обусловлена индукцией VLS, толерантность к опухолевым антигенам, вызываемую индукцией AICD, и иммуносупрессию, вызываемую активацией T<sub>reg</sub>-клеток. Таким образом, в данной области сохраняется потребность в дополнительном повышении терапевтической ценности белков IL-2.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

В основу настоящего изобретения положены, в частности, данные о том, что проблемы, связанные с иммунотерапией на основе IL-2, определяются взаимодействием IL-2 с  $\alpha$ -субъединицей тримерного высокоаффинного IL-2-рецептора.

Таким образом, первым объектом изобретения является мутантный полипептид интерлейкина-2 (IL-2), содержащий первую аминокислотную мутацию, которая аннулирует или уменьшает аффинность

мутантного полипептида IL-2 к высокоаффинному IL-2-рецептору и сохраняет аффинность мутантного полипептида IL-2 к IL-2-рецептору с промежуточной аффинностью, в каждом случае по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная первая аминокислотная мутация находится в положении, соответствующем остатку 72 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная первая аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R и L72K. В более конкретном варианте осуществления изобретения указанная первая аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену L72G. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 содержит вторую аминокислотную мутацию, которая аннулирует или уменьшает аффинность мутантного полипептида IL-2 к высокоаффинному IL-2-рецептору и сохраняет аффинность мутантного полипептида IL-2 к IL-2-рецептору с промежуточной аффинностью, в каждом случае по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная вторая мутация находится в положении, выбранном из положений, соответствующих остаткам 35, 38, 42, 43 и 45 человеческого IL-2. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная вторая аминокислотная мутация находится в положении, соответствующем остатку 42 человеческого IL-2. В более конкретном варианте осуществления изобретения указанная вторая аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R и F42K. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения указанная вторая аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену F42A. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид интерлейкина-2 содержит третью аминокислотную мутацию, которая аннулирует или уменьшает аффинность мутантного полипептида IL-2 к высокоаффинному IL-2-рецептору и сохраняет аффинность мутантного полипептида IL-2 к IL-2-рецептору с промежуточной аффинностью, в каждом случае по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. В конкретном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид интерлейкина-2 содержит три аминокислотные мутации, которые аннулируют или уменьшают аффинность мутантного полипептида IL-2 к высокоаффинному IL-2-рецептору и сохраняют аффинность мутантного полипептида IL-2 к IL-2-рецептору с промежуточной аффинностью, в каждом случае по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа, где указанные три аминокислотные мутации находятся в положениях, соответствующих остаткам 42, 45 и 72 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные три аминокислотные мутации представляют собой аминокислотные замены, выбранные из группы, включающей F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R и L72K. В конкретном варианте осуществления изобретения указанные три аминокислотные мутации представляют собой аминокислотные замены F42A, Y45A и L72G. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид интерлейкина-2 дополнительно содержит аминокислотную мутацию, которая элиминирует сайт О-гликозилирования IL-2 в положении, соответствующем остатку 3 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная аминокислотная мутация, которая элиминирует сайт О-гликозилирования IL-2 в положении, соответствующем остатку 3 человеческого IL-2, представляет собой аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей T3A, T3G, T3Q, T3E, T3N, T3D, T3R, T3K и T3P. В конкретном варианте осуществления изобретения аминокислотная мутация, которая элиминирует сайт О-гликозилирования IL-2 в положении, соответствующем остатку 3 человеческого IL-2, представляет собой T3A. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2, как правило, представляет собой полноразмерную молекулу IL-2, в частности человеческую полноразмерную молекулу IL-2.

В изобретении предложен также мутантный полипептид интерлейкина-2, сцепленный с отличным от IL-2-фрагментом (не-IL-2-фрагментом). В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный не-IL-2-фрагмент представляет собой обеспечивающий направленный перенос фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный не-IL-2-фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело. В другом варианте осуществления изобретения указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела. В более конкретном варианте осуществления изобретения указанный антигенсвязывающий фрагмент выбирают из молекулы Fab и молекулы scFv. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу Fab. В другом варианте осуществления изобретения указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу scFv. В конкретных вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 сцеплен с первым и вторым не-IL-2-фрагментом. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид интерлейкина-2 объединен карбоксиконцевой пептидной связью с указанным первым не-IL-2-фрагментом и аминоконцевой пептидной связью с указанным вторым не-IL-2-фрагментом. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу иммуноглобулина. В более конкретном варианте осуществления изобретения указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет

собой молекулу иммуноглобулина класса IgG, в частности подкласса IgG<sub>1</sub>. В некоторых вариантах осуществления изобретения мишенью указанного антигенсвязывающего фрагмента является антиген, присутствующий на опухолевой клетке или в окружении опухолевой клетки, в частности антиген, выбранный из группы, включающей белок активации фибробластов (фибробласт-активирующий белок) (FAP), A1-домен тенасцина-С (TNC A1), A2-домен тенасцина-С (TNC A2), экстра-домен В фибронектина (EDB), карциноэмбриональный антиген (CEA) и ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP).

В изобретении предложен также иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид IL-2, представленный в настоящем описании, и антигенсвязывающий фрагмент. В одном из вариантов иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, мутантный полипептид IL-2 объединен с помощью amino- или карбоксиконцевой пептидной связи с указанным антигенсвязывающим фрагментом. В конкретных вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит первый и второй антигенсвязывающий фрагмент. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2, входящий в иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, объединен amino- или карбоксиконцевой пептидной связью с первым антигенсвязывающим фрагментом и второй антигенсвязывающим фрагмент объединен amino- или карбоксиконцевой пептидной связью либо I) с мутантным полипептидом IL-2, либо II) с указанным первым антигенсвязывающим фрагментом. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент, входящий в иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, представляет собой антитело, в другом варианте осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный антигенсвязывающий фрагмент выбран из молекулы Fab и молекулы scFv. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу Fab. В другом конкретном варианте осуществления изобретения указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу иммуноглобулина. В более конкретном варианте осуществления изобретения указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу иммуноглобулина класса IgG, в частности, подкласса IgG<sub>1</sub>. В некоторых вариантах осуществления изобретения мишенью указанного антигенсвязывающего фрагмента является антиген, присутствующий на опухолевой клетке или в окружении опухолевой клетки, в частности, антиген, выбранный из группы, включающей белок активации фибробластов (FAP), A1-домен тенасцина-С (TNC A1), A2-домен тенасцина-С (TNC A2), экстра-домен В фибронектина (EDB), карциноэмбриональный антиген (CEA) и ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP).

В изобретении предложены также выделенные полинуклеотиды, кодирующие мутантный полипептид IL-2 или иммуноконъюгат, представленный в настоящем описании, экспрессионные векторы, содержащие указанные полинуклеотиды, и клетки-хозяева, содержащие полинуклеотиды или экспрессионные векторы.

Предложен также способ получения мутантного полипептида IL-2 или иммуноконъюгата, представленного в настоящем описании, фармацевтической композиции, содержащей мутантный полипептид IL-2 или иммуноконъюгат, представленный в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель, и способы применения мутантного полипептида IL-2 или иммуноконъюгата, представленного в настоящем описании.

В частности, изобретение относится к мутантному полипептиду IL-2 или иммуноконъюгату, представленному в настоящем описании, предназначенному для применения для лечения заболевания у индивидуума, который нуждается в этом. В конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В конкретном варианте осуществления изобретения индивидуум представляет собой человека.

Изобретение относится также к применению мутантного полипептида IL-2 или иммуноконъюгата, представленного в настоящем описании, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения заболевания у индивидуума, который нуждается в этом.

Кроме того, предложен способ лечения заболевания у индивидуума, заключающийся в том, что вводят указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве мутантный полипептид IL-2 или иммуноконъюгат, представленный в настоящем описании. Указанное заболевание предпочтительно представляет собой рак.

Кроме того, предложен способ стимуляции иммунной системы у индивидуума, заключающийся в том, что вводят указанному индивидууму в эффективном количестве композицию, содержащую мутантный полипептид IL-2 или иммуноконъюгат, представленный в настоящем описании, в фармацевтически приемлемой форме.

### **Подробное описание изобретения**

#### **Определения**

Понятия, применяемые в настоящем описании, имеют значения, общепринятые в данной области, если ниже специально не указано иное.

В контексте настоящего описания понятие "интерлейкин-2" или "IL-2", если не указано иное, относится к любому нативному IL-2 из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного,

включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек) и грызуны (например, мыши и крысы). Под понятие подпадает непротрансформированный IL-2, а также любая форма IL-2, полученная в результате трансформации в клетке. Под понятие подпадают также встречающиеся в естественных условиях варианты IL-2, например, сплайсинговые варианты или аллельные варианты. В качестве примера аминокислотная последовательность человеческого IL-2 представлена в SEQ ID NO: 1. Непротрансформированный человеческий IL-2 дополнительно содержит расположенный на N-конце состоящий из 20 аминокислот сигнальный пептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 272, который отсутствует в зрелой молекуле IL-2.

Подразумевается, что понятие "мутант IL-2" или "мутантный полипептид IL-2" в контексте настоящего описания относится к любым мутантным формам различных форм молекулы IL-2, включая полноразмерный IL-2, укороченные формы IL-2 и формы, в которых IL-2 сцеплен с другой молекулой, например, путем слияния или химической конъюгации. Подразумевается, что понятие "полноразмерный" при использовании касательно IL-2 означает зрелую молекулу IL-2, которая имеет встречающуюся в естественных условиях длину. Например, полноразмерный человеческий IL-2 относится к молекуле, которая содержит 133 аминокислоты (см., например, SEQ ID NO: 1). Различные формы мутантов IL-2 отличаются наличием по меньшей мере одной аминокислотной мутации, которая оказывает воздействие на взаимодействие IL-2 с CD25. Такая мутация может включать замену, делецию, укорочение или модификацию аминокислотного остатка дикого типа, локализованного в норме в этом положении. Предпочтительными являются мутации, полученные путем аминокислотной замены. Если не указано иное, то в настоящем описании мутант IL-2 может быть обозначен как мутантная пептидная последовательность IL-2, мутантный полипептид IL-2, мутантный белок IL-2 или мутантный аналог IL-2.

В контексте настоящего описания обозначение различных форм IL-2 сделано относительно последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1. В контексте настоящего описания для одной и той же мутации можно применять различные обозначения. Например, мутацию, приводящую к замене фенилаланина в положении 42 на аланин можно обозначать как 42A, A42, A<sub>42</sub>, F42A или Phe42Ala.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "аминокислотная мутация" относится к аминокислотным заменам, делециям, инсерциям и модификациям. Можно применять любую комбинацию замены, делеции, инсерции и модификации для создания конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками, например пониженной способностью связываться с CD25. Аминокислотная последовательность с делециями и инсерциями включает амино- и/или карбоксиконцевые делеции и инсерции аминокислот. Примером концевой делеции является делеция остатка аланина в положении 1 полноразмерного человеческого IL-2. Предпочтительными аминокислотными мутациями являются аминокислотные замены. Для изменения, например, характеристик связывания полипептида IL-2, наиболее предпочтительными являются неконсервативные аминокислотные замены, т.е. замена одной аминокислоты на другую аминокислоту, имеющую другие структурные и/или химические свойства. Предпочтительные аминокислотные замены включают замену гидрофобной аминокислоты на гидрофильную. Аминокислотные замены включают замену на не встречающиеся в естественных условиях аминокислоты или на производные встречающихся в естественных условиях двадцати стандартных аминокислот (например, на 4-гидроксипролин, 3-метилгистидин, орнитин, гомосерин, 5-гидроксилизин). Аминокислотные мутации можно создавать с помощью генетических или химических методов, хорошо известных в данной области. Генетические методы могут включать сайт-направленный мутагенез, ПЦР, синтез генов и т.п. Подразумевается, что можно применять также методы изменения боковой группы аминокислоты, отличные от методов генетической инженерии, такие как химическая модификация.

В контексте настоящего описания форма "дикого типа" IL-2 представляет собой форму IL-2, которая является такой же, что и мутантный полипептид IL-2, за исключением того, что в форме дикого типа присутствует аминокислота дикого типа в каждом аминокислотном положении мутантного полипептида IL-2. Например, если мутант IL-2 представляет собой полноразмерный IL-2 (т.е. IL-2, не слитый или не конъюгированный с любой другой молекулой), то форма дикого типа этого мутанта представляет собой полноразмерный нативный IL-2. Если мутант IL-2 представляет собой слияние IL-2 и другого полипептида, кодируемого по ходу транскрипции относительно IL-2 (например, цепь антитела), то форма дикого типа этого мутанта IL-2 представляет собой IL-2 с аминокислотной последовательностью дикого типа, слитой с таким же кодируемым по ходу транскрипции полипептидом. Кроме того, если мутант IL-2 представляет собой укороченную форму IL-2 (мутантная или модифицированная последовательность в неукороченной части IL-2), то форма дикого типа этого мутанта IL-2 представляет собой аналогично укороченный IL-2, который имеет последовательность дикого типа. Для целей сравнения аффинности связывания IL-2-рецептора или биологической активности различных форм мутантов IL-2 и соответствующей формы дикого типа IL-2, под понятие дикий тип подпадают формы IL-2, содержащие одну или несколько аминокислотных мутаций, которые не влияют на связывание IL-2-рецептора по сравнению со встречающимися в естественных условиях нативным IL-2, таких, например, как замена цистеина в положении, соответствующем остатку 125 человеческого IL-2, на аланин. В некоторых вариантах осуществления изобретения для целей настоящего изобретения форма дикого типа IL-2 содержит аминокислотную замену C125A (см. SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид

IL-2 дикого типа, с которым сравнивают мутантный полипептид IL-2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления изобретения полипептид IL-2 дикого типа, с которым сравнивают мутантный полипептид IL-2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

В контексте настоящего описания понятие "CD25" или " $\alpha$ -субъединица рецептора IL-2", если не указано иное, относится к любой нативной CD25 из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек) и грызуны (например, мыши и крысы). Под понятие подпадает "полноразмерная" непротессированная CD25, а также любая форма CD25, полученная в результате процессинга в клетке. Под понятие подпадают также встречающиеся в естественных условиях варианты CD25, например сплайсинговые варианты или аллельные варианты. В некоторых вариантах осуществления изобретения CD25 представляет собой человеческую CD25. В качестве примера аминокислотная последовательность человеческой CD25 (с сигнальной последовательностью, Avi-меткой и His-меткой) представлена в SEQ ID NO: 278.

В контексте настоящего описания понятие "высокоаффинный рецептор IL-2" относится к гетеротримерной форме рецептора IL-2, состоящей из рецепторной  $\gamma$ -субъединицы (которая известна также как общая  $\gamma$ -субъединица цитокинового рецептора,  $\gamma_c$ , или CD 132), рецепторной  $\beta$ -субъединицы (известной также как CD122 или p70) и рецепторной  $\alpha$ -субъединицы (известной также как CD25 или p55). В противоположность этому понятие "рецептор IL-2 с промежуточной аффинностью" относится к рецептору IL-2, который включает только  $\gamma$ -субъединицу и  $\beta$ -субъединицу, но не содержит  $\alpha$ -субъединицы (см., например, обзор Olejniczak и Kasprzak, *Med Sci Monit* 14, 2008, RA179-189). Понятие "аффинность" относится к суммарной силе всех нековалентных взаимодействий между индивидуальным сайтом связывания молекулы (например, рецептора) и его партнера по связыванию (например, лиганда). Если не указано иное, то в контексте настоящего описания понятие "аффинность связывания" относится к присущей компонентам связывающейся пары (например, рецептору и лиганду) аффинности связывания, отражающей взаимодействие по типу 1:1. Аффинность молекулы X к ее партнеру Y можно, как правило, характеризовать с помощью константы диссоциации ( $K_D$ ), которая представляет собой отношение констант скорости реакции диссоциации и ассоциации ( $k_{off}$  и  $k_{on}$  соответственно). Так, эквивалентные аффинности могут соответствовать различным константам скорости, если соотношение констант скорости остается таким же. Аффинность можно оценивать общепринятыми методами, известными в данной области, включая представленные в настоящем описании.

Аффинность полипептида IL-2 мутантного или дикого типа в отношении различных форм рецептора IL-2 можно определять с помощью изложенного в разделе "Примеры" метода резонанса поверхностного плазмона (SPR), используя стандартную инструментальную базу, например, устройство VIAcore (фирма GE Healthcare), и рецепторные субъединицы, которые можно получать с помощью метода рекомбинантной экспрессии (см., например, Shanafelt и др., *Nature Biotechnol* 18, 2000, сс. 1197-1202). Альтернативно этому, аффинность связывания мутантов IL-2 с различными формами рецептора IL-2 можно оценивать с использованием клеточных линий, для которых известна способность к экспрессии одной или другой формы рецептора. Ниже описаны конкретные приведенные в качестве иллюстрации примеры вариантов измерения аффинности связывания.

Под "регуляторной T-клеткой" или "T<sub>рег</sub>-клеткой" подразумевается специализированный тип CD4<sup>+</sup>-T-клетки, которая может подавлять ответы других T-клеток. T<sub>рег</sub>-клетки отличаются способностью экспрессировать  $\alpha$ -субъединицу рецептора IL-2 (CD25) и фактор транскрипции forkhead box P3 (FOXP3) (Sakaguchi, *Annu Rev Immunol* 22, 2004, сс. 531-562), и они играют решающую роль в индукции и поддержании периферической толерантности к антигенам, включая те, которые экспрессируются опухолями. T<sub>рег</sub>-клеткам требуется IL-2 для их функционирования и развития и индукции их способности оказывать подавляющее действие.

В контексте настоящего описания понятие "эффektorные клетки" относится к популяции лимфоцитов, которые опосредуют цитотоксические действия IL-2. Эффektorные клетки представляют собой эффektorные T-клетки, такие как цитотоксические CD8-T-клетки, NK-клетки, лимфокин-активированные клетки-киллеры (LAK) и макрофаги/моноциты.

В контексте настоящего описания понятие "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидной молекуле, которая специфически связывается с антигенной детерминантой. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью направлять субстанцию, к которой он присоединен (например, цитокин или второй антигенсвязывающий фрагмент), к сайту-мишени, например, к специфическому типу опухолевой клетки или стромы опухоли, несущей антигенную детерминанту. Антигенсвязывающие фрагменты включают антитела и их фрагменты, что будет дополнительно описано ниже. Предпочтительные антигенсвязывающие фрагменты включают антигенсвязывающий домен антитела, который содержит переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты могут включать константные области антитела, что будет дополнительно описано ниже и известно в данной области. Пригодные константные области тяжелых цепей включают любой из

пяти изотипов:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  или  $\mu$ . Пригодные константные области легких цепей включают любой из двух изотипов:  $\kappa$  и  $\lambda$ .

Понятие "специфически связывается" означает, что связывание является избирательным в отношении антигена и его можно отличать от нежелательных или неспецифических взаимодействий. Способность антигенсвязывающего фрагмента связываться со специфической антигенной детерминантой можно определять с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или других методик, известных специалисту в данной области, например, с помощью методики на основе резонанса поверхностного плазмона (осуществляя анализ с помощью устройства BIAcore) (Liljeblad и др., *Glyco J* 17, 2000, сс. 323-329), и традиционных анализов связывания (Heeley, *Endocr Res* 28, 2002, сс. 217-229).

В контексте настоящего описания понятие "антигенная детерминанта" является синонимом понятий "антиген" и "эпитоп" и относится к сайту (например, участку, состоящему из смежных аминокислот, или конформационной конфигурации, состоящей из различных областей несмежных аминокислот) на полипептидной макромолекуле, с которой связывается антигенсвязывающий фрагмент с образованием комплекса антигенсвязывающий фрагмент-антиген. Пригодные антигенные детерминанты можно обнаружить, например, на поверхности опухолевых клеток, на поверхности инфицированных вирусом клеток, на поверхности других больных клеток, в свободном состоянии в сыворотке крови и/или во внеклеточном матриксе (ECM).

В контексте настоящего описания понятие "полипептид" относится к молекуле, состоящей изномеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (которые обозначают также как пептидные связи). Понятие "полипептид" относится к любой цепи, состоящей из двух или большего количества аминокислот, и не подразумевает, что продукт имеет конкретную длину. Так, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "аминокислотная цепь" или любое иное общепринятое понятие, относящееся к цепи, состоящей из двух или большего количества аминокислот, все подпадают под определение "полипептид", и понятие "полипептид" можно применять вместо или взаимозаменяемо с любым из указанных понятий. Подразумевается также, что понятие "полипептид" относится в продуктам, которые несут пост-экспрессионные модификации полипептида, включая (но, не ограничиваясь только ими) гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию с использованием известных защитных/блокирующих групп, протеолитическое расщепление или модификацию с помощью не встречающихся в естественных условиях аминокислот. Полипептид можно получать из встречающегося в естественных условиях биологического источника или можно получать с помощью технологии рекомбинантной ДНК, и его не обязательно транслировать с созданной нуклеотидной последовательности. Его можно создавать любым путем, включая химический синтез. Полипептид, предлагаемый в изобретении, может состоять примерно из 3 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 25 или более, 50 или более, 75 или более, 100 или более, 200 или более, 500 или более, 1000 или более или 2000 или более аминокислот. Полипептиды могут иметь различную трехмерную структуру, хотя они необязательно должны иметь указанную структуру. Полипептиды с определенной трехмерной структурой обозначают как полипептиды, имеющие укладку, а полипептиды, которые не обладают определенной трехмерной структурой, но которые легче могут адаптироваться к большому количеству различных конформаций, обозначают как полипептиды, не имеющие укладку.

Под "выделенным" полипептидом или его вариантом, или производным подразумевают полипептид, который не находится в его естественном окружении. При этом не требуется какого-то конкретного уровня очистки. Например, выделенный полипептид можно удалять из его нативного или естественного окружения. Полученные путем рекомбинации полипептиды и белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, рассматриваются как выделенные для целей настоящего изобретения, если они представляют собой нативные или рекомбинантные полипептиды, которые отделены, фракционированы или частично или полностью очищены с помощью любого приемлемого метода.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" относительно полипептидной референс-последовательности определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в полипептидной референс-последовательности, после выравнивания последовательностей и интродукции при необходимости брешей для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и при этом какие-либо консервативные замены не учитываются при оценке идентичности последовательностей. Сравнительный анализ для определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными путями, которые находятся в компетенции специалиста в данной области, например, с использованием публично доступных компьютерных программ, таких как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определять соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако для целей настоящего изобретения величину % идентичности аминокислотных последовательностей получают с использованием предназначенной для сравнения последовательностей компьютерной программы ALIGN-2. Предназначенная для сравнения последовательностей компьютерная про-



грамма ALIGN-2 разработана фирмой Genentech, Inc., и исходный код помещен на хранение вместе с документацией для пользователя в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован под регистрационным номером U.S. Copyright Registration № TXU510087. Программа ALIGN-2 представляет собой публично доступную программу фирмы Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, шт. Калифорния, или ее можно компилировать из исходного кода. Программу ALIGN-2 можно компилировать для применения в операционной системе UNIX, включая цифровую версию UNIX V4.0D. В программе ALIGN-2 все параметры для сравнения последовательностей являются заданными и не должны изменяться. В ситуациях, когда ALIGN-2 применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотных последовательностей данной аминокислотной последовательности А относительно или по сравнению с данной аминокислотной последовательностью В (которую другими словами можно обозначать как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или отличается определенным % идентичности аминокислотной последовательности относительно или по сравнению с данной аминокислотной последовательностью В), рассчитывают следующим образом:

$$100 \times \text{частное } X/Y$$

где X обозначает количество аминокислотных остатков, оцененных программой сравнительного анализа последовательностей ALIGN-2 как идентичные совпадения при сравнительном анализе последовательностей А и В с помощью указанной программы, и где Y обозначает общее количество аминокислотных остатков в В. Должно быть очевидно, что, когда длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, то % идентичности аминокислотной последовательности А относительно аминокислотной последовательности В не должен быть равен % идентичности аминокислотной последовательности В относительно аминокислотной последовательности А. Если специально не указано иное, то в контексте настоящего описания все величины % идентичности аминокислотных последовательностей получают согласно процедуре, описанной в последнем из предшествующих параграфов, с помощью компьютерной программы ALIGN-2.

Понятие "полинуклеотид" относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты или конструкции, например, матричной РНК (мРНК), РНК вирусного происхождения или плазмидной ДНК (пДНК). Полинуклеотид может содержать обычную фосфодиэфирную связь или не традиционную связь (например, амидную связь, такую, которая присутствует в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Понятие "молекула нуклеиновой кислоты" относится к любому одному или нескольким сегментам нуклеиновой кислоты, например, фрагментам ДНК или РНК, присутствующим в полинуклеотиде.

Под "выделенной" нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, т.е. ДНК или РНК, которая отделена от ее нативного окружения. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий входящий в вектор терапевтический полипептид, рассматривается как выделенный для целей настоящего изобретения. Другими примерами выделенного полинуклеотида являются рекомбинантные полинуклеотиды, присутствующие в гетерологичных клетках-хозяевах, или очищенные (частично или полностью) полинуклеотиды, находящиеся в растворе. Выделенный полинуклеотид включает молекулу полинуклеотида, входящую в клетки, которые в норме содержат молекулу полинуклеотида, но молекула полинуклеотида присутствует вне хромосомы или имеет локализацию в хромосоме, отличную от ее локализации в хромосоме в естественных условиях.

Выделенные молекулы РНК включают полученные *in vivo* или *in vitro* РНК-транскрипты, предлагаемые в настоящем изобретении, а также формы с позитивной и негативной цепью и двухцепочечные формы. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты, предлагаемые в настоящем изобретении, включают также указанные молекулы, полученные с помощью синтеза. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота может представлять собой или может включать регуляторный элемент, такой как промотор, сайт связывания рибосом или терминатор транскрипции. Под нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом, имеющей/имеющим нуклеотидную последовательность, которая, например, на 95% "идентична" нуклеотидной референс-последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, подразумевается, что нуклеотидная последовательность полинуклеотида идентична референс-последовательности за исключением того, что полинуклеотидная последовательность может включать вплоть до 5 точечные мутаций на каждые 100 нуклеотидов нуклеотидной референс-последовательности. Другими словами, для получения полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 95% нуклеотидной референс-последовательности, вплоть до 5% нуклеотидов в референс-последовательности можно изымать путем делеции или заменять на другой нуклеотид, или вплоть до 5% нуклеотидов от общего количества нуклеотидов в референс-последовательности можно встраивать в референс-последовательность. Эти изменения референс-последовательности могут иметь место в положениях на 5'- или 3'-конце нуклеотидной референс-последовательности или в ином положении между этими концевыми положениями, и их встраивают либо индивидуально между остатками в референс-последовательности, либо их встраивают в референс-последовательность в виде одной или нескольких смежных групп. На практике решение вопроса о том, идентична ли конкретная полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, можно решать, как правило, с использованием известных компьютерных программ, например, указанных выше для полипептидов (на-

пример, ALIGN-2).

Понятие "кассета экспрессии" относится к полинуклеотиду, полученному с помощью рекомбинации или синтеза, который содержит серии специфических нуклеотидных элементов, которые обеспечивают транскрипцию конкретной нуклеиновой кислоты в клетке-мишени. Рекомбинантную кассету экспрессии можно встраивать в плазмиду, хромосому, митохондриальную ДНК, пластидную ДНК, вирус или фрагмент нуклеиновой кислоты. Как правило, рекомбинантная кассета экспрессии, представляющая собой часть экспрессионного вектора, включает среди прочих последовательностей подлежащую транскрипции нуклеотидную последовательность и промотор. В некоторых вариантах осуществления изобретения кассета экспрессии, предлагаемая в изобретении, содержит полинуклеотидные последовательности, которые кодируют мутантные полипептиды IL-2 или иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, или их фрагменты.

Понятие "вектор" или "экспрессионный вектор" является синонимом понятия "экспрессионная конструкция" и относится к молекуле ДНК, которую применяют для интродукции и обеспечения экспрессии конкретного гена, с которой он функционально связан в клетке-мишени. Понятие включает вектор, представляющий собой самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, встроенный в геном клетки-хозяина, в которую он интродуцирован. Экспрессионный вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит кассету экспрессии. Экспрессионные векторы позволяют осуществлять транскрипцию больших количеств стабильной мРНК. Когда экспрессионный вектор находится внутри клетки-мишени, то молекула рибонуклеиновой кислоты или белок, который кодируется геном, продуцируется в результате клеточного механизма транскрипции и/или трансляции. В одном из вариантов осуществления изобретения экспрессионный вектор, предлагаемый в изобретении, содержит кассету экспрессии, которая включает полинуклеотидные последовательности, которые кодируют мутантные полипептиды IL-2 или иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, или их фрагменты.

Понятие "искусственный" относится к синтетической или не полученной из клетки-хозяина композиции, например, к синтезированному химически олигонуклеотиду.

В контексте настоящего описания понятия "клетка-хозяин", "клеточная линия-хозяин" и "клеточная культура-хозяин" используются взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые интродуцирована экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство указанных клеток. "Трансформанты" и "трансформированные клетки" клеток-хозяев включают первичные рассматриваемые клетки, а также культуры, выведенные из них, независимо от количества пересевов. Потомство может не быть строго идентичным родительской клетке по составу нуклеиновых кислот, а может нести мутации. Под данное понятие подпадает мутантное потомство, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, что и отобранная путем скрининга или селекции исходная трансформированная клетка.

В контексте настоящего описания понятие "антитело" используется в его наиболее широком смысле и относится к различным структурам антител, включая (но, не ограничиваясь только ими) моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они обладают требуемой антигенсвязывающей активностью.

В контексте настоящего описания понятия "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "полное антитело" используются взаимозаменяемо, и они относятся к антителу, имеющему строение, практически сходное со строением нативного антитела, или имеющему тяжелые цепи, которые содержат указанную в настоящем описании Fc-область.

Понятие "фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примерами фрагментов антител являются (но, не ограничиваясь только ими) Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, димерные антитела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител (например, scFv) и мультиспецифические антитела, полученные из фрагментов антител. Обзор некоторых фрагментов антител см., например, у Hudson и др., *Nat Med* 9, 2003, сс. 129-134. Обзор scFv-фрагментов см., например, у Plückthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, т. 113, под ред. Rosenberg и Moore, изд-во Springer-Verlag, New York, 1994, сс. 269-315; см. также WO 93/16185 и US №№ 5571894 и 5587458. Обсуждение Fab- и F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов, содержащих остатки эпитопа, связывающегося с рецептором спасения, и обладающих удлинненным временем полужизни *in vivo*, см. в US № 5869046. Димерные антитела (диабоды) представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые могут быть двухвалентными или биспецифическими (см., например, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson и др., *Nat Med* 9, 2003, сс. 129-134 и Hollinger и др., *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1993, сс. 6444-6448. Тримерные (триабоды) и тетрамерные (тетрабоды) антитела описаны также у Hudson и др., *Nat Med* 9, 2003, сс. 129-134. Фрагменты антител можно создавать с помощью различных методик, включая (но, не ограничиваясь только ими) протеолитическое расщепление интактного антитела, а также получать с использованием рекомбинантных клеток-хозяев (например, *E. coli* или фага), как указано в настоящем описании.

Понятие "молекула иммуноглобулина" относится к белку, имеющему структуру встречающегося в естественных условиях антитела. Например, иммуноглобулины класса IgG представляют собой гетеро-

тетрамерные гликопротеины с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, связанные дисульфидными мостиками. В направлении от N-конца к С-концу каждая тяжелая цепь содержит переменную область (VH), которую называют также переменным тяжелым доменом или переменным доменом тяжелой цепи, за которой расположены три константных домена (CH1, CH2 и CH3), которые называют также константной областью тяжелой цепи. Аналогично этому в направлении от N-конца к С-концу каждая легкая цепь содержит переменную область (VL), которую называют также переменным легким доменом или переменным доменом легкой цепи, за которой расположен константный домен легкой цепи (CL), который называют также константной областью легкой цепи. Тяжелая цепь иммуноглобулина может относиться к одному из пяти классов, обозначенных как  $\alpha$  (IgA),  $\delta$  (IgD),  $\epsilon$  (IgE),  $\gamma$  (IgG) или  $\mu$  (IgM), некоторые из которых дополнительно подразделяют на подклассы, например  $\gamma_1$  (IgG<sub>1</sub>),  $\gamma_2$  (IgG<sub>2</sub>),  $\gamma_3$  (IgG<sub>3</sub>),  $\gamma_4$  (IgG<sub>4</sub>),  $\alpha_1$  (IgA<sub>1</sub>) и  $\alpha_2$  (IgA<sub>2</sub>). Легкая цепь иммуноглобулина может относиться к одному из двух типов, обозначенных как каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ), на основе аминокислотной последовательности ее константного домена. Иммуноглобулин, как правило, состоит из двух молекул Fab и Fc-домена, которые соединены через шарнирную область иммуноглобулина.

Понятие "антигенсвязывающий домен" относится к части антитела, которая содержит область, специфически связывающуюся и являющуюся комплементарной части антигена или полному антигену. Антигенсвязывающий домен может представлять собой, например, один или несколько переменных доменов антитела (которые называют также переменными областями антитела). Предпочтительно антигенсвязывающий домен содержит переменную область легкой цепи (VL) антитела и переменную область тяжелой цепи (VH) антитела.

Понятие "переменная область" или "переменный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, которая/который участвует в связывании антитела с антигеном. Переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три гиперпеременных участка (HVR) (см., например, Kindt и др., Kuby Immunology, 6-ое изд., изд-во W.H. Freeman and Co., 2007, с. 91). Одного VH- или VL-домена может быть достаточно для обеспечения специфичности связывания антигена.

Понятие "гиперпеременный участок" или "HVR" в контексте настоящего описания относится к каждому из участков переменной области антитела, последовательность которых являются гиперпеременной, и/или которые образуют структуры в виде петель ("гиперпеременные петли"). Как правило, нативные четырехцепочечные антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). HVR, как правило, содержат аминокислотные остатки из гиперпеременных петель и/или из "определяющих комплементарность участков" (CDR), последние отличаются наиболее выраженной переменностью последовательности и/или участвуют в распознавании антигенов. Кроме CDR1, присутствующего в VH, CDR, как правило, содержат аминокислотные остатки, которые образуют гиперпеременные петли. Понятие "гиперпеременные участки" (HVR) относится также к "определяющим комплементарность участкам" (CDR), и в контексте настоящего описания эти понятия используются взаимозаменяемо касательно положений переменной области, которые формируют антигенсвязывающие области. Эта конкретная область описана у Kabat и др., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 1983 и у Chothia и др., J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917, причем эти определения относятся к перекрывающимся аминокислотным остаткам или поднаборам аминокислотных остатков при их сравнении друг с другом. Однако в контексте настоящего описания подразумевается возможность применения любого определения CDR антитела или его вариантов. Соответствующие аминокислотные остатки, из которых состоят CDR, как они определены в каждой из процитированных выше ссылок, представлены в сравнении ниже в табл. 1. Точные номера остатков, которые образуют конкретный CDR, должны варьироваться в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области на основе данных об аминокислотной

Таблица 1. Определения CDR

	Кэбот	Хотиа	AbM <sup>2</sup>
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32	26-35
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	52-58	50-58
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	95-102	95-102
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	24-32
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	50-56
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	89-97

<sup>1</sup>Нумерация всех входящих в CDR остатков в табл. 1 дана в соответствии с номенклатурой, предложенной Кэботом с соавторами (см. ниже).

<sup>2</sup>Обозначение "AbM" с прописной буквой "b", использованное в табл. 1, относится к CDR, как они определены программой для моделирования антител "AbM" компании Oxford Molecular Group.

Кэбот с соавторами предложили также систему нумерации (номенклатуру) последовательностей

вариабельных областей, которую можно применять для любого антитела. Обычный специалист в данной области может однозначно применять эту систему "нумерации по Кэботу" к любой последовательности вариабельной области, не имея никаких экспериментальных данных, кроме сведений о самой последовательности. В контексте настоящего описания понятие "нумерация по Кэботу" относится к системе нумерации, описанной у Kabat и др., "Sequence of Proteins of Immunological Interest", изд-во U.S. Dept. of Health and Human Services, 1983. Если не указано иное, то ссылки на нумерацию положений конкретных аминокислотных остатков в вариабельной области антитела даны в соответствии с системой нумерации по Кэботу.

Нумерация полипептидных последовательностей в "Перечне последовательностей" (т.е. SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 31, 33 и т.д.) не представляет собой нумерацию в соответствии с системой Кэбота. Однако в компетенции обычного специалиста в данной области является превращение нумерации последовательностей в "Перечне последовательностей" в нумерацию по Кэботу.

"Каркасные участки" или "FR"-участки представляют собой участки вариабельных доменов, отличные от остатков гипервариабельных участков (HVR). FR вариабельного домена, как правило, представлены четырьмя FR-доменами: FR1, FR2, FR3 и FR4. Таким образом, последовательности HVR и FR, как правило, расположены в VH (или VL) в следующем порядке: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Понятие "класс" антител относится к типу константного домена или константной области, характерному для тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них можно дополнительно подразделять на подклассы (изотипы), например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub>. Константные домены тяжелых цепей, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, обозначают как  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$  соответственно.

В контексте настоящего описания понятие "Fc-область" относится к C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Понятие относится к нативной последовательности Fc-областей и вариантам Fc-областей. Хотя пограничные последовательности Fc-области в тяжелой цепи IgG могут слегка варьироваться, как правило, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако C-концевой лизин (Lys447) Fc-области может либо присутствовать, либо может не присутствовать.

"Модификация, усиливающая гетеродимеризацию" представляет собой манипуляцию с пептидным каркасом или пост-трансляционные модификации полипептида, например, тяжелой цепи иммуноглобулина, которая уменьшает или препятствует ассоциации полипептида с идентичным полипептидом с образованием гомодимера. В контексте настоящего описания модификация, усиливающая гетеродимеризацию, включает, прежде всего, различные модификации, осуществляемые с каждым из двух полипептидов, требуемые для образования димера, при этом, модификации дополняют друг друга таким образом, чтобы усиливать ассоциацию двух полипептидов. Например, модификация, усиливающая гетеродимеризацию, может изменять структуру или заряд одного или обоих полипептидов, что требуется для образования димера, таким образом, чтобы улучшать их ассоциацию стерически или электростатически соответственно. Гетеродимеризация имеет место между двумя неидентичными полипептидами, такими как тяжелые цепи двух иммуноглобулинов, при этом дополнительные компоненты иммуноконъюгата слитых друг с другом тяжелых цепей (например, полипептида IL-2) не являются одинаковыми. В иммуноконъюгатах, предлагаемых в настоящем изобретении, модификация, усиливающая гетеродимеризацию, затрагивает тяжелую(ые) цепь(и), в частности Fc-домен молекулы иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, усиливающая гетеродимеризацию, представляет собой аминокислотную мутацию, в частности аминокислотную замену. В конкретном варианте осуществления изобретения модификация, усиливающая гетеродимеризацию, представляет собой индивидуальную аминокислотную мутацию, в частности аминокислотную замену, в каждой из двух тяжелых цепей иммуноглобулина.

Понятие "эффекторные функции" при его использовании касательно антител относится к видам биологической активности, присущим Fc-области антитела, которые варьируются в зависимости от изотипа антитела. Примерами эффекторных функций антитела являются способность связываться с C1q и комплементзависимая цитотоксичность (CDC), способность связываться с Fc-рецептором, антителообусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC), антителообусловленный клеточнозависимый фагоцитоз (ADCP), секреция цитокинов, понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора); и активация B-клеток.

"Активирующий Fc-рецептор" представляет собой Fc-рецептор, который после взаимодействия с Fc-областью антитела осуществляет процесс передачи сигналов, которые стимулируют несущую рецептор клетку осуществлять эффекторные функции. Активирующие Fc-рецепторы включают Fc $\gamma$ RIIIa (CD16a), Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIIa (CD32) и Fc $\alpha$ RI (CD89).

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятия "конструирование, сконструированный, инженерия" включают любую манипуляцию с пептидным каркасом или посттрансляционные модификации встречающегося в естественных условиях или рекомбинантного полипептида или его

фрагмента. Инженерия включает модификации аминокислотной последовательности, схемы гликозилирования или группы боковых цепей индивидуальных аминокислот, а также комбинации указанных подходов.

В контексте настоящего описания понятие "иммуноконъюгат" относится к молекуле полипептида, которая включает по меньшей мере один фрагмент IL-2 и по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один фрагмент IL-2 и по меньшей мере два антигенсвязывающих фрагмента. Конкретные иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, практически состоят из одного фрагмента IL-2 и двух антигенсвязывающих фрагментов, сцепленных с помощью одной или нескольких линкерных последовательностей. Антигенсвязывающий фрагмент может быть сцеплен с фрагментом IL-2 с помощью различных взаимодействий и в широком разнообразии конфигураций, указанных в настоящем описании.

В контексте настоящего описания понятие "контрольный антигенсвязывающий фрагмент" относится к антигенсвязывающему фрагменту, который должен быть свободен от других антигенсвязывающих фрагментов и эффекторных фрагментов. Например, при осуществлении сравнения иммуноконъюгата Fab-IL2-Fab, предлагаемого в изобретении, с контрольным антигенсвязывающим фрагментом контрольный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой свободный Fab, при этом иммуноконъюгат Fab-IL2-Fab и свободная молекула Fab могут оба специфически связываться с одной и той же антигенной детерминантой.

В контексте настоящего описания понятия "первый" и "второй" касательно антигенсвязывающих фрагментов и др., применяют для удобства различия, когда присутствует более одного фрагмента каждого типа. Подразумевается, что применение этих понятий не определяет специфический порядок или ориентацию иммуноконъюгата, если специально не указано иное.

Понятие "эффективное количество" агента относится к количеству, необходимому для обеспечения физиологического изменения в клетке или ткани, в которую его вводят.

Понятие "терапевтически эффективное количество" агента, например фармацевтической композиции, относится к количеству, эффективному при применении в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата. Терапевтически эффективное количество агента, например, элиминирует, снижает, замедляет, минимизирует или предупреждает нежелательные явления заболевания.

"Индивидуум" или "субъект" представляет собой млекопитающее. Млекопитающие представляют собой (но, не ограничиваясь только ими) одомашненных животных (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматов (например, люди и приматы кроме человека, такие как мартышки), кроликов и грызунов (например, мыши и крысы). Предпочтительно индивидуум или субъект представляет собой человека.

Понятие "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, что он обеспечивает биологическую активность входящего в его состав действующего вещества, которое должно обладать эффективностью и который не содержит дополнительных компонентов, которые обладают неприемлемой токсичностью для индивидуума, которому следует вводить композицию.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от действующего вещества, который является нетоксичным для индивидуума. Фармацевтически приемлемые носители включают (но, не ограничиваясь только ими) буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

В контексте настоящего описания понятие "лечение" (и его грамматические вариации, такие как "лечить" или "процесс лечения") относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения болезни у индивидуума, подлежащего лечению, и его можно осуществлять либо для профилактики или в процессе развития клинической патологии. Требуемыми действиями лечения являются (но, не ограничиваясь только ими) предупреждение возникновения или рецидива болезни, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий болезни, предупреждение метастазов, снижение скорости развития болезни, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссия или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления изобретения антители, предлагаемые в изобретении, применяют для задержки развития болезни или замедления прогрессирования болезни.

#### **Подробное описание вариантов осуществления изобретения**

В основу настоящего изобретения положена задача создать мутантный полипептид IL-2, обладающий улучшенными свойствами для иммунотерапии. В частности, в основу изобретения положена задача элиминировать фармакологические свойства IL-2, которые участвуют в проявлении его токсичности, но не имеют решающего значения для эффективности IL-2. Как указано выше, различные формы рецептора IL-2 состоят из различных субъединиц и характеризуются различной аффинностью к IL-2. Рецептор IL-2 с умеренной аффинностью, состоящий из  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц рецептора, экспрессируется на покоящихся эффекторных клетках и его присутствия достаточно для обеспечения передачи сигналов IL-2. Высокоаффинный рецептор IL-2, который дополнительно содержит  $\alpha$ -субъединицу рецептора, экспрессируется

главным образом на регуляторных Т-клетках ( $T_{reg}$ ), а также на активированных эффекторных клетках, при этом их взаимодействие с IL-2 может усиливать опосредуемую  $T_{reg}$ -клетками иммуносупрессию или индуцированную активацией клеточную гибель (AICD) соответственно. Таким образом, не ограничиваясь какой-либо теорией, можно предположить, что снижение или аннулирование аффинности IL-2 к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL-2 может снижать индуцируемую IL-2 понижающую регуляцию функции эффекторных клеток посредством регуляторных Т-клеток и развитие толерантности опухолей с помощью процесса AICD. С другой стороны, сохранение аффинности рецептора IL-2 с промежуточной аффинностью поддерживает индукцию пролиферации и активацию эффекторных клеток типа НК и Т-клеток с помощью IL-2.

В данной области уже известно несколько мутантов IL-2, однако при создании изобретения были обнаружены новые аминокислотные мутации полипептида IL-2 и их комбинации, которые являются наиболее предпочтительными для придания IL-2 характеристики, требуемых для иммунотерапии.

Первым объектом изобретения является мутантный полипептид интерлейкина-2 (IL-2), содержащий аминокислотную мутацию, которая аннулирует или снижает аффинность мутантного полипептида IL-2 к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL-2 и сохраняет аффинность мутантного полипептида IL-2 к рецептору IL-2 с промежуточной аффинностью, в каждом случае по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа.

Мутанты человеческого IL-2 (hIL-2) с пониженной аффинностью к CD25 можно создавать, например, путем аминокислотной замены аминокислоты в положении 35, 38, 42, 43, 45 или 72 или их комбинации. Примерами аминокислотных замен являются K35E, K35A, R38A, R38E, R38N, R38F, R38S, R38L, R38G, R38Y, R38W, F42L, F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, K43E, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R и L72K. Конкретные мутанты IL-2, предлагаемые в изобретении, содержат мутацию в аминокислотном положении, соответствующем остатку 42, 45 или 72 человеческого IL-2 или их комбинации. Эти мутанты характеризуются практически одинаковой аффинностью к рецептору IL-2 с промежуточной аффинностью и обладают пониженной в значительной степени аффинностью к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL-2 и высокоаффинному рецептору IL-2 по сравнению с формой дикого типа мутанта IL-2.

Другая характеристика перспективных мутантов может представлять собой способность индуцировать пролиферацию несущих рецептор IL-2 Т-клеток и/или НК-клеток, способность индуцировать передачу сигналов IL-2 в несущих рецептор IL-2 Т-клетках и/или НК-клетках, способность воздействовать на образование интерферона (IFN)- $\gamma$  в качестве вторичного цитокина НК-клетками, пониженную способность индуцировать выработку вторичных цитокинов, прежде всего IL-10 и TNF- $\alpha$ , мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC), пониженную способность активировать регулярные Т-клетки, пониженную способность индуцировать апоптоз Т-клеток и пониженным профилем токсичности *in vivo*.

В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация, которая аннулирует или снижает аффинность мутантного полипептида IL-2 к высокоаффинному рецептору IL-2 и сохраняет аффинность мутантного полипептида IL-2 к рецептору IL-2 с промежуточной аффинностью, находится в положении, соответствующем остатку 72 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотную замену выбирают из группы, включающей L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R, и L72K. В более конкретном варианте осуществления изобретения аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену L72G.

Конкретным объектом изобретения является мутантный полипептид IL-2, содержащий первую и вторую аминокислотную мутацию, которые аннулируют или снижают аффинность мутантного полипептида IL-2 к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL-2 и сохраняют аффинность мутантного полипептида IL-2 к рецептору IL-2 с промежуточной аффинностью. В одном из вариантов осуществления изобретения первая аминокислотная мутация находится в положении, соответствующем остатку 72 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная первая аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная первая аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R и L72K. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения аминокислотная замена представляет собой L72G. Указанная вторая аминокислотная мутация находится в положении, отличном от положения первой аминокислотной мутации. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная вторая аминокислотная мутация находится в положении, выбранном из положений, соответствующих остаткам 35, 38, 42, 43 и 45 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная вторая аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену. В конкретном варианте осуществления изобретения указанную аминокислотную замену выбирают из группы, включающей K35E, K35A, R38A, R38E, R38N, R38F, R38S, R38L, R38G, R38Y, R38W, F42L, F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, K43E, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R и Y45K. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная вторая аминокислотная мутация находится в положении, соответствующем остатку 42 или 45 человеческого IL-2. В конкретном варианте осуществления изобретения ука-

званная вторая аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R и Y45K. В более конкретном варианте осуществления изобретения указанная вторая аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену F42A или Y45A. В более конкретном варианте осуществления изобретения указанная вторая аминокислотная мутация находится в положении, соответствующем остатку 42 человеческого IL-2. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная вторая аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R и F42K. В более конкретном варианте осуществления изобретения указанная аминокислотная замена представляет собой F42A. В другом варианте осуществления изобретения указанная вторая аминокислотная мутация находится в положении, соответствующем остатку 45 человеческого IL-2. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная вторая аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R и Y45K. В более конкретном варианте осуществления изобретения указанная аминокислотная замена представляет собой Y45A. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 содержит третью аминокислотную мутацию, которая аннулирует или снижает аффинность мутантного полипептида IL-2 к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL-2 и сохраняет аффинность мутантного полипептида IL-2 к рецептору IL-2 с промежуточной аффинностью, в каждом случае по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. Указанная третья аминокислотная мутация находится в положении, отличном от положений указанных первой и второй аминокислотных мутаций. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная третья аминокислотная мутация находится в положении, выбранном из положений, соответствующих остаткам 35, 38, 42, 43 и 45 человеческого IL-2. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная третья аминокислотная мутация находится в положении, соответствующем остатку 42 или 45 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная третья аминокислотная мутация находится в положении, соответствующем остатку 42 человеческого IL-2. В другом варианте осуществления изобретения указанная третья аминокислотная мутация находится в положении, соответствующем остатку 45 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная третья аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену. В конкретном варианте осуществления изобретения указанную третью аминокислотную замену выбирают из группы, включающей K35E, K35A, R38A, R38E, R38N, R38F, R38S, R38L, R38G, R38Y, R38W, F42L, F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, K43E, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R и Y45K. В более конкретном варианте осуществления изобретения указанную аминокислотную замену выбирают из группы, включающей F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R и Y45K. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения указанная аминокислотная замена представляет собой F42A или Y45A. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная аминокислотная замена представляет собой F42A. В другом варианте осуществления изобретения указанная аминокислотная замена представляет собой Y45A. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 не содержит аминокислотную мутацию в положении, соответствующем остатку 38 человеческого IL-2.

Еще более конкретным объектом изобретения является мутантный полипептид IL-2, содержащий три аминокислотные мутации, которые аннулируют или снижают аффинность мутантного полипептида IL-2 к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL-2, но сохраняют аффинность мутантного полипептида IL-2 к рецептору IL-2 с промежуточной аффинностью. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные три аминокислотные мутации находятся в положениях, соответствующих остаткам 42, 45 и 72 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные три аминокислотные мутации представляют собой аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные три аминокислотные мутации представляют собой аминокислотные замены, выбранные из группы, включающей F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R и L72K. В конкретном варианте осуществления изобретения указанные три аминокислотные мутации представляют собой аминокислотные замены F42A, Y45A и L72G.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанные аминокислотные мутации снижают аффинность мутантного полипептида IL-2 к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL-2 по меньшей мере в 5 раз, в частности по меньшей мере в 10 раз, более конкретном по меньшей мере в 25 раз. В вариантах осуществления изобретения, в которых присутствует более одной аминокислотной мутации, которая снижает аффинность мутантного полипептида IL-2 к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL-2, комбинация указанных аминокислотных мутаций может снижать аффинность мутантного полипептида IL-2 к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL-2 по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 50 раз или даже по меньшей мере в 100 раз. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная аминокислотная мутация или комбинация аминокислотных мутаций аннулирует аффинность мутантного полипептида IL-2 к  $\alpha$ -субъединице рецептора

IL-2, в результате чего какое-либо связывание не удается обнаружить с помощью резонанса поверхностного плазмона, что будет описано ниже.

Считается, что достигается практически сходное связывание с рецептором с промежуточной аффинностью, т.е. сохранение аффинности мутантного полипептида IL-2 к указанному рецептору, когда для мутанта IL-2 характерна аффинность, составляющая более чем примерно 70% от аффинности формы дикого типа мутанта IL-2 к рецептору IL-2 с промежуточной аффинностью. Мутанты IL-2, предлагаемые в изобретении, могут характеризоваться аффинностью, составляющей более чем примерно 80% и даже более чем примерно 90% от указанной аффинности.

При создании изобретения было обнаружено, что уменьшение аффинности IL-2 к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL-2 в сочетании с элиминацией O-гликозилирования IL-2 позволяет получать белок IL-2 с улучшенными свойствами. Например, элиминация сайта O-гликозилирования позволяет получать более гомогенный продукт при экспрессии мутантного полипептида IL-2 в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO или HEK.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2, предлагаемый в изобретении, содержит дополнительную аминокислотную мутацию, которая элиминирует сайт O-гликозилирования IL-2 в положении, соответствующем остатку 3 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная дополнительная аминокислотная мутация, которая элиминирует сайт O-гликозилирования IL-2 в положении, соответствующем остатку 3 человеческого IL-2, представляет собой аминокислотную замену. Примерами аминокислотных замен являются T3A, T3G, T3Q, T3E, T3N, T3D, T3R, T3K и T3P. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная дополнительная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену T3A.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 представляет собой практически полноразмерную молекулу IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 представляет собой молекулу человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 содержит последовательность SEQ ID NO: 1 по меньшей мере с одной аминокислотной мутацией, которая аннулирует или снижает аффинность мутантного полипептида IL-2 к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL-2, но сохраняет аффинность мутантного полипептида IL-2 к рецептору IL-2 с промежуточной аффинностью по сравнению с полипептидом IL-2, который содержит SEQ ID NO: 1 без указанной мутации. В другом варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 содержит последовательность SEQ ID NO: 3 по меньшей мере с одной аминокислотной мутацией, которая аннулирует или снижает аффинность мутантного полипептида IL-2 к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL-2, но сохраняет аффинность мутантного полипептида IL-2 к рецептору IL-2 с промежуточной аффинностью по сравнению с полипептидом IL-2, который содержит SEQ ID NO: 3 без указанной мутации.

В конкретном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 может вызывать один или несколько клеточных ответов, выбранных из группы, включающей пролиферацию активированного Т-лимфоцита, дифференцировку активированного Т-лимфоцита, активность цитотоксической Т-клетки (CTL), пролиферацию активированной В-клетки, дифференцировку активированной В-клетки, пролиферацию естественной клетки-киллера (NK), дифференцировку NK-клетки, секрецию активированной Т-клетки или NK-клетки и противоопухолевую цитотоксичность NK/лимфокин-активированной клетки-киллера (LAK).

В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 обладает пониженной способностью индуцировать передачу сигналов IL-2 в регуляторных Т-клетках по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 индуцирует пониженную индуцированную активацией клеточную гибель (AICD) Т-клеток по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 обладает пониженным профилем токсичности *in vivo* по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 обладает пролонгированным временем полужизни в плазме по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа.

В частности, мутантный полипептид IL-2, предлагаемый в изобретении, содержит четыре аминокислотные замены в положениях, соответствующих остаткам 3, 42, 45 и 72 человеческого IL-2. Конкретные аминокислотные замены представляют собой T3A, F42A, Y45A и L72G. Как продемонстрировано в приведенных ниже примерах, указанный несущий четыре мутации (четырёхмутантный) полипептид IL-2 характеризуется не выявляемым уровнем связывания с CD25, пониженной способностью индуцировать апоптоз Т-клеток, пониженной способностью индуцировать передачу сигналов IL-2 в T<sub>reg</sub>-клетках и пониженным профилем токсичности *in vivo*. Однако он сохраняет способность активировать передачу сигналов IL-2 в эффекторных клетках, индуцировать пролиферацию эффекторных клеток и создание NK-клетками IFN- $\gamma$  в качестве вторичного цитокина.

Кроме того, указанный мутантный полипептид IL-2 обладает дополнительными предпочтительными свойствами, такими как пониженная гидрофобность поверхности, хорошая стабильность и высокий выход экспрессии, что описано в примерах. Неожиданно было установлено, что указанный мутантный



полипептид IL-2 обладает также пролонгированным временем полужизни в сыворотке по сравнению с IL-2 дикого типа.

Мутанты IL-2, предлагаемые в изобретении, помимо наличия мутаций в области IL-2, которая образует поверхность раздела между IL-2 и CD25, или в сайте гликозилирования, могут иметь также одну или несколько мутаций в аминокислотной последовательности, расположенной вне указанных областей. Такие дополнительные мутации в человеческом IL-2 могут обеспечивать дополнительные преимущества, такие как повышенный уровень экспрессии или стабильности. Например, цистеин в положении 125 можно заменять на нейтральную аминокислоту, такую как серин, аланин, треонин или валин, получая C125S IL-2, C125A IL-2, C125T IL-2 или C125V IL-2 соответственно, что описано в U.S. № 4518584. Как описано в указанном документе можно также изымать путем делеции N-концевой остаток аланина IL-2, получая такой мутант как des-A1 C125S или des-A1 C125A. Альтернативно этому или в дополнение к этому, мутант IL-2 может включать мутацию, при которой метионин, присутствующий в норме в положении 104 человеческого IL-2 дикого типа, заменен на нейтральную аминокислоту, такую как аланин (см. U.S. № 5206344). Образовавшиеся мутанты, например, des-A1 M104A IL-2, des-A1 M104A C125S IL-2, M104A IL-2, M104A C125A IL-2, des-A1 M104A C125A IL-2 или M104A C125S IL-2 (эти и другие мутанты описаны в U.S. № 5116943 и у Weiger и др., Eur J Biochem 180, 1989, сс. 295-300), можно применять в сочетании с конкретными мутациями IL-2, предлагаемыми в изобретении.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2, предлагаемый в изобретении, содержит дополнительную аминокислотную мутацию в положении, соответствующем остатку 125 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная дополнительная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену C125A.

Специалисту в данной области очевидно, как определять, какие дополнительные мутации могут обеспечивать дополнительные преимущества для целей изобретения. Например, должно быть очевидно, что аминокислотные мутации в последовательности IL-2, которые снижают или аннулируют аффинность IL-2 к рецептору IL-2 с промежуточной аффинностью, такие как D20T, N88R или Q126D (см., например, U.S. 2007/0036752), могут оказаться непригодными для включения в мутантный полипептид IL-2, предлагаемый в изобретении.

В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2, предлагаемый в изобретении, содержит последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 19. В конкретном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2, предлагаемый в изобретении, содержит последовательность SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 19. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2, предлагаемый в изобретении, содержит SEQ ID NO: 19.

Мутантные полипептиды IL-2, предлагаемые в изобретении, наиболее целесообразно применять в контексте слитых белков IL-2, таких как несущие IL-2 иммуноконъюгаты. Такие слитые белки содержат мутантный полипептид IL-2, предлагаемый в изобретении, слитый с не-IL-2-фрагментом. Не-IL-2-фрагмент может представлять собой синтетический или встречающийся в естественных условиях белок или его часть или вариант. Примерами не-IL-2-фрагментов являются альбумин, домены антител, такие как Fc-домены или антигенсвязывающие домены иммуноглобулинов.

Несущие IL-2 иммуноконъюгаты представляют собой слитые белки, содержащие антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент, представляющий собой IL-2. Они существенно повышают эффективность терапии на основе IL-2 в результате направленного переноса IL-2, например, в микроокружение опухоли. Согласно изобретению антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой полное антитело или иммуноглобулин или его часть или вариант, обладающий биологической функцией, такой как специфическая аффинность к связыванию антигена.

Преимущества терапии с использованием иммуноконъюгатов достаточно очевидны. Например, антигенсвязывающий фрагмент иммуноконъюгата распознает специфический для опухоли эпитоп, и это приводит к направленному переносу молекулы иммуноконъюгата к области опухоли. При этом можно обеспечивать высокие концентрации IL-2 в микроокружении опухоли, что позволяет достигать активации и пролиферации различных иммунных эффекторных клеток, указанных в настоящем описании, при использовании существенно более низкой дозы иммуноконъюгата, по сравнению с требуемой для неконъюгированного IL-2. Кроме того, указанное применение IL-2 в форме иммуноконъюгатов позволяет снижать дозы самого цитокина, ограничивая тем самым потенциальное проявление нежелательных побочных действий IL-2, а направленный перенос IL-2 к специфической области в организме с помощью иммуноконъюгата может приводить также к снижению системной экспозиции и в результате к уменьшенным побочным воздействиям по сравнению с получаемыми при использовании неконъюгированного IL-2. Кроме того, удлинение времени полужизни иммуноконъюгата в циркуляторном русле по сравнению с неконъюгированным IL-2 важно для эффективности иммуноконъюгата. Однако эта характеристика содержащих IL-2 иммуноконъюгатов может вновь усугублять потенциальные побочные действия молекулы IL-2: поскольку при существенно удлиненном времени полужизни циркулирующего в кровотоке иммуноконъюгата, содержащего IL-2, относительно неконъюгированного IL-2 возрастает вероятность того, что IL-2 или другие компоненты молекулы слитого белка будут активировать компоненты, которые

обычно присутствуют в сосудистой сети. Это относится также и к другим слитым белкам, которые содержат IL-2, слитый с другим фрагментом, таким как Fc или альбумин, приводящим к удлинению времени полужизни IL-2 в циркуляторном русле. По этой причине иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид IL-2, предлагаемый в изобретении, с пониженной токсичностью по сравнению с формами IL-2 дикого типа является наиболее предпочтительным.

Таким образом, изобретение относится также к мутантному полипептиду IL-2, описанному выше, который сцеплен по меньшей мере с одним не-IL-2-фрагментом. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 и не-IL-2-фрагмент образуют слитый белок, т.е. мутантный полипептид IL-2 объединен пептидной связью с не-IL-2-фрагментом. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 сцеплен с первым и вторым не-IL-2-фрагментом. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 объединен амино- или карбокси-концевой пептидной связью с первым антигенсвязывающим фрагментом, а второй антигенсвязывающий фрагмент объединен амино- или карбокси-концевой пептидной связью либо I) с мутантным полипептидом IL-2, либо II) с первым антигенсвязывающим фрагментом. В конкретном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 объединен карбокси-концевой пептидной связью с указанным первым не-IL-2-фрагментом и аминоконцевой пептидной связью с указанным вторым не-IL-2-фрагментом. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный не-IL-2-фрагмент представляет собой обеспечивающий направленный перенос фрагмент. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный не-IL-2-фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент (образуя, тем самым, иммуноконъюгат с мутантным полипептидом IL-2, который описан более подробно ниже). В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или фрагмент антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полноразмерное антитело. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу иммуноглобулина, в частности молекулу иммуноглобулина класса IgG, более предпочтительно молекулу иммуноглобулина подкласса IgG<sub>1</sub>. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 объединен аминоконцевой пептидной связью с одной из тяжелых цепей иммуноглобулина. В другом варианте осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающий домен антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела. В более конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу Fab или молекулу scFv. В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу Fab. В другом варианте осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу scFv. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент направлен к антигену, присутствующему на опухолевой клетке или в окружении опухолевой клетки. В предпочтительном варианте осуществления изобретения антиген выбран из группы, включающей белок активации фибробластов (FAP), A1-домен тенасцина-C (TNC A1), A2-домен тенасцина-C (TNC A2), экстра-домен В фибронектина (EDB), карциноэмбриональный антиген (CEA) и ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP). Если мутантный полипептид IL-2 сцеплен более чем с одним антигенсвязывающим фрагментом, например, первым и вторым антигенсвязывающим фрагментом, то каждый антигенсвязывающий фрагмент можно независимо выбирать из различных форм антител или фрагментов антител. Например, первый антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой молекулу Fab, а второй антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой молекулу scFv. В конкретном варианте осуществления изобретения каждый из указанных первого и второго антигенсвязывающего фрагмента представляет собой молекулу scFv или каждый из указанных первого и второго антигенсвязывающего фрагмента представляет собой молекулу Fab. В конкретном варианте осуществления изобретения каждый из указанных первого и второго антигенсвязывающего фрагмента представляет собой молекулу Fab. Аналогично этому, если мутантный полипептид IL-2 сцеплен более чем с одним антигенсвязывающим фрагментом, например первым и вторым антигенсвязывающим фрагментом, то антиген, к которому направлен каждый антигенсвязывающий фрагмент, можно выбирать независимо друг от друга. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный первый и второй антигенсвязывающие фрагменты направлены к различным антигенам. В другом варианте осуществления изобретения указанный первый и второй антигенсвязывающие фрагменты направлены к одному и тому же антигену. Как описано выше, антиген предпочтительно представляет собой антиген, присутствующий на опухолевой клетке или в окружении опухолевой клетки, более предпочтительно антиген выбран из группы, включающей белок активации фибробластов (FAP), A1-домен тенасцина-C (TNC A1), A2-домен тенасцина-C (TNC A2), экстра-домен В фибронектина (EDB), карциноэмбриональный антиген (CEA) и ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP). Антигенсвязывающая область может дополнительно включать любые особенности, индивидуально или в сочетании друг с другом, которые описаны касательно антигенсвязывающих доменов иммуноконъюгатов.

### Иммуноконъюгаты

Конкретным объектом изобретения является иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид IL-2, который несет одну или несколько аминокислотных мутаций, аннулирующих или снижающих аффинность мутантного полипептида IL-2 к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL-2 и сохраняют аффинность мутантного полипептида IL-2 к рецептору IL-2 с промежуточной аффинностью, и по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация, которая аннулирует или снижает аффинность мутантного полипептида IL-2 к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL-2 и сохраняет аффинность мутантного полипептида IL-2 к рецептору IL-2 с промежуточной аффинностью, находится в положении, выбранном из положения, соответствующего остатку 42, 45 и 72 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R и L72K, более конкретно аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей F42A, Y45A и L72G. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация находится в положении, соответствующем остатку 42 человеческого IL-2. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R и F42. И в еще более конкретном варианте осуществления изобретения аминокислотная замена представляет собой F42A. В другом варианте осуществления изобретения аминокислотная мутация находится в положении, соответствующем остатку 45 человеческого IL-2. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R и Y45K. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения аминокислотная замена представляет собой Y45A. В следующем варианте осуществления изобретения аминокислотная мутация находится в положении, соответствующем остатку 72 человеческого IL-2. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R и L72K. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения указанная аминокислотная замена представляет собой L72G. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2, предлагаемый в изобретении, не содержит аминокислотную мутацию в положении, соответствующем остатку 38 человеческого IL-2. В конкретном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2, входящий в иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит, по меньшей мере, первую и вторую аминокислотную мутацию, которая аннулирует или снижает аффинность мутантного полипептида IL-2 к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL-2 и сохраняет аффинность мутантного полипептида IL-2 к рецептору IL-2 с промежуточной аффинностью. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные первая и вторая аминокислотные мутации находятся в двух положениях, выбранных из положений, которые соответствуют остаткам 42, 45 и 72 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные первая и вторая аминокислотные мутации представляют собой аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные первая и вторая аминокислотные мутации представляют собой аминокислотные замены, выбранные из группы, включающей F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R и L72K. В конкретном варианте осуществления изобретения указанные первая и вторая аминокислотные мутации представляют собой аминокислотные замены, выбранные из группы, включающей F42A, Y45A и L72G. Мутантный полипептид IL-2 может также включать любые особенности, индивидуально или в сочетании, описанные в предыдущих параграфах касательно мутантных полипептидов IL-2, предлагаемых в изобретении. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный мутантный полипептид IL-2 объединен амино- или карбоксиконцевой пептидной связью с указанным антигенсвязывающим фрагментом, который входит в иммуноконъюгат, т.е. иммуноконъюгат представляет собой слитый белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающий домен антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи антитела и вариабельную область легкой цепи антитела. Антигенсвязывающая область может дополнительно включать любые особенности, индивидуально или в сочетании друг с другом, которые описаны касательно антигенсвязывающих доменов.

### Форматы иммуноконъюгатов

Наиболее приемлемые форматы иммуноконъюгатов описаны в публикации PCT WO 2011/020783, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Такие иммуноконъюгаты содержат по меньшей мере два антигенсвязывающих домена. Таким образом, согласно одному из вариантов

осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит, по меньшей мере, первый мутантный полипептид IL-2, представленный в настоящем описании, и, по меньшей мере, первый и второй антигенсвязывающие фрагменты. В конкретном варианте осуществления изобретения указанные первый и второй антигенсвязывающие фрагменты независимо выбраны из группы, включающей молекулу Fv, в частности, молекулу scFv, и молекулу Fab. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный первый мутантный полипептид IL-2 объединен аминоконцевой пептидной связью с первым антигенсвязывающим фрагментом, а второй антигенсвязывающий фрагмент объединен аминоконцевой пептидной связью либо I) с мутантным полипептидом IL-2, либо II) с первым антигенсвязывающим фрагментом. В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат практически состоит из первого мутантного полипептида IL-2 и первого и второго антигенсвязывающих фрагментов, сцепленных с помощью одной или нескольких линкерных последовательностей. Указанные форматы обладают преимуществом, заключающимся в том, что они связываются с высокой аффинностью с антигеном-мишенью (таким как опухолевый антиген), но характеризуются лишь мономерным связыванием с рецептором IL-2, что позволяет избежать направленного переноса иммуноконъюгата к несущим рецептор IL-2 иммунным клеткам, расположенным в областях, отличных от сайта-мишени. В конкретном варианте осуществления изобретения первый мутантный полипептид IL-2 объединен карбоксиконцевой пептидной связью с первым антигенсвязывающим фрагментом и дополнительно объединен аминоконцевой пептидной связью со вторым антигенсвязывающим фрагментом. В другом варианте осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент объединен карбоксиконцевой пептидной связью с первым мутантным полипептидом IL-2 и дополнительно объединен аминоконцевой пептидной связью со вторым антигенсвязывающим фрагментом. В другом варианте осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент объединен аминоконцевой пептидной связью с первым мутантным полипептидом IL-2 и дополнительно объединен карбоксиконцевой пептидной связью со вторым антигенсвязывающим фрагментом. В конкретном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 объединен карбоксиконцевой пептидной связью с первой вариательной областью тяжелой цепи и дополнительно объединен аминоконцевой пептидной связью со второй вариательной областью тяжелой цепи. В другом варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 объединен карбоксиконцевой пептидной связью с первой вариательной областью легкой цепи и дополнительно объединен аминоконцевой пептидной связью со второй вариательной областью легкой цепи. В другом варианте осуществления изобретения первая вариательная область тяжелой или легкой цепи сцеплена карбоксиконцевой пептидной связью с первым мутантным полипептидом IL-2 и дополнительно сцеплена аминоконцевой пептидной связью со второй вариательной областью тяжелой или легкой цепи. В другом варианте осуществления изобретения первая вариательная область тяжелой или легкой цепи сцеплена аминоконцевой пептидной связью с первым мутантным полипептидом IL-2 и дополнительно сцеплена карбоксиконцевой пептидной связью со второй вариательной областью тяжелой или легкой цепи. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 объединен карбоксиконцевой пептидной связью с тяжелой или легкой цепью первого Fab и дополнительно объединен аминоконцевой пептидной связью с тяжелой или легкой цепью второго Fab. В другом варианте осуществления изобретения тяжелая или легкая цепь первого Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с первым мутантным полипептидом IL-2 и дополнительно объединена аминоконцевой пептидной связью с тяжелой или легкой цепью второго Fab. В другом варианте осуществления изобретения тяжелая или легкая цепь первого Fab объединена аминоконцевой пептидной связью с первым мутантным полипептидом IL-2 и дополнительно объединена карбоксиконцевой пептидной связью с тяжелой или легкой цепью второго Fab. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере первый мутантный полипептид IL-2, объединенный аминоконцевой пептидной связью с одной или несколькими молекулами scFv, и дополнительно объединенный карбоксиконцевой пептидной связью с одной или несколькими молекулами scFv.

Другие наиболее приемлемые форматы иммуноконъюгатов содержат молекулу иммуноглобулина в качестве антигенсвязывающего фрагмента. В одном из таких вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один мутантный полипептид IL-2, представленный в настоящем описании, и молекулу иммуноглобулина, в частности молекулу IgG, более предпочтительно молекулу IgG<sub>1</sub>. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит не более одного мутантного полипептида IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения молекула иммуноглобулина представляет собой человеческий иммуноглобулин. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 объединен аминоконцевой пептидной связью с молекулой иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат практически состоит из мутантного полипептида IL-2 и молекулы иммуноглобулина, в частности молекулы IgG, более предпочтительно молекулы IgG<sub>1</sub>, которые сцеплены с помощью одной или нескольких линкерных последовательностей. В конкретном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 сцеплен на его аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина. В конкретных вариантах осуществления изобретения молекула иммуноглобулина содержит в Fc-домене модификацию, усиливающую гетеродимеризацию двух неидентич-

ных тяжелых цепей иммуноглобулина. Сайт наиболее сильного белок-белкового взаимодействия двух полипептидных цепей Fc-домена человеческого IgG находится в СНЗ-доме Fc-домена. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация находится в СНЗ-доме Fc-домена. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная модификация представляет собой модификацию типа "knob-in-hole" (типа "выступ-впадина"), которая включает модификацию, приводящую к образованию выступа в одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, и модификацию, приводящую к образованию впадины в другой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина. Технология "knob-into-hole" описана, например, в U.S. № 5731168; U.S. № 7695936; у Ridgway и др., Prot Eng 9, 1996, сс. 617-621 и Carter, J Immunol Meth 248, 2001, сс. 7-15). В целом, метод включает интродукцию выпуклости ("выступ") на поверхности раздела первого полипептида и соответствующей полости ("впадина") на поверхности раздела второго полипептида, в результате выпуклость может помещаться в полость, усиливая таким образом образование гетеродимера и препятствуя образованию гомодимера. Выпуклости создают путем замены аминокислот с небольшими боковыми цепями на поверхности раздела первого полипептида на аминокислоты с более крупными боковыми цепями (например, на тирозин или триптофан). Компенсирующие полости идентичного или сходного размера с выпуклостями создают на поверхности раздела второго полипептида путем замены аминокислот с крупными боковыми цепями на аминокислоты с менее крупными боковыми цепями (например, аланин или треонин). Выпуклость и полость можно создавать путем изменения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды, например, с помощью сайт-направленного мутагенеза или посредством синтеза пептидов. В конкретном варианте осуществления изобретения модификация, приводящая к получению "выступа", представляет собой аминокислотную замену T366W в одной из двух тяжелых цепей иммуноглобулина, а модификация, приводящая к получению "впадины", представляет собой аминокислотные замены T366S, L368A и Y407V в другой одной из двух тяжелых цепей иммуноглобулина. В более конкретном варианте осуществления изобретения тяжелая цепь иммуноглобулина, содержащая модификацию, приводящую к получению "выступа", дополнительно содержит аминокислотную замену S354C, а тяжелая цепь иммуноглобулина, содержащая модификацию, приводящую к получению "впадины", дополнительно содержит аминокислотную замену Y349C. Интродукция этих двух остатков цистеина приводит к образованию дисульфидного мостика между двумя тяжелыми цепями, дополнительно стабилизирующего димер (Carter, J Immunol Methods 248, 2001, сс. 7-15).

В конкретном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 сцеплен с карбоксиконцевой аминокислотой тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащей модификацию, приводящую к получению "выступа".

В альтернативном варианте осуществления изобретения модификация, усиливающая гетеродимеризацию двух неидентичных полипептидных цепей, представляет собой модификацию, опосредующую определяемые электростатическим действием воздействия, например, описанные в публикации PCT WO 2009/089004. В целом, указанный метод включает замену одного или нескольких аминокислотных остатков на поверхности раздела двух полипептидных цепей на заряженные аминокислотные остатки, в результате чего образование гомодимера становится электростатически невыгодным, а гетеродимеризация становится электростатически выгодной.

Fc-домен придает иммуноконъюгату предпочтительные фармакокинетические свойства, включая удлиненное время полужизни в сыворотке, что обуславливает достаточное накопление в ткани-мишени и предпочтительное соотношение распределения в ткани-крови. Однако в то же время это может приводить к нежелательному направленному переносу иммуноконъюгата к клеткам, экспрессирующим Fc-рецепторы, а не к предпочтительным несущим антиген клеткам. Кроме того, совместная активация путей передачи сигналов Fc-рецептора может приводить к высвобождению цитокинов, которые в сочетании с полипептидом IL-2 и имеющим продолжительное время полужизни иммуноконъюгатом приводят к избыточной активации рецепторов цитокинов и приводят к серьезным побочным действиям при системном введении. В соответствии с этим описано, что с иммуноконъюгатами, содержащими канонический IgG-IL-2, связаны реакции на инфузию (см., например, King и др., J Clin Oncol 22, 2004, сс. 4463-4473)).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения молекулу иммуноглобулина, которая входит в иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, создают так, чтобы она обладала пониженной аффинностью связывания с Fc-рецептором. В одном из таких вариантов осуществления изобретения иммуноглобулин содержит в его Fc-доме одну или несколько аминокислотных мутаций, которые снижают аффинность связывания иммуноконъюгата с Fc-рецептором. Как правило, одна или несколько одинаковых аминокислотных мутаций присутствуют в каждой из двух тяжелых цепей иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные аминокислотные мутации снижают аффинность связывания иммуноконъюгата с Fc-рецептором по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз или по меньшей мере в 10 раз. Согласно вариантам осуществления изобретения, в которых имеет место одной аминокислотной мутации, которые снижают аффинность связывания иммуноконъюгата с Fc-рецептором, комбинация указанных аминокислотных мутаций может снижать аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз или по меньшей мере в 50 раз. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат, содержащий

сконструированную молекулу иммуноглобулина, характеризуется менее чем 20%, в частности, менее чем 10%, более предпочтительно менее чем 5% от аффинности связывания с Fc-рецептором, характерной для иммуноконъюгата, содержащего несконструированную молекулу иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой Fc $\gamma$ RIIIa-рецептор, более конкретно Fc $\gamma$ RIIIa-, Fc $\gamma$ RI- или Fc $\gamma$ RIIIa-рецептор. Предпочтительно уменьшается связывание с каждым из этих рецепторов. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения снижается также аффинность связывания с компонентом системы комплемента, в частности аффинность связывания с C1q. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения не снижается аффинность связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Практически такое же связывание с FcRn, т.е. сохранение аффинности связывания иммуноглобулина с указанным рецептором, достигается, когда иммуноглобулин (или иммуноконъюгат, содержащий указанный иммуноглобулин) характеризуется аффинностью связывания с FcRn, составляющей более чем примерно 70% от аффинности связывания с FcRn несконструированной формы иммуноглобулина (или иммуноконъюгата, содержащего несконструированную форму иммуноглобулина). Иммуноглобулины или иммуноконъюгаты, содержащие указанные иммуноглобулины, могут характеризоваться аффинностью более чем примерно 80% и даже более чем примерно 90% от указанной выше аффинности. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноглобулин содержит аминокислотную замену в положении P329 тяжелой цепи иммуноглобулина (нумерация по Кэботу). В более конкретном варианте осуществления изобретения аминокислотная замена представляет собой P329A или P329G, в частности P329G. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноглобулин содержит дополнительную аминокислотную замену в положении, выбранном из S228, E233, L234, L235, N297 и P331 тяжелой цепи иммуноглобулина. В более конкретном варианте осуществления изобретения дополнительная аминокислотная замена представляет собой S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D или P331S. В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноглобулин содержит аминокислотные замены в положениях P329, L234 и L235 тяжелой цепи иммуноглобулина. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноглобулин содержит аминокислотные мутации L234A, L235A и P329G (LALA P329G). Такая комбинация аминокислотных замен практически полностью аннулирует связывание с Fc $\gamma$ RIIIa-рецептором молекулы человеческого IgG и в результате снижает эффекторную функцию, включая антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC).

В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит один или несколько сайтов протеолитического расщепления, локализованных между мутантным полипептидом IL-2 и антигенсвязывающими фрагментами.

Компоненты иммуноконъюгата (например, антигенсвязывающие фрагменты и/или мутантный полипептид IL-2) могут быть сцеплены непосредственно или через различные линкеры, в частности пептидные линкеры, содержащие одну или несколько аминокислот, как правило, примерно 2-20 аминокислот, которые представлены в настоящем описании или известны в данной области. Приемлемыми неиммуногенными линкерными пептидами являются, например, линкерные пептиды (G4S)<sub>n</sub>, (SG4)<sub>n</sub> или G4(SG4)<sub>n</sub>, в которых n обозначает число, как правило, от 1 до 10, как правило, от 2 до 4.

#### **Антигенсвязывающие фрагменты**

Антигенсвязывающий фрагмент иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, как правило, представляет собой молекулу полипептида, которая связывается со специфической антигенной детерминантой и обладает способностью направлять субстанцию, с которой она соединена (например, мутантный полипептид IL-2 или второй антигенсвязывающий фрагмент) к сайту-мишени, например к конкретному типу опухолевой клетки или стромы опухоли, которая несет антигенную детерминанту. Иммуноконъюгат может связываться с антигенной детерминантой, например, присутствующей на поверхности опухолевых клеток, на поверхности инфицированных вирусом клеток, на поверхности других больных клеток, находящейся в свободном состоянии в сыворотке крови и/или во внеклеточном матриксе (ECM).

Примерами опухолевых антигенов являются (но не ограничиваясь только ими) MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, дипептидилпептидаза IV (DPPIV), белок, связывающий аденозиндеаминазу (ADA), циклофилин b, антиген, ассоциированный с колоректальным раком (CRC)-C017-1A/GA733, карциноэмбриональный антиген (CEA) и его иммуногенные эпитопы CAP-1 и CAP-2, etv6, am11, простатический антиген (PSA) и его иммуногенные эпитопы PSA-1, PSA-2 и PSA-3, простатический специфический мембранный антиген (PSMA), T-клеточный рецептор/CD3-зета-цепь, семейство MAGE опухолевых антигенов (например, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), семейство GAGE опухолевых антигенов (например, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, тирозиназа, p53, семейство MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1,  $\alpha$ -фетопротейн, E-кадгерин,  $\alpha$ -катенин,  $\beta$ -катенин и  $\gamma$ -катенин,

p120ctn, gp100 Pmel117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, белок аденоматозного полипоза coli (APC), фодрин, коннексин 37, Ig-идиотип, p 15, gp75, ганглиозиды GM2 и GD2, вирусные продукты, такие как белки человеческого вируса папилломы, семейство Smad опухолевых антигенов, Imp-1, P1A, кодируемый EBV ядерный антиген (EBNA)-1, гликогенфосфолипаза головного мозга, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 и CT-7 и c-erbB-2.

Примерами вирусных антигенов являются (но не ограничиваясь только ими) гемагглютинин вируса гриппа, LMP-1 вируса Эпштейна-Барра, гликопротеин вируса гепатита С E2, gp160 ВИЧ и gp120 ВИЧ.

Примерами антигенов ЕСМ являются (но не ограничиваясь только ими) синдекан, гепараназа, интегрины, остеопонтин, белки семейства link, кадхерины, ламинин, ламинин типа EGF, лектин, фибронектин, белки семейства notch, тенасцин и матриксин.

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно связывать со следующими специфическими антигенами клеточной поверхности, включающими (но не ограничиваясь только ими): FAP, Her2, EGFR, IGF-1R, CD2 (поверхностный антиген Т-клеток), CD3 (гетеромультимер, ассоциированный с TCR), CD22 (В-клеточный рецептор), CD23 (низкоаффинный IgE-рецептор), CD30 (цитокининовый рецептор), CD33 (поверхностный антиген клеток миелоидного ряда), CD40 (рецептор фактора некроза опухоли), IL-6R (IL6-рецептор), CD20, MCSP и PDGFPR (рецептор тромбоцитарного фактора роста  $\beta$ ).

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, где каждый из этих антигенсвязывающих фрагментов специфически связывается с одной и той же антигенной детерминантой. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, содержит два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, где каждый из этих антигенсвязывающих фрагментов специфически связывается с различными антигенными детерминантами.

Антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой антитело любого типа или его фрагмент, который сохраняет специфичность связывания с антигенной детерминантой. Фрагменты антитела включают (но не ограничиваясь только ими)  $V_H$ -фрагменты,  $V_L$ -фрагменты, Fab-фрагменты,  $F(ab)_2$ -фрагменты, scFv-фрагменты, Fv-фрагменты, минитела (минибоди), димерные антитела, тримерные антитела и тетрамерные антитела (см., например, Hudson and Souriau, Nature Med 9, 2003, сс. 129-134).

Наиболее приемлемые антигенсвязывающие фрагменты описаны в публикации РСТ WO 2011/020783, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые являются специфическими для экстра-домена В фибронектина (EDB). В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые могут конкурировать с моноклональным антителом L19 за связывание с эпитопом EDB (см., например, публикацию РСТ WO 2007/128563 A1, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь первого Fab, полученного из моноклонального антитела L19, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2, который в свою очередь объединен карбоксиконцевой пептидной связью с тяжелой цепью второго Fab, полученного из моноклонального антитела L19. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой легкая цепь первого Fab, полученного из моноклонального антитела L19, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2, который в свою очередь объединен карбоксиконцевой пептидной связью с легкой цепью второго Fab, полученного из моноклонального антитела L19. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой первый scFv, полученный из моноклонального антитела L19, объединен карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2, который в свою очередь объединен карбоксиконцевой пептидной связью со вторым scFv, полученным из моноклонального антитела L19.

В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 199 или ее вариант, который сохраняет функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит легкую цепь Fab, полученного из моноклонального антитела L19. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 201 или ее варианту, который сохраняет функциональность. В еще одном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит две полипептидные последовательности, которые по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны SEQ ID NO: 199 и SEQ ID NO: 201 или их вариантам, которые сохраняют функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, дисульфидным мостиком.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые являются специфическими в отношении A1-домена тенасцина (TNC-A1). В другом ва-

рианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые могут конкурировать с моноклональным антителом F16 за связывание с эпитопом TNC-A1 (см., например, публикацию PCT WO 2007/128563 A1, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые являются специфическими в отношении A1- и/или A4-домена тенасцина (TNC-A1 или TNC-A4, или TNC-A1/A4). В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь первого Fab, специфического в отношении A1-домена тенасцина, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2, который в свою очередь объединен карбоксиконцевой пептидной связью с тяжелой цепью второго Fab, специфического в отношении A1-домена тенасцина. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой легкая цепь первого Fab, специфического в отношении A1-домена тенасцина, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2, который в свою очередь объединен карбоксиконцевой пептидной связью с легкой цепью второго Fab, специфического в отношении A1-домена тенасцина. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой первый scFv, специфический в отношении A1-домена тенасцина, объединен карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2, который в свою очередь объединен карбоксиконцевой пептидной связью со вторым scFv, специфическим в отношении A1-домена тенасцина. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь иммуноглобулина, специфического в отношении TNC-A1, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2.

В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична либо SEQ ID NO: 33, либо SEQ ID NO: 35 или их вариантам, сохраняющим функциональность. В другом варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична либо SEQ ID NO: 29, либо SEQ ID NO: 31 или их вариантам, сохраняющим функциональность. В более конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична либо SEQ ID NO: 33, либо SEQ ID NO: 35 или их вариантам, сохраняющим функциональность, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична либо SEQ ID NO: 29, либо SEQ ID NO: 31 или их вариантам, сохраняющим функциональность.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична либо SEQ ID NO: 34, либо SEQ ID NO: 36. Еще в одном конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью либо SEQ ID NO: 34, либо SEQ ID NO: 36. В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична либо SEQ ID NO: 30, либо SEQ ID NO: 32. Еще в одном конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью либо SEQ ID NO: 30, либо SEQ ID NO: 32.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 203 или ее вариантам, сохраняющим функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична либо SEQ ID NO: 205, либо SEQ ID NO: 215 или их вариантам, сохраняющим функциональность. Еще в одном конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична либо SEQ ID NO: 207, либо SEQ ID NO: 237 или их вариантам, сохраняющим функциональность. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит две полипептидные последовательности, которые по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны SEQ ID NO: 205 и SEQ ID NO: 207 или их вариантам, сохраняющим функциональность. В другом конкретном варианте осуществ-



ления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит две полипептидные последовательности, которые по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны SEQ ID NO: 215 и SEQ ID NO: 237 или их вариантам, сохраняющим функциональность.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 204. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 204. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97%, 98%, от 99% идентична либо SEQ ID NO: 206, либо SEQ ID NO: 216. В еще одном конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью либо SEQ ID NO: 206, либо SEQ ID NO: 216. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична либо SEQ ID NO: 208, либо SEQ ID NO: 238. Еще в одном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью либо SEQ ID NO: 208, либо SEQ ID NO: 238.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые являются специфическими в отношении A2-домена теназина (TNC-A2). В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь первого Fab, специфического в отношении A2-домена теназина, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2, который в свою очередь объединен карбоксиконцевой пептидной связью с тяжелой цепью второго Fab, специфического в отношении A2-домена теназина. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой легкая цепь первого Fab, специфического в отношении A2-домена теназина, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2, который в свою очередь объединен карбоксиконцевой пептидной связью с легкой цепью второго Fab, специфического в отношении A2-домена теназина. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь иммуноглобулина, специфического в отношении TNC-A2, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2.

В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность варибельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 183 и SEQ ID NO: 187, или их вариантам, сохраняющим функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность варибельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 181 и SEQ ID NO: 185, или их вариантам, сохраняющим функциональность. В более конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность варибельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 183 и SEQ ID NO: 187, или их вариантам, сохраняющим функциональность, и последовательность варибельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 181 и SEQ ID NO: 185 или их вариантам, сохраняющим функциональность.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность варибельной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 184 и SEQ ID NO: 188. Еще в одном конкретном варианте осуществления изобретения последовательность варибельной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 184 и SEQ ID NO: 188. В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность варибельной

области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 182 и SEQ ID NO: 186. Еще в одном конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 182 и SEQ ID NO: 186.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержат полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 243 и SEQ ID NO: 245, или их вариантам, сохраняющим функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 249 и SEQ ID NO: 251, или их вариантам, сохраняющим функциональность. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 243 и SEQ ID NO: 245, или их вариантам, сохраняющим функциональность, и полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 249 и SEQ ID NO: 251, или их вариантам, сохраняющим функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит две полипептидные последовательности, которые по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны SEQ ID NO: 241 и либо SEQ ID NO: 249, либо SEQ ID NO: 251, или их вариантам, сохраняющим функциональность. Еще в одном конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит две полипептидные последовательности, которые по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны SEQ ID NO: 243 и либо SEQ ID NO: 247, либо SEQ ID NO: 249, или их вариантам, сохраняющим функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит две полипептидные последовательности, которые по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны SEQ ID NO: 245 и SEQ ID NO: 247, или их вариантам, сохраняющим функциональность.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 244 и SEQ ID NO: 246. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 244 и SEQ ID NO: 246. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 250 и SEQ ID NO: 252. Еще в одном конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 250 и SEQ ID NO: 252.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или более количество антигенсвязывающих фрагментов, специфических в отношении фибробласт-активирующего белка (FAP). В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь первого Fab, специфического в отношении FAP, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2, который в свою очередь объединен карбоксиконцевой пептидной связью с тяжелой цепью второго Fab, специфического в отношении FAP. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой легкая цепь первого Fab, специфического в отношении FAP, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2, который в свою очередь объединен карбоксиконцевой пептидной связью с легкой цепью второго Fab, специфического в отношении FAP. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь иммуноглобулина, специфического в отношении FAP, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2.











ID NO: 312. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 312.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 319 или ее вариантам, сохраняющим функциональность. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 321 или ее вариантам, сохраняющим функциональность. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 323 или ее вариантам, сохраняющим функциональность. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 319 или ее вариантам, сохраняющим функциональность, полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 319 или ее вариантам, сохраняющим функциональность, и полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 323 или ее вариантам, сохраняющим функциональность.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 320. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 320. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 322. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 322. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 324. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 324.

Антигенсвязывающие фрагменты, предлагаемые в изобретении, включают фрагменты, имеющие последовательности, которые по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны пептидным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 23-261 (нечетные номера), 297-303 (нечетные номера), 311 и 313, включая их функциональные фрагменты или варианты. Изобретение относится также к антигенсвязывающим фрагментам, содержащим последовательности SEQ ID NO: 23-261 (нечетные номера), 297-303 (нечетные номера), 311 и 313 с консервативными аминокислотными заменами.

#### **Полинуклеотиды**

Изобретение относится также к выделенным полинуклеотидам, кодирующим мутантный полипептид IL-2 или иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид IL-2, которые представлены в настоящем описании.

Полинуклеотиды, предлагаемые в изобретении, включают полинуклеотиды, которые по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 24-262 (четные номера), 293-296 и 298-324 (четные номера), включая их функциональные фрагменты или варианты.

Полинуклеотиды, кодирующие мутантные полипептиды IL-2, не сцепленные с не-IL-2-фрагментом, как правило, экспрессируются в виде индивидуального полинуклеотида, кодирующего полный полипептид.

Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий мутантный полипептид IL-2, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует последовательность SEQ ID NO: 7, 11, 15 или 19 мутантного IL-2. Изобретение относится также к выделенному полинуклеотиду, кодирующему мутантный полипептид IL-2, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует последовательность SEQ ID NO: 7, 11, 15 или 19 мутантного IL-2 с консервативными аминокислотными заменами.

Другим вариантом осуществления изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий мутантный полипептид IL-2, где полинуклеотид содержит последовательность, которая по меньшей мере



примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 295 и SEQ ID NO: 296. Другим вариантом осуществления изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий мутантный полипептид IL-2, где полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 295 и SEQ ID NO: 296. Другим вариантом осуществления изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 295 и SEQ ID NO: 296. Другим вариантом осуществления изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 295 и SEQ ID NO: 296.

Полинуклеотиды, кодирующие иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, могут экспрессироваться в виде индивидуального полинуклеотида, который кодирует полный иммуноконъюгат, или в виде нескольких (например, двух или нескольких) полинуклеотидов, которые экспрессируются совместно. Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, которые совместно экспрессируются, могут быть связаны посредством, например, дисульфидных мостиков или других средств, с образованием функционального иммуноконъюгата. Например, область тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента может кодироваться полинуклеотидом, отличным от полинуклеотида, кодирующего часть иммуноконъюгата, содержащую область легкой цепи антигенсвязывающего фрагмента и мутантный полипептид IL-2. При совместной экспрессии полипептиды тяжелой цепи должны быть ассоциированы с полипептидами легкой цепи с образованием антигенсвязывающего фрагмента. Альтернативно этому, в другом примере область легкой цепи антигенсвязывающего фрагмента может кодироваться полинуклеотидом, отличным от полинуклеотида, кодирующего часть иммуноконъюгата, содержащую область тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента и мутантный полипептид IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует фрагмент иммуноконъюгата, содержащий мутантный полипептид IL-2 и антигенсвязывающий фрагмент. В одном из вариантов осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует тяжелую цепь антигенсвязывающего фрагмента и мутантный полипептид IL-2. В другом варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует легкую цепь антигенсвязывающего фрагмента и мутантный полипептид IL-2.

В конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует фрагмент иммуноконъюгата, содержащий по меньшей мере один мутантный полипептид IL-2, и по меньшей мере один, предпочтительно два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, где первый мутантный полипептид IL-2 объединен аминокислотной связью с первым антигенсвязывающим фрагментом, а второй антигенсвязывающий фрагмент объединен аминокислотной связью либо с первым мутантным полипептидом IL-2, либо с первым антигенсвязывающим фрагментом. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты независимо друг от друга выбраны из группы, включающей молекулу Fv, в частности, молекулу scFv, и молекулу Fab. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид кодирует тяжелые цепи двух антигенсвязывающих фрагментов и один мутантный полипептид IL-2. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид кодирует легкие цепи двух антигенсвязывающих фрагментов и один мутантный полипептид IL-2. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид кодирует одну легкую цепь одного из антигенсвязывающих фрагментов, одну тяжелую цепь второго антигенсвязывающего фрагмента и один мутантный полипептид IL-2.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует фрагмент иммуноконъюгата, при этом полинуклеотид кодирует тяжелые цепи двух молекул Fab и мутантный полипептид IL-2. В другом конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует фрагмент иммуноконъюгата, при этом полинуклеотид кодирует легкие цепи двух молекул Fab и мутантный полипептид IL-2. В другом конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует фрагмент иммуноконъюгата, при этом полинуклеотид кодирует тяжелую цепь одной молекулы Fab, легкую цепь другой молекулы Fab и мутантный полипептид IL-2.

В одном из вариантов осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует иммуноконъюгат, содержащий по меньшей мере один мутантный полипептид IL-2, сцепленный с помощью его amino- и карбоксиконцевых аминокислот с одной или несколькими молекулами scFv.

В одном из вариантов осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует фрагмент иммуноконъюгата, при этом полинуклеотид кодирует тяжелую цепь молекулы иммуноглобулина, предпочтительно молекулы IgG, более предпочтительно молекулы IgG<sub>1</sub>, и мутантный полипептид IL-2. В более конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид кодирует тяжелую цепь молекулы иммуноглобулина и мутантный полипептид IL-2, где мутантный полипептид IL-2 объединен аминоконцевой пептидной связью с тяжелой цепью иммуноглобулина.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует последовательность варибельной области, представленную в SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 231, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 311 или 313. Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует полипептидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 297, 299, 301, 303, 315, 317, 319, 321 или 323. Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является также выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 298, 300, 302, 304, 312, 314, 316, 318, 320, 322 или 324. Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 298, 300, 302, 304, 312, 314, 316, 318, 320, 322 или 324. Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую последовательность варибельной области, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 231, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 311 или 313. Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 297, 299, 301, 303, 315, 317, 319, 321 или 323. Изобретение относится также к выделенному полинуклеотиду, кодирующему иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует последовательности варибельной области SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 231, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 311 или 313 с консервативными аминокислотными заменами. Изобретение относится также к выделенному полинуклеотиду, кодирующему иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует полипептидные последовательности SEQ ID NO: 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 297, 299,

301, 303, 315, 317, 319, 321 или 323 с консервативными аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид или нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В других вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой РНК, например, в форме матричной РНК (мРНК). РНК, предлагаемая в настоящем изобретении, может быть одноцепочечной или двухцепочечной.

#### **Методы рекомбинации**

Мутантные полипептиды IL-2, предлагаемые в изобретении, можно получать путем делеции, замены, инсерции или модификации с использованием генетических или химическим методов, хорошо известных в данной области. Генетические методы могут включать сайтспецифический мутагенез кодирующей последовательности ДНК, ПЦР, синтез генов и т.п. Правильность нуклеотидных изменений можно подтверждать, например, с помощью секвенирования. Для этой цели можно применять нуклеотидную последовательность нативного IL-2, описанную у Taniguchi и др., (Nature 302, 1983, сс. 305-310), и нуклеиновую кислоту человеческого IL-2, доступную из публичных депозитариев, таких как Американская коллекция типовых культур (Роквилл, шт. Мэриленд). Последовательность нативного человеческого IL-2 представлена в SEQ ID NO: 1. Замена или инсерция может включать встречающиеся в естественных условиях, а также не встречающиеся в естественных условиях аминокислотные остатки. Аминокислотная модификация включает хорошо известные методы химической модификации, такие как дополнительное введение сайтов гликозилирования или присоединения углеводов и т.п.

Мутантные полипептиды IL-2 и иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно получать, например, путем твердофазного пептидного синтеза или методом рекомбинации. Для рекомбинантного получения один или несколько полинуклеотидов, кодирующих мутантный полипептид IL-2 или иммуноконъюгат (фрагмент), например, описанный выше, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для дополнительного клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Указанный полинуклеотид легко выделять и секвенировать с помощью общепринятых процедур. Одним из вариантов осуществления изобретения является вектор, предпочтительно экспрессионный вектор, содержащий один или несколько полинуклеотидов, предлагаемых в изобретении. Методы, хорошо известные специалистам в данной области, можно применять для конструирования экспрессионных векторов, содержащих кодирующую последовательность мутантного полипептида IL-2 или иммуноконъюгата (фрагмента) наряду с приемлемыми контролирующими транскрипцию/трансляцию сигналами. Эти методы включают технологии рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и рекомбинации/генетической рекомбинации *in vivo* (см., например, методы, описанные у Maniatis и др., Maniatis и др., Molecular Cloning A Laboratory Manual, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989; и Ausubel и др., Current Protocols in Molecular Biology, изд-во Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989).

Экспрессионный вектор может представлять собой часть плазмиды, вируса или может представлять собой фрагмент нуклеиновой кислоты. Экспрессионный вектор включает кассету экспрессии, в которой полинуклеотид, кодирующий мутантный IL-2 или иммуноконъюгат (фрагмент) (т.е. кодирующую область), клонируют с обеспечением функциональной связи с промотором и/или другими элементами, контролирующими транскрипцию или трансляцию. В контексте настоящего описания "кодирующая область" представляет собой часть нуклеиновой кислоты, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA) не транслируется в аминокислоту, он, в случае его присутствия, может рассматриваться как часть кодирующей области, однако любые фланкирующие последовательности, например, промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны, 5'- и 3'-нетранслируемые области и т.п., не являются частью кодирующей области. Две или большее количество кодирующих областей может присутствовать в индивидуальной полинуклеотидной конструкции, например индивидуальном векторе, или в отдельных полинуклеотидных конструкциях, например, отдельных (различных) векторах. Кроме того, любой вектор может содержать одну кодирующую область или может содержать две или большее количество кодирующих областей, например, вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, может кодировать один или несколько полипротеинов, которые пост- или котрансляционно разделяются на конечные белки посредством протеолитического расщепления. Кроме того, вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кислота, предлагаемый/предлагаемая в изобретении, может кодировать гетерологичные кодирующие области, либо слитые, либо не слитые с первым или вторым полинуклеотидом, который кодирует полипептиды, предлагаемые в изобретении, их или варианты или производные. Гетерологичные кодирующие области включают (но не ограничиваясь только ими) специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен. Функциональная связь имеет место, когда кодирующая область генного продукта, например полипептида, ассоциирована с одной или несколькими регуляторными последовательностями таким образом, чтобы экспрессия генного продукта находилась под воздействием или контролем регуляторной(ых) последовательности(ей). Два ДНК-фрагмента (таких как кодирующая область полипептида и ассоциированный с ней промотор) являются "функционально связанными", если индукция промоторной функции приводит к транскрипции мРНК, кодирующей требуемый генный продукт, и если природа связи между двумя ДНК-фрагментами не оказывает воздействия на способность регулирующих экспрессию последовательностей направлять экспрессию генного продукта, или не ока-

зывает воздействия на способность ДНК-матрицы к транскрипции. Таким образом, промоторная область должна быть функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если промотор обладает способностью осуществлять транскрипцию нуклеиновой кислоты. Промотор может представлять собой специфический для клетки промотор, который обеспечивает значительную транскрипцию ДНК только в предварительно отобранных клетках. Другие контролирующие транскрипцию элементы, помимо промотора, например, энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, можно функционально связывать с полинуклеотидом для обеспечения специфической для клетки транскрипции. Приемлемые промоторы и другие контролирующие транскрипцию области представлены в настоящем описании. Специалистам в данной области известно широкое разнообразие контролирующих транскрипцию областей. Они включают (но не ограничиваясь только ими) контролирующие транскрипцию области, которые функционируют в клетках позвоночных животных, такие как (но не ограничиваясь только ими) сегменты промоторов и энхансеров из цитомегаловирусов (например, немедленно-ранний промотор в сочетании с интроном -А), обезьяньего вируса 40 (например, ранний промотор) и ретровирусов (таких как вирус саркомы Рауса). Другие контролирующие транскрипцию области включают области, выведенные из генов позвоночных животных, таких как ген актина, белка теплового шока, бычьего гормона роста и кроличьего  $\beta$ -глобина, а также другие последовательности, которые могут контролировать экспрессию генов в эукариотических клетках. Дополнительные приемлемые контролирующие транскрипцию области включают тканеспецифические промоторы и энхансеры, а также индуцибельные промоторы (например, промоторы, индуцируемые тетрациклином). Аналогично этому, обычным специалистам в данной области известно широкое разнообразие контролирующих трансляцию элементов. Они включают (но не ограничиваясь только ими) сайты связывания рибосом, кодоны инициации трансляции и терминирующие кодоны и элементы, выведенные из вирусных систем (в частности внутренний сайт связывания (посадки) рибосом или IRES, который обозначают также как СІТЕ-последовательность). Кассета экспрессии может включать также другие характерные структуры, такие как сайт инициации репликации и/или интегрированные в хромосому элементы, такие как длинные концевые повторы (LTR) ретровирусов, или инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV).

Кодирующие области полинуклеотида и нуклеиновой кислоты, предлагаемые в настоящем изобретении, могут быть ассоциированы с дополнительными кодирующими областями, которые кодируют секреторные или сигнальные пептиды, которые направляют секрецию полипептида, кодируемого полинуклеотидом, предлагаемым в настоящем изобретении. Например, если требуется секреция мутантного полипептида IL-2, то ДНК, кодирующая сигнальную последовательность, можно помещать против хода транскрипции относительно нуклеиновой кислоты, кодирующей зрелые аминокислоты мутантного IL-2. Этот же подход применим к иммуноконъюгатам, предлагаемым в изобретении, или их фрагментам. Согласно гипотезе, касающейся сигналов, белки, секретиремые клетками млекопитающих, имеют сигнальный пептид или секреторную лидерную последовательность, который/которая отщепляется от зрелого белка после инициации экспорта растущей белковой цепи через шероховатый эндоплазматический ретикулум. Обычным специалистам в данной области должно быть очевидно, что полипептиды, секретиремые клетками позвоночных животных, как правило, имеют сигнальный пептид, слитый с N-концом полипептида, который отщепляется от транслируемого полипептида с образованием секретиремой или "зрелой" формы полипептида. Например, человеческий IL-2 транслируется с состоящей из 20 аминокислот сигнальной последовательностью на N-конце полипептида, которая затем отщепляется с образованием зрелого состоящего из 133 аминокислот человеческого IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения используют нативный сигнальный пептид, например, сигнальный пептид IL-2 или сигнальный пептид тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина или функциональное производное указанной последовательности, которое сохраняет способность обеспечивать секрецию полипептида, функционально связанного с ним. Альтернативно этому, можно применять гетерологичный сигнальный пептид млекопитающих или его функциональное производное. Например, лидерную последовательность дикого типа можно заменять на лидерную последовательность человеческого тканевого активатора плазминогена (ТРА) или мышьиной  $\beta$ -глюкуронидазы. Примеры аминокислотных и полинуклеотидных последовательностей секреторных сигнальных пептидов представлены в SEQ ID NO: 236-273.

ДНК, кодирующую короткую белковую последовательность, которую можно применять для облегчения дальнейшей очистки (например, гистидиновую метку) или предназначенную для мечения мутантного IL-2 или иммуноконъюгата, можно включать внутрь или на концы полинуклеотида, кодирующего мутантный IL-2 или иммуноконъюгат (фрагмент).

Дополнительным вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяин, содержащая один или несколько полинуклеотидов, предлагаемых в изобретении. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является клетка-хозяин, содержащая один или несколько векторов, предлагаемых в изобретении. Полинуклеотиды и векторы могут обладать любыми особенностями, индивидуально или в сочетании, указанными в настоящем описании касательно полинуклеотидов и векторов соответственно. В одном из таких вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин содержит (например, трансформирована или трансфектирована) вектором, содержащим полинуклеотид, который кодирует аминокислот-

ную последовательность, содержащую мутантный полипептид IL-2, предлагаемый в изобретении. В контексте настоящего описания понятие "клетка-хозяин" относится к любому типу клеточной системы, которую можно конструировать для получения мутантных полипептидов IL-2 или иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, и их фрагментов. Клетки-хозяева, пригодные для репликации и для поддержания экспрессии мутантных полипептидов IL-2 или иммуноконъюгатов, хорошо известны в данной области. Такие клетки можно трансфектировать или трансдуцировать соответствующим образом конкретным экспрессионным вектором и можно выращивать большее количество содержащих вектор клеток с целью внесения в ферментеры для крупномасштабных процессов получения мутанта IL-2 или иммуноконъюгата в достаточных для клинических применений количествах. Приемлемыми клетками-хозяевами являются прокариотические микроорганизмы, такие как *E. coli*, или различные эукариотические клетки, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки насекомых или т.п. Например, полипептиды можно получать в бактериях, в частности, когда отсутствует потребность в гликозилировании. После экспрессии полипептид можно выделять из пасты бактериальных клеток в растворимой фракции и можно дополнительно очищать. Помимо прокариот, в качестве хозяев для клонирования или экспрессии векторов, которые кодируют полипептид, можно использовать эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были "гуманизированы", что позволяет получать полипептид с частично или полностью человеческой схемой гликозилирования (см. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22, 2004, сс. 1409-1414 и Li и др., *Nat. Biotech.* 24, 2006, сс. 210-215). Клетки-хозяева, которые можно использовать для экспрессии (гликозилированных) полипептидов, получают также из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных животных). Примерами клеток беспозвоночных являются клетки насекомых, а также можно применять клетки растений. Были выявлены многочисленные бакуловирусные штаммы и соответствующие пригодные для них в качестве хозяев клетки насекомых, прежде всего для трансфекции клеток *Sporoptera frugiperda*. В качестве хозяев можно применять также культуры растительных клеток (см., например, U.S. №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описание технологии PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях). В качестве хозяев можно применять также клетки позвоночных животных. Например, можно использовать клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы к росту в суспензии. Другими примерами приемлемых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная с помощью SV40 (COS-7); линия клеток почки эмбриона человека (293 или клетки линии 293, субклонированные с целью выращивания в суспензионной культуре, Graham и др., *J. Gen. Virol.*, 36, 1977, с. 59); клетки почки детеныша хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (TM4-клетки, описанные, например, у Mather, *Biol. Reprod.*, 23, 1980, сс. 243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени бычьей крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, у Mather и др., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383, 1982, сс. 44-68); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другими ценными линиями клеток-хозяев млекопитающих являются клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая DHFR -CHO-клетки (Ur-laub и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1980, с. 4216); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор конкретных линий клеток-хозяев млекопитающих, которые можно применять для производства белка, см., например, у Yazaki и Wu, в *Methods in Molecular Biology* под ред. В.К.С. Lo, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 255-268. Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например культивируемые клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых, клетки бактерий и клетки растений (но не ограничиваясь только ими), а также клетки, находящиеся в организме трансгенного животного, трансгенного растения или культивируемой растительной или животной ткани. В одном из вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, предпочтительно клетку млекопитающего, такую как клетка яичника китайского хомячка (CHO), клетку почки человеческого эмбриона (HEK) или лимфоидную клетку (например, клетку YO, NSO, Sp20).

В данной области известны стандартные технологии для экспрессии чужеродных генов в этих системах. Клетки, экспрессирующие мутантный полипептид IL-2, слитый либо с тяжелой, либо с легкой цепью антигенсвязывающего домена, такого как антитело, можно конструировать таким образом, чтобы в них происходила экспрессия других цепей антитела, например, таким образом, чтобы экспрессируемый слитый продукт, содержащий мутантный IL-2, включал антитело, которое имеет как тяжелую, так и легкую цепь.

Одним из вариантов осуществления изобретения является способ получения мутантного полипептида IL-2 или иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, заключающийся в том, что культивируют клетку-хозяина, содержащую полинуклеотид, который кодирует мутантный полипептид IL-2 или иммуноконъюгат, представленный в настоящем описании, в условиях, пригодных для экспрессии мутантного полипептида IL-2 или иммуноконъюгата, и необязательно выделяют мутантный полипептид IL-2 или иммуноконъюгат из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 сцеплен по мень-

шей мере с одним не-IL-2-фрагментом. Можно получать мутантный IL-2, в котором сегмент мутантного полипептида IL-2 сцеплен с одной или несколькими молекулами, такими как полипептид, белок, углевод, липид, нуклеиновая кислота, полинуклеотид или молекула, которая содержит любые комбинации этих молекул (например, гликопротеины, гликолипиды и др.). Мутантный полипептид IL-2 можно соединять также с органическим фрагментом, неорганическим фрагментом или фармацевтическим лекарственным средством. В контексте настоящего описания фармацевтическое лекарственное средство представляет собой органическую субстанцию, содержащую соединение с молекулярной массой примерно 5000 Да или менее. Мутантный полипептид IL-2 можно соединять также с любым биологическим агентом, включая терапевтические соединения, такие как антинеопластические средства, антимикробные средства, гормоны, иммуномодуляторы, противовоспалительные средства и т.п. Можно применять также радиоизотопы, например, применяемые для визуализации, а также для терапии.

Мутантный полипептид IL-2 можно соединять также с множеством молекул одного и того типа или молекул нескольких типов. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула, которую соединяют с IL-2, может придавать способность обеспечивать направленность IL-2 к специфическим тканям или клеткам в организме животного и их называют в контексте настоящего описания "обеспечивающий направленный перенос фрагмент". В этих вариантах осуществления изобретения обеспечивающий направленный перенос фрагмент может обладать аффинностью к лиганду или рецептору в ткани или клетке-мишени, направляя тем самым IL-2 к ткани- или клетке-мишени. В конкретном варианте осуществления изобретения обеспечивающий направленный перенос фрагмент направляет IL-2 к опухоли. Обеспечивающие направленный перенос фрагменты включают, например, антигенсвязывающие фрагменты (например, антитела и их фрагменты), специфические в отношении находящихся на клеточной поверхности или внутриклеточных белков, лигандов биологических рецепторов и т.п. Указанные антигенсвязывающие фрагменты могут быть специфическими в отношении ассоциированных с опухолью антигенов, таких как описанные выше антигены.

Мутантный полипептид IL-2 можно генетически сливать с другим полипептидом, например, одноцепочечным антителом или (частью) тяжелых или легких цепей антитела, или можно конъюгировать химически с другой молекулой. Слияние мутантного полипептида IL-2 с частью тяжелой цепи антитела описано в разделе "Примеры". Мутантный IL-2, который является компонентом слияния мутантного полипептида IL-2 и другого полипептида, можно создавать таким образом, что последовательность IL-2 слита с полипептидом непосредственно или опосредовано через линкерную последовательность. Состав и длину линкера можно определять с помощью методов, хорошо известных в данной области, и можно оценивать его эффективность. Примеры линкерной последовательности между IL-2 и тяжелой цепью антитела представлены, например, в последовательностях SEQ ID NO: 209, 211, 213 и т.д. Дополнительные последовательности можно включать также в сайт расщепления для разделения при необходимости индивидуальных компонентов слияния, например, распознаваемую эндопептидазой последовательность. Кроме того, мутантный IL-2 или содержащий его слитый белок можно также синтезировать химически с использованием методов полипептидного синтеза, хорошо известных в данной области (например, твердофазный синтез Меррифилда). Мутантные полипептиды IL-2 можно конъюгировать химически с другими молекулами, например другим полипептидом, используя хорошо известные методы химической конъюгации. Для этой цели можно применять бифункциональные перекрестносшивающие реагенты, такие как гомофункциональные и гетерофункциональные перекрестносшивающие реагенты, хорошо известные в данной области. Применяемый тип перекрестносшивающего реагента зависит от природы молекулы, подлежащей сочетанию с IL-2, и его могут легко идентифицировать специалисты в данной области. В альтернативном или дополнительном варианте мутантный IL-2 и/или молекулу, с которой его предполагается конъюгировать, можно подвергать химической дериватизации таким образом, чтобы их обоих можно было конъюгировать с помощью отдельной реакции, что также хорошо известно в данной области.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 соединяют с одним или несколькими антигенсвязывающими фрагментами (т.е. в виде части иммуноконъюгата), которые содержат по меньшей мере переменную область антитела, обладающую способностью связываться с антигенной детерминантой. Переменные области могут образовывать часть встречающихся в естественных условиях или не встречающихся в естественных условиях антител или их фрагментов или могут быть выведены из них. Методы получения поликлональных антител и моноклональных антител хорошо известны в данной области (см., например, Harlow и Lane, "Antibodies: a Laboratory Manual", изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Не встречающиеся в естественных условиях антитела можно создавать с помощью твердофазного пептидного синтеза, можно получать с помощью методов рекомбинации (например, описанных в U.S. № 4186567) или можно получать, например, путем скрининга комбинаторных библиотек, содержащих переменные области тяжелых цепей и переменные области легких цепей (см., например, U.S. № 5969108 на имя McCafferty). Иммуноконъюгаты, антигенсвязывающие фрагменты и методы их получения подробно описаны также в публикации PCT WO 2011/020783, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Любые виды антител, фрагментов антител, антигенсвязывающих доменов или переменных облас-

тей животного происхождения можно соединять с мутантным полипептидом IL-2. Примерами антител, фрагментов антител, антигенсвязывающих доменов или вариабельных областей, которые можно применять согласно настоящему изобретению, являются (но не ограничиваясь только ими) конструкции, полученные из организма мышей, приматов или человека. Если конъюгат или слияние мутантный IL-2/антитело предназначен/предназначено для применения на человеке, то можно применять химерную форму антитела, в которой константные области антитела получают из человеческого антитела. Гуманизированную или полностью человеческую форму антитела можно приготавливать также с помощью методов, хорошо известных в данной области (см., например, U.S. № 5565332 на имя Winter). Для осуществления гуманизации можно применять различные методы, такие как (но не ограничиваясь только ими) (а) трансплантация нечеловеческих (например, из антитела-донора) CDR в человеческий (например, антитело-реципиент) каркасный участок и константные области, сохраняющие или не сохраняющие имеющие решающее значение остатки каркасного участка (например, остатки, важные для сохранения хорошей антигенсвязывающей аффинности или функции антитела), (б) трансплантация нечеловеческих определяющих специфичность участков (SDR или a-CDR; остатки имеют решающее значение для взаимодействия антитело-антиген) в человеческий каркасный участок и константные области, или (в) трансплантация полностью нечеловеческих вариабельных доменов и их "маскировка" напоминающим человеческий сегментом путем замены поверхностных остатков. Обзор гуманизированных антител и методов их получения см., например, у Almagro и Fransson, *Front Biosci* 13, 12008, сс. 1619-1633, и они описаны также, например, у Riechmann и др., *Nature* 332, 1988, сс. 323-329; Queen и др., *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1989, сс. 10029-10033; U.S. №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Jones и др., *Nature* 321, 1986, сс. 522-525; Morrison и др., *Proc Natl Acad Sci* 81, 1984, сс. 6851-6855; Morrison и Oi, *Adv Immunol* 44, 1988, сс. 65-92; Verhoeven и др., *Science* 239, 1988, сс. 1534-1536; Padlan, *Molec Immun* 31(3), 1994, сс. 169-217; Kashmiri и др., *Methods* 36, 2005, сс. 25-34 (описание трансплантации SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 1991, сс. 489-498 (описание "повторного покрытия"); Dall'Acqua и др., *Methods* 36, 2005, сс. 43-60 (описание "перестановки FR") и Osbourn и др., *Methods* 36, 2005, сс. 61-68, и Klimka и др., *Br J Cancer* 83, 2000, сс. 252-260 (описание подхода на основе "целенаправленной селекции" для перестановки FR). Человеческие антитела и человеческие вариабельные области можно получать с помощью различных методов, известных в данной области. Человеческие антитела описаны в целом у van Dijk и van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 2001, сс. 368-374 и Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 2008, сс. 450-459). Человеческие вариабельные области могут образовывать часть человеческих моноклональных антител или могут быть получены из них с помощью метода гибридом (см., например, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, сс. 51-63). Человеческие антитела и человеческие вариабельные области можно получать также путем введения иммуногена трансгенному животному, которое модифицировано таким образом, что может продуцировать интактные человеческие антитела или интактные антитела с человеческими вариабельными областями в ответ на контрольное заражение антигеном (см., например, Lonberg, *Nat Biotech* 23, 2005, сс. 1117-1125). Человеческие антитела и человеческие вариабельные области можно создавать также путем выделения последовательностей вариабельных областей Fv-клона, отобранных из человеческих фаговых дисплейных библиотек (см., например, Hoogenboom и др. в: *Methods in Molecular Biology*, под ред. O'Brien и др., изд-во Human Press, Totowa, NJ, 178, 2001, сс. 1-37) и McCafferty и др., *Nature* 348, 552-554; Clackson и др., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628). Фаг, как правило, экспонирует фрагменты антител либо в виде одноцепочечных Fv- (scFv)-фрагментов, либо в виде Fab-фрагментов. Подробное описание получения антигенсвязывающих фрагментов для иммуноконъюгатов с помощью фагового дисплея представлено в примерах, прилагаемых к публикации PCT WO 2011/020783.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты, пригодные для применения согласно настоящему изобретению, создают так, чтобы они обладали повышенной аффинностью связывания, например, с помощью методов, описанных в публикации PCT WO 2011/020783 (см. примеры, касающиеся созревания аффинности) или публикации заявки на патент США № 2004/0132066, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки. Способность иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, связываться со специфической антигенной детерминантой можно оценивать количественно либо с помощью твердофазного ферментного анализа (ELISA), либо другими методиками, известными специалисту в данной области, например, с помощью метода резонанса поверхностно плазмона (осуществляя анализ с использованием системы BIACORE T100 system) (Liljeblad и др., *Glyco J* 17, 2000, сс. 323-329), и традиционных анализов связывания (Heeley, *Endocr Res* 28, 2002, сс. 217-229). Анализы в конкурентных условиях можно применять для идентификации антитела, фрагмента антитела, антигенсвязывающего домена или вариабельного домена, конкурирующего с референс-антителом за связывание с конкретным антигеном, например, антитела, которое конкурирует с антителом L19 за связывание с экстра-доменом В фибронектина (EDB). В некоторых вариантах осуществления изобретения указанное конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается референс-антитело. Подробные приведенные в качестве примеров методы картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены у Morris, "Epitope Mapping Protocols", В: *Methods in Molecular Biology*, изд-во Humana

Press, Totowa, NJ, т. 66, 1996. При осуществлении приведенного в качестве примера анализа в конкурентных условиях иммобилизованный антиген (например, EDB) инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с антигеном (например, антитело L19), и вторым немеченым антителом, которое подлежит тестированию в отношении его способности конкурировать с первым антителом за связывание с антигеном. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный антиген инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не содержащем второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, обеспечивающих связывание первого антитела с антигеном, избыток несвязанного антитела удаляют и оценивают количество метки, ассоциированной с иммобилизованным антигеном. Если количество метки, ассоциированной с иммобилизованным антигеном, существенно снижено в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом, то это свидетельствует о том, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с антигеном (см. Harlow и Lane. *Antibodies: A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, гл. 14, 1988).

Может требоваться дополнительная модификация мутантного IL-2 или иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении. Например, проблемы, связанные с иммуногенностью и коротким временем полужизни, можно преодолевать путем конъюгации с практически прямоцепочечными полимерами, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ) или полипропиленгликоль (ППГ) (см., например, WO 87/00056).

Мутанты IL-2 и иммуноконъюгаты, полученные с помощью представленных в настоящем описании методов, можно очищать с использованием известных в данной области методик, таких как жидкостная хроматография высокого разрешения, ионообменная хроматография, гель-электрофорез, аффинная хроматография, гель-фильтрация и т.п. Фактические условия, применяемые для очистки конкретного белка, зависят, в частности, от таких факторов, как чистый заряд, гидрофобность, гидрофильность и т.д., и они должны быть очевидны специалисту в данной области. Для очистки антитела с помощью аффинной хроматографии можно использовать лиганд, рецептор или антиген, с которым связывается мутантный полипептид IL-2 или иммуноконъюгат. Например, можно использовать антитело, которое специфически связывается с мутантным полипептидом IL-2. Для очистки с помощью аффинной хроматографии иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, можно использовать матрикс с белком А или белком G. Например, последовательное применение аффинной хроматографии на белке А или G и гель-фильтрации можно применять для выделения иммуноконъюгата, практически согласно методу, описанному в разделе "Примеры". Чистоту мутантных полипептидов IL-2 и содержание слитых белков можно определять с помощью любого из широкого разнообразия хорошо известных аналитических методов, включая гель-электрофорез, жидкостную хроматографию высокого давления и т.п. Например, установлено, что содержащиеся тяжелые цепи слитые белки, которые экспрессировали согласно описанным в разделе "Примеры" методам, являются интактными и правильно собранными, что продемонстрировано с помощью ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях (см., например, фиг. 14). Разделяли две полосы, соответствующие примерно Mr 25000 и Mr 60000, которые соответствовали предсказанным молекулярным массам слитого белка, содержащего легкую и тяжелую цепь иммуноглобулина/IL-2.

#### Анализы

Представленные в настоящем описании мутантные полипептиды IL-2 и иммуноконъюгаты можно идентифицировать, подвергать скринингу или характеризовать их физические/химические свойства и/или виды биологической активности с помощью различных анализов, известных в данной области.

#### Анализы аффинности

Аффинность полипептида IL-2, мутантного или дикого типа, к различным формам рецептора IL-2 можно определять согласно методу, описанному в разделе "Примеры" с помощью резонанса поверхностного плазмона (SPR), используя стандартную инструментальную базу, например, устройство BIAcore (фирма GE Healthcare), и субъединицы рецептора, которые можно получать с помощью рекомбинантной экспрессии (см., например, Shanafelt и др., *Nature Biotechnol* 18, 2000, сс. 1197-1202). Гетеродимер  $\beta/\gamma$ -субъединиц рекомбинантного рецептора IL-2 можно создавать путем слияния каждой из субъединиц с мономером Fc-домена антитела, модифицированного с помощью технологии "knobs-into-holes" (см., например, U.S. № 5731168) для усиления гетеродимеризации слитых белков, содержащих соответствующую рецепторную субъединицу/Fc (см. SEQ ID NO: 102 и 103). Альтернативно этому, аффинность связывания мутантных IL-2 с различными формами рецептора IL-2 можно оценивать с использованием клеточных линий, для которых известна способность экспрессировать одну или другую форму рецептора. Конкретный иллюстративный и приведенный в качестве примера вариант измерения аффинности связывания описан ниже в разделе "Примеры". Согласно одному из вариантов осуществления изобретения величину  $K_D$  измеряли с помощью резонанса поверхностного плазмона с помощью устройства BIACORE® T100 (фирма GE Healthcare) при 25°C с использованием рецепторов IL-2, иммобилизованных на CM5-чипах. В целом, метод состоял в следующем: биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, фирма GE Healthcare) активировали с помощью гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS) согласно инструкциям поставщика. Рекомбинантный рецептор IL-2 разводили 10мМ ацетатом натрия, pH 5,5 до концентрации 0,5-



30 мкг/мл перед инъекцией со скоростью потока 10 мкл/мин для достижения примерно 200-1000 единиц ответа (RU) слитого белка (для  $\alpha$ -субъединицы IL-2R) или 500-3000 RU (для гетеродимера IL-2R  $\beta\gamma$ , полученного технологией "knobs-into-holes"). После инъекции рецептора IL-2 инъецировали 1М этаноламин для блокады непрореагировавших групп. Для кинетических измерений инъецировали трехкратные серийные разведения мутантного полипептида IL-2 или иммуноконъюгата (диапазон от ~0,3 до 300 нМ) в буфере HBS-EP+ (фирма GE Healthcare, 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТК, 0,05% сурфактанта P20, pH 7,4) при 25°C со скоростью потока примерно 30 мкл/мин. Скорость реакции ассоциации ( $k_{on}$ ) и реакции диссоциации ( $k_{off}$ ) рассчитывали с использованием простой модели связывания Ленгмюра 1:1 (программа BIACORE® T100 Evaluation Software, версия 1.1.1) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесия реакции диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывали как соотношение  $k_{off}/k_{on}$  (см., например, Chen и др., J Mol Biol 293, 1999, сс. 865-881).

Связывание иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, с Fc-рецепторами можно легко определять, например, с помощью ELISA или с помощью резонанса поверхностного плазмона (SPR), используя стандартную инструментальную базу, например, устройство BIACore (фирма GE Healthcare), и Fc-рецепторы, например, которые можно получать с помощью рекомбинантной экспрессии. Альтернативно этому, аффинность связывания Fc-доменов или иммуноконъюгатов, содержащих Fc-домен, с Fc-рецепторами можно оценивать, используя клеточные линии, которые, как известно, экспрессируют конкретные Fc-рецепторы, такие как НК-клетки, экспрессирующие Fc $\gamma$ IIIa-рецептор. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения величину  $K_D$  измеряли с помощью метода резонанса поверхностного плазмона с использованием устройства BIACORE® T100 (фирма GE Healthcare) при 25°C с использованием Fc-рецепторов IL-2, иммобилизованных на CM5-чипах. В целом, метод состоял в следующем: биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, фирма GE Healthcare) активировали с помощью гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)арбодимиды (EDC) и N-гидроксисукцинимиды (NHS) согласно инструкциям поставщика. Рекомбинантный Fc-рецептор разводили 10мМ ацетатом натрия, pH 5,5 до концентрации 0,5-30 мкг/мл перед инъекцией со скоростью потока 10 мкл/мин для достижения примерно 100-5000 единиц ответа (RU) слитого белка. После инъекции Fc-рецептора инъецировали 1М этаноламин для блокады непрореагировавших групп. Для кинетических измерений инъецировали 3-5-кратные серийные разведения иммуноконъюгата (диапазон от ~0,1 до 300нМ) в буфере HBS-EP+ (фирма GE Healthcare, 10мМ HEPES, 150мМ NaCl, 3мМ ЭДТК, 0,05% сурфактанта P20, pH 7,4) при 25°C со скоростью потока примерно 30-50 мкл/мин. Скорость реакции ассоциации ( $k_{on}$ ) и реакции диссоциации ( $k_{off}$ ) рассчитывали с использованием простой модели связывания Ленгмюра 1:1 (программа BIACORE® T100 Evaluation Software, версия 1.1.1) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесия реакции диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывали в виде соотношения  $k_{off}/k_{on}$  (см., например, Chen и др., J Mol Biol 293, 1999, сс. 865-881).

#### Анализ активности

Способность мутантного IL-2 связываться с рецепторами IL-2 можно оценивать опосредовано путем анализа воздействий иммунной активации, которые происходили в прямой зависимости от связывания с рецептором.

Одним из объектов изобретения являются анализы, предназначенные для идентификации мутантных полипептидов IL-2, обладающих биологической активностью. Виды биологической активности включают, например, способность индуцировать пролиферацию несущих рецептор IL-2T- и/или НК-клеток, способность индуцировать передачу сигналов IL-2 в несущих рецептор IL-2T- и/или НК-клетках, способность воздействовать на образование интерферона (IFN)- $\gamma$  в качестве вторичного цитокина НК-клетками, пониженную способность индуцировать образование вторичных цитокинов, в частности IL-10 и TNF- $\alpha$ , мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC), пониженную способность индуцировать апоптоз Т-клеток, способность индуцировать регресс опухолей и/или повышенную выживаемость и профиль пониженной токсичности, прежде всего пониженной проницаемости сосудов, *in vivo*. Предложены также мутантные полипептиды IL-2, обладающие указанной биологической активностью *in vivo* и/или *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения оценивали биологическую активность мутантного полипептида IL-2, предлагаемого в изобретении. В данной области широко известны различные методы определения биологической активности IL-2, и подробное описание многих из этих методов представлено в приведенном ниже разделе "Примеры". В разделе "Примеры" представлен приемлемый анализ оценки мутантных IL-2, предлагаемых в изобретении, в отношении их способности воздействовать на образование IFN- $\gamma$  НК-клетками. Культивируемые НК-клетки инкубировали с мутантным полипептидом IL-2 или иммуноконъюгатами, предлагаемыми в изобретении, и затем определяли концентрацию IFN- $\gamma$  в культуральной среде с помощью ELISA.

Индукцируемая IL-2 передача сигналов индуцирует несколько путей передачи сигналов и включает сигнальные молекулы JAK (киназа Janus) и STAT (сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции). Взаимодействие IL-2 с  $\alpha$ - и  $\gamma$ -субъединицами рецептора приводит к фосфорилированию рецептора и JAK1 и JAK3, которые ассоциированы с  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицей соответственно. Затем происходит ассо-

циация STAT5 с фосфорилированным рецептором и его фосфорилирование на имеющем решающее значение остатке тирозина. Это приводит к диссоциации STAT5 от рецептора, димеризации STAT5 и транслокации димеров STAT5 в ядро, где они усиливают транскрипцию генов-мишеней. Таким образом, способность мутантных полипептидов IL-2 индуцировать передачу сигналов через рецептор IL-2 можно оценивать, например, измеряя фосфорилирование STAT5. Подробности этого метода описаны в разделе "Примеры". РВМС обрабатывали мутантными полипептидами IL-2 или иммуноконъюгатами, предлагаемыми в изобретении, и уровни фосфорилированного STAT5 определяли с помощью проточной цитометрии.

Пролиферацию Т-клеток или НК-клеток в ответ на воздействие IL-2 можно оценивать путем инкубации Т-клеток или НК-клеток, выделенных из крови, с мутантными полипептидами IL-2 или иммуноконъюгатами, предлагаемыми в изобретении, с последующим определением содержания АТФ в лизате обработанных клеток. Перед обработкой Т-клетки можно предварительно стимулировать фитогемагглютинином (ФГА-М). Этот анализ, описанный в разделе "Примеры", является чувствительным и позволяет определять количество жизнеспособных клеток, хотя в данной области известны другие приемлемые альтернативные анализы (например, анализ включения [<sup>3</sup>H]-тимидина, Cell Titer Glo-анализы АТФ, анализ, основанный на применении Alamar Blue, WST-1-анализ, МТТ-анализ).

В разделе "Примеры" описан также анализ, предназначенный для оценки апоптоза Т-клеток и АICD, при осуществлении которого Т-клетки обрабатывают индуцирующим апоптоз антителом после инкубации с мутантными полипептидами IL-2 или иммуноконъюгатами, предлагаемыми в изобретении, и апоптотные клетки оценивают количественно на основе определения проточной цитометрией по отложению фосфатидилсерина/аннексина. В данной области известны и другие анализы.

Воздействие мутантного IL-2 на рост опухолей и выживание можно оценивать с использованием различных созданных на животных моделях опухолей, известных в данной области. Например, ксенотрансплантаты человеческих раковых линий клеток можно имплантировать мышам с иммунодефицитом и обрабатывать их мутантными полипептидами IL-2 или иммуноконъюгатами, предлагаемыми в изобретении, как описано в разделе "Примеры".

Токсичность мутантных полипептидов IL-2 или иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, *in vivo* можно определять по смертности, с помощью прижизненных наблюдений (оценка видимых симптомов нежелательных явлений, таких, например, как поведение, вес тела, температура тела) и клинической и анатомической патологии (например, определение показателей химии крови и/или гистопатологические анализы).

Проницаемость сосудов, индуцированную обработкой IL-2, можно оценивать на предварительно обработанной созданной на животных модели проницаемости сосудов. В целом, мутантный IL-2 или иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, вводят соответствующему животному, например, мышам, и позднее животному инъецируют репортерную молекулу сосудистого просачивания, распространение которой из сосудистой сети отражает степень проницаемости сосудов. Репортерная молекула сосудистого просачивания предпочтительно является достаточно крупной для того, чтобы обнаруживать проницаемость при использовании формы IL-2 дикого типа для предварительной обработки. Примером репортерной молекулы сосудистого просачивания может являться сывороточный белок, такой как альбумин или иммуноглобулин. Репортерную молекулу сосудистого просачивания предпочтительно метят с помощью выявляемой метки, такой как радиоизотоп, для облегчения количественного определения распределения молекулы в ткани. Сосудистую проницаемость можно измерять для сосудов, присутствующих в любом из различных внутренних органов тела, таких как печень, легкое и т.п., а также в опухоли, включая ксенотрансплантированную опухоль. Легкое является предпочтительным органом для измерения сосудистой проницаемости при использовании полноразмерных мутантных IL-2.

#### **Композиции, препаративные формы и пути введения**

Следующим объектом изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие любой из мутантных полипептидов IL-2 или иммуноконъюгатов, представленных в настоящем описании, например, предназначенные для применения в любом из указанных ниже терапевтических методов. В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любой из мутантных полипептидов IL-2 или иммуноконъюгатов, представленных в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любой из мутантных полипептидов IL-2 или иммуноконъюгатов, представленных в настоящем описании, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, указанное ниже.

Кроме того, представлен способ получения мутантного полипептида IL-2 или иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, в форме, пригодной для введения *in vivo*, заключающийся в том, что (а) получают мутантный полипептид IL-2 или иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, и (б) объединяют в препаративной форме мутантный полипептид IL-2 или иммуноконъюгат по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем, где приотловленный препарат мутантного полипептида IL-2 или иммуноконъюгата, пригоден для применения *in vivo*.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат в эффективном

количестве один или несколько мутантных полипептидов ПЛ-2 или иммуноконъюгатов, который(ые) растворен(ы) или диспергирован(ы) в фармацевтически приемлемом носителе. Понятия "фармацевтически или фармакологически приемлемый" относится к молекулярным субстанциям и композициям, которые, в целом нетоксичны для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях, т.е. не вызывают вредные, аллергические или другие нежелательные реакции при введении при необходимости животному, такому, например, как человек. Приготовление фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере один мутантный полипептид ПЛ-2 или иммуноконъюгат и необязательно дополнительное действующее вещество, должно быть очевидно специалистам в данной области в свете настоящего описания, например, из справочника Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-ое изд., изд-во Mack Printing Company, 1990, включенного в настоящее описание в качестве ссылки. Кроме того, очевидно, что препараты, предназначенные для введения животному (например, человеку), должны удовлетворять требованиям стандартов стерильности, пирогенности и общей безопасности и чистоты, разработанных отделением биологических стандартов (Управление контроля пищевых продуктов и лекарственных средств) FDA или соответствующим уполномоченным органом других стран. Предпочтительными композициями являются лиофилизированные препаративные формы или водные растворы. Примеры композиций ПЛ-2 приведены в US №№ 4604377 и 4766106. В контексте настоящего описания "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, буферы, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные агенты, противогрибные агенты), агенты для придания изотоничности, замедляющие абсорбцию агенты, соли, белки, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственных средств, полимеры, гели, связующие вещества, эксципиенты, разрыхлители, замазливатели, подслащивающие вещества, корригенты, красители и подобные материалы и их комбинации, которые должны быть известны обычному специалисту в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-ое изд., изд-во Mack Printing Company, 1990, сс. 1289-1329, включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Любой общепринятый носитель, если только он совместим с действующим веществом, можно применять в терапевтических или фармацевтических композициях.

Композиция может содержать различные типы носителей в зависимости от того, вводят ли ее в твердой, жидкой или аэрозольной форме, и от того, должна ли она быть стерильной, как в случае использования таких путей введения, как инъекция. Мутантные полипептиды ПЛ-2 или иммуноконъюгаты, предлагаемые в настоящем изобретении (и дополнительное терапевтическое средство) можно вводить внутривенно, внутрикожно, внутриартериально, внутрибрюшинно, внутрь повреждения, внутрь черепа, внутрь сустава, внутрь предстательной железы, внутрь селезенки, внутрирентально, внутриплеврально, внутритрахеально, внутриназально, внутрь стекловидного тела, внутривагинально, внутривнутриректально, внутрь опухоли, внутримышечно, внутрибрюшинно, подкожно, подкожно-интраабдоминально, интравезикулярно, в слизистую оболочку, интраперикардially, внутрь пуповины, интраокулярно, орально, топикально, место, путем ингаляции (например, аэрозольной ингаляции), инъекции, инфузии, непрерывной инфузии, локализованной перфузии, омывающей непосредственно клетки-мишени, через катетер, посредством лаважа, в виде кремов, в липидных композициях (например, липосомах), или с помощью любого другого метода или любой комбинации вышеуказанных путей, известных обычному специалисту в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-ое изд., изд-во Mack Printing Company, 1990, включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Для введения молекул полипептидов, таких как мутантные полипептиды ПЛ-2 и иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, наиболее часто применяют парентеральное введение, в частности, внутривенную инъекцию.

Парентеральные композиции включают композиции, созданные для введения путем инъекции, например, подкожной, внутрикожной, внутрь повреждения, внутривенной, внутриартериальной, внутримышечной, подоболовечной или внутрибрюшинной инъекции. Для инъекции мутантные полипептиды ПЛ-2 и иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно включать в препаративные формы в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический соляной буфер. Раствор может содержать предназначенные для получения препаративной формы агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно этому, мутантные полипептиды ПЛ-2 и иммуноконъюгаты могут находиться в порошкообразной форме, предназначенной для восстановления перед применением приемлемым наполнителем, например, стерильной не содержащей пирогенов водой. Стерильные инъекционные растворы приготавливают путем включения полипептидов ПЛ-2 или иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, в требуемом количестве в соответствующий растворитель при необходимости в сочетании с различными другими ингредиентами, перечисленными ниже. Стерильность можно легко достигать, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилизованных действующих веществ в стерильный наполнитель, который содержит основную дисперсионную среду и/или другие ингредиенты. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов, суспензий или эмульсий предпочтительными методами получения являются вакуумная сушка или сушка вымораживанием, которые позволяют получать порошок действующего вещества в сочетании с любым дополнительным требуемым ингредиентом.

ентом из предварительно стерилизованной фильтрацией жидкой среды. При необходимости жидкая среда перед применением должна быть соответствующим образом забуферена и жидкому разбавителю сначала придана изотоничность с помощью достаточного количества соляного раствора или глюкозы. Композиция должна быть стабильной в условиях приготовления и хранения и защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Принято поддерживать загрязнение эндотоксинами на минимальном безопасном уровне, например, менее 0,5 нг/мг белка. Пригодные фармацевтически приемлемые носители включают (но не ограничиваясь только ими): буферы, такие как фосфатный, цитратный и буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмонийхлорид; гексаметонийхлорид; бензалконийхлорид; бензетонийхлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол, резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и мета-крезол); низкомолекулярные (содержащие менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Водные суспензии для инъекций могут содержать соединения, которые повышают вязкость суспензии, такие как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, сорбит, декстран или т.п. Необязательно суспензия может содержать также стабилизаторы или агенты, которые повышают растворимость соединений, что позволяет получать высококонцентрированные растворы. Кроме того, суспензии действующих веществ можно получать в виде соответствующих масляных предназначенных для инъекции суспензий. Приемлемые липофильные растворители или наполнители включают жирные нелетучие масла, такие как кунжутное масло, или синтетические эфиры жирных кислот, такие как этиловые эфиры или триглицериды, или липосомы.

Действующие вещества можно заключать в микрокапсулы, например, полученные с помощью методов коацервации или межфазной полимеризации, например в гидроксипропилметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно, в коллоидные системы введения лекарственного средства (например, в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, под ред. А. Osol, 1980. Можно приготавливать препараты с замедленным высвобождением. Приемлемыми примерами препаратов с замедленным высвобождением являются полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, включающие полипептид, такие матрицы представляют собой изделия определенной формы, например, пленки или микрокапсулы. В конкретном варианте осуществления изобретения для достижения пролонгированной абсорбции инъекцируемой композиции можно применять в композиции агенты, замедляющие абсорбцию, такие, например, как моностеарат алюминия, желатин или их комбинация.

Помимо описанных выше композиций, иммуноконъюгаты можно приготавливать также в виде препарата в форме депо. Указанные препаративные формы длительного действия можно применять путем имплантации (например, подкожной или внутримышечной) или внутримышечной инъекции. Так, например, мутантные полипептиды IL-2 и иммуноконъюгаты можно включать в препаративные формы в сочетании с приемлемыми полимерными или гидрофобными материалами (например, в виде эмульсии в приемлемом масле) или ионообменными смолами, или в виде умеренно растворимых производных, например умеренно растворимой соли.

Фармацевтические композиции, содержащие мутантные полипептиды IL-2 и иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно приготавливать с помощью общепринятых процессов смешения, растворения, эмульгирования, капсулирования, захвата или лиофилизации. Фармацевтические композиции можно включать в препаративные формы с помощью общепринятого метода с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, разбавителей, эксципиентов или вспомогательных веществ, которые облегчают процессирование белков, с получением препаратов, которые можно применять в фармацевтических целях. Соответствующая форма зависит от выбранного пути введения.

Мутантные полипептиды IL-2 и иммуноконъюгаты можно включать в композиции в виде свободной кислоты или свободного основания, в нейтральной форме или в форме соли. Фармацевтически приемлемые соли представляют собой соли, которые практически сохраняют биологическую активность свободной кислоты или свободного основания. Они включают кислотнo-аддитивные соли, например, соли, образованные со свободными аминогруппами белковой композиции, или образованные с неорганическими кислотами, такими, например, как соляная или фосфорная кислота, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная или миндальная кислота. Соли, образованные со свободной карбоксильной группой, можно получать также из неорганических оснований, таких, например, как гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа; или таких органических оснований как изопропиламин, триметиламин, гистидин или прокаин. Фармацевтические соли имеют тенденцию к более вы-

сокой растворимости в водных и других протонных растворителях по сравнению с соответствующими формами в виде свободных оснований.

#### **Способы и композиции для терапевтического применения**

Любые мутантные полипептиды II-2 и иммуноконъюгаты, представленные в настоящем описании, можно применять в терапевтических методах. Мутантные полипептиды II-2 и иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно применять в качестве иммунотерапевтических агентов, например, при лечении различных видов рака.

Для применения в терапевтических способах мутантные полипептиды II-2 и иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно включать в состав препаративных форм, дозировать и вводить в соответствии с надлежащей клинической практикой. Рассматриваемые в этом контексте факторы включают конкретное заболевание, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, причину заболевания, область введения агента, метод введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим медикам.

Мутантные полипептиды II-2 и иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно применять для лечения болезненных состояний, на которые оказывает благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы хозяина, в частности, состояний, при которых является желательным повышенный клеточный иммунный ответ. Они могут включать болезненные состояния, при которых иммунный ответ хозяина является неудовлетворительным или недостаточным. Болезненные состояния, при которых можно вводить мутантные полипептиды II-2 и иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, представляют собой, например, опухоль или инфекцию, при которой клеточный иммунный ответ должен представлять собой имеющий решающее значение механизм специфического иммунитета. Конкретные болезненные состояния, при которых можно применять мутантные II-2, предлагаемые в настоящем изобретении, включают рак, например почечноклеточную карциному или меланому; иммунодефицит, в частности у ВИЧ-положительных пациентов, у пациентов с иммунодепрессией, хроническую инфекцию и т.п. Мутантные полипептиды II-2 и иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно вводить индивидуально или в виде любой приемлемой фармацевтической композиции.

Одним из объектов изобретения являются мутантные полипептиды II-2 и иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения в качестве лекарственного средства. Следующими объектами изобретения являются мутантные полипептиды II-2 и иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения для лечения заболевания. Некоторыми вариантами осуществления изобретения являются мутантные полипептиды II-2 и иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения в способе лечения. Одним из вариантов осуществления изобретения является мутантный полипептид II-2 или иммуноконъюгат, представленный в настоящем описании, предназначенный для применения при лечении заболевания у индивидуума, который нуждается в этом. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является мутантный полипептид II-2 или иммуноконъюгат, предназначенный для применения в способе лечения индивидуума, который имеет заболевание, заключающемся в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве мутантный полипептид II-2 или иммуноконъюгат. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение. В предпочтительном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ заключается также в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например противораковое средство, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. Другими вариантами осуществления изобретения является мутантный полипептид II-2 или иммуноконъюгат, предназначенный для применения для стимуляции иммунной системы. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является мутантный полипептид II-2 или иммуноконъюгат, предназначенный для применения в способе стимуляции иммунной системы у индивидуума, заключающемся в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве мутантный полипептид II-2 или иммуноконъюгат для стимуляции иммунной системы. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека. "Стимуляция иммунной системы" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения может включать один или несколько показателей, таких как общее повышение иммунной функции, повышение Т-клеточной функции, повышение В-клеточной функции, восстановление лимфоцитарной функции, повышение экспрессии рецепторов II-2, повышение Т-клеточной реактивности, повышение активности естественных клеток-киллеров или активности лимфокин-активированной клетки-киллера (ЛАК) и т.п.

Следующим объектом изобретения является применение мутантного полипептида II-2 или иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, для производства или приготовления лекарственного средства, которое предназначено для лечения заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом. В одном из вариантов осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения заболевания, заключающемся в том, что вводят индивидууму, который имеет заболевание, в терапевтически эффективном количестве лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществле-

ния изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение. В предпочтительном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения способ заключается также в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например противораковое средство, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. В следующем варианте осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для стимуляции иммунной системы. В другом варианте осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе стимуляции иммунной системы у индивидуума, заключающемся в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве лекарственное средство для стимуляции иммунной системы. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека. "Стимуляция иммунной системы" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения может включать один или несколько показателей, таких как общее повышение иммунной функции, повышение Т-клеточной функции, повышение В-клеточной функции, восстановление лимфоцитарной функции, повышение экспрессии рецепторов IL-2, повышение Т-клеточной реактивности, повышение активности естественных клеток-киллеров или активности лимфокин-активированной клетки-киллера (LAK) и т.п.

Следующим объектом изобретения является способ лечения заболевания у индивидуума, заключающийся в том, что вводят указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве мутантный полипептид IL-2 или иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении. В одном из вариантов осуществления изобретения указанному индивидууму вводят композицию, которая содержит мутантный полипептид IL-2 или иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, в фармацевтически приемлемой форме. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение. В предпочтительном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ заключается также в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например противораковое средство, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. Следующим объектом изобретения является способ стимуляции иммунной системы у индивидуума, заключающийся в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве мутантный полипептид IL-2 или иммуноконъюгат для стимуляции иммунной системы. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека. "Стимуляция иммунной системы" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения может включать один или несколько показателей, таких как общее повышение иммунной функции, повышение Т-клеточной функции, повышение В-клеточной функции, восстановление лимфоцитарной функции, повышение экспрессии рецепторов IL-2, повышение Т-клеточной реактивности, повышение активности естественных клеток-киллеров или активности лимфокин-активированной клетки-киллера (LAK) и т.п.

Должно быть очевидно, что любой из вышеуказанных терапевтических способов можно осуществлять с использованием иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, вместо или в дополнение к мутантному полипептиду IL-2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение, предпочтительно рак. Примерами рака являются (но не ограничиваясь только ими) рак мочевого пузыря, рак головного мозга, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак матки, рак шейки матки, рак эндометрия, рак пищевода, рак ободочной кишки, колоректальный рак, ректальный рак, рак желудка, рак предстательной железы, рак крови, рак кожи, плоскоклеточная карцинома, рак кости и рак почки. Другие нарушения клеточной пролиферации, которые можно лечить с использованием мутантного полипептида IL-2 или иммуноконъюгата, предлагаемого в настоящем изобретении, включают (но не ограничиваясь только ими) неоплазмы, локализованные в животе, кости, молочной железе, пищеварительной системе, печени, поджелудочной железе, брюшине, эндокринных железах (надпочечник, паращитовидная, гипофиз, яички, яичник, тимус, щитовидная), глазу, голове и шеи, нервной системе (центральной и периферической), лимфатической системе, тазовой области, коже, мягкой ткани, селезенке, грудном отделе и мочеполовой системе. Также под объем изобретения подпадают предраковые состояния или повреждения и метастазы рака. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак выбирают из группы, включающей почечноклеточный рак, рак кожи, рак легкого, колоректальный рак, рак молочной железы, рак головного мозга, рак головы и шеи. Аналогично этому, другие нарушения клеточной пролиферации можно также лечить с помощью мутантных полипептидов IL-2 и иммуноконъюгатов, предлагаемых в настоящем изобретении. Примерами таких нарушений клеточной пролиферации являются (но не ограничиваясь только ими), гипергаммаглобулинемия, лимфопролиферативные нарушения, парапротеинемия, пурпура, саркоидоз, синдром Сезари, макроглобулинемия Вальденстрема, болезнь Гаучера, гистоцитоз и любое другое заболевание, связанное с клеточной пролиферацией, помимо неоплазм, локализованных в указанных выше органах. В других вариантах осуществления изобретения заболевание связано с аутоиммунитетом, отторжением трансплантата, посттравматическим иммунным ответом и инфекционными заболеваниями

(например ВИЧ). Более конкретно мутантные полипептиды IL-2 и иммуноконъюгаты можно применять для элиминации клеток, участвующих в опосредованных иммунными клетками нарушениях, таких как лимфома; аутоиммунитет, отторжение трансплантата, заболевание "трансплантат-против-хозяина", ишемия и "удар". Специалисту в данной области должно быть очевидно, что во многих случаях мутантные полипептиды IL-2 или иммуноконъюгаты не могут обеспечивать исцеление, а могут только оказывать частичное благоприятное воздействие. В некоторых вариантах осуществления изобретения физиологические изменения, обладающие некоторым благоприятным действием, рассматриваются также как терапевтически ценные. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения количество мутантного полипептида IL-2 или иммуноконъюгата, которое обеспечивает физиологическое изменение, рассматривается как "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество". Субъект, пациент или индивидуум, нуждающийся в лечении, представляет собой, как правило, млекопитающее, более конкретно человека.

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно применять также в качестве диагностических реагентов. Связывание иммуноконъюгата с антигенной детерминантой можно легко выявлять, используя вторичное антитело, специфическое в отношении полипептида IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения вторичное антитело и иммуноконъюгат облегчают выявление связывания иммуноконъюгата с антигенной детерминантой, локализованной на поверхности клетки или ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантные полипептиды IL-2 или иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, в эффективном количестве вводят в клетку. В других вариантах осуществления изобретения мутантные полипептиды IL-2 или иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, вводят в терапевтически эффективном количестве индивидууму для лечения заболевания.

Для предупреждения или лечения заболевания соответствующая доза мутантного полипептида IL-2 или иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении (при его применении индивидуально или в сочетании с один или несколькими другими дополнительными терапевтическими средствами), должна зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, пути введения, веса тела пациента, типа полипептида (например, неконъюгированный IL-2 или иммуноконъюгат), серьезности и течения заболевания, от того, вводят ли антитело в превентивных или терапевтических целях, предшествующих или осуществляемых одновременно терапевтических вмешательств, истории болезни пациента и ответа на мутантный полипептид IL-2 или иммуноконъюгат и предписания лечащего врача. Практикующий специалист, ответственный за введение, в любом случае, должен определять концентрацию действующего(их) вещества(в) в композиции и соответствующую(ие) дозу(ы) для индивидуального пациента. Различные схемы введения доз включают (но не ограничиваясь только ими) однократное введение или несколько введений в различные моменты времени, болюсное введение и пульсирующую инфузию.

Однократное введение неконъюгированного IL-2 может включать от примерно 50000 до примерно 1000000 МЕ/кг или более, более конкретно примерно 600000 МЕ/кг IL-2. Его можно повторять несколько раз в день (например, 2-3 раза), в течение нескольких дней (например, в течение примерно 3-5 последовательных дней) и затем можно повторять один или несколько раз после периода отдыха (например, примерно 7-14 дней). Таким образом, терапевтически эффективное количество может включать только одно введение или несколько введений в течение некоторого периода времени (например, примерно 20-30 введений индивидууму примерно 600000 МЕ/кг IL-2 каждый раз, в течение примерно 10-20-дневного периода). При введении в форме иммуноконъюгата терапевтически эффективное количество мутантного полипептида IL-2 может быть ниже по сравнению с неконъюгированной формой мутантного полипептида IL-2.

Аналогично этому иммуноконъюгат можно вводить пациенту в виде одной обработки или серий обработок. В зависимости от типа и серьезности заболевания примерно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1-10 мг/кг) иммуноконъюгата может представлять собой начальную возможную дозу для введения пациенту, например, с использованием одного или нескольких индивидуальных введений или с помощью непрерывной инфузии. Типичная суточная доза может составлять от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от отмеченных выше факторов. Для повторных введений в течение нескольких дней или более продолжительного периода в зависимости от состояния лечение, как правило, должно продолжаться до достижения требуемого подавления имеющихся симптомов заболевания. В качестве примера доза иммуноконъюгата может составлять от примерно 0,005 до примерно 10 мг/кг. В другом примере (но не ограничиваясь только указанным) доза на одно введение может составлять от примерно 1, примерно 5, примерно 10, примерно 50, примерно 100, примерно 200, примерно 350, примерно 500 мкг/кг веса тела, примерно 1, примерно 5, примерно 10, примерно 50, примерно 100, примерно 200, примерно 350, примерно 500 до примерно 1000 мг/кг/веса тела или более, и находиться в любом указанном диапазоне. В качестве примеров (но не ограничиваясь только ими) указанного диапазона значений, можно вводить от примерно 5 до примерно 100 мг/кг веса тела, от примерно 5 мкг/кг веса тела до примерно 500 мг/кг веса тела и т.д. с учетом указанных выше уровней доз. Так, пациенту можно вводить одну или несколько доз, составляющих примерно 0,5, 2,0, 5,0 или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Указанные дозы можно вводить прерывисто, например, каждую неделю или каждые три недели (например, таким образом, чтобы пациент получал от примерно двух до примерно двадцати или, например, примерно

шесть доз иммуноконъюгата). Можно вводить начальную более высокую ударную дозу, после которой применять одну или несколько более низких доз. Однако можно использовать другие схемы введения доз. Успех такой терапии легко оценивать с помощью общепринятых методик и анализов.

Мутантные полипептиды ПЛ-2 и иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, как правило, следует применять в количестве, эффективном для достижения поставленной цели. При применении для лечения или предупреждения болезненного состояния мутантные полипептиды ПЛ-2 и иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, или их фармацевтические композиции, вводят или применяют в терапевтически эффективном количестве. Определение терапевтически эффективного количества находится в компетенции специалистов в данной области, прежде всего в свете представленного подробного описания изобретения.

Для системного введения терапевтически эффективную дозу можно сначала определять с помощью анализов *in vitro*, например анализов с использованием клеточных культур. Затем дозу можно включать в форму для изучения на животных моделях для достижения концентрации в кровотоке, находящейся в диапазоне, включающем значение  $IC_{50}$ , определенное на клеточной культуре. Указанную информацию можно использовать для более точного определения доз, которые можно применять на людях.

Начальные дозы можно оценивать также, исходя из данных, полученных *in vivo*, например на животных моделях, используя методики, хорошо известные в данной области. Обычный специалист в данной области легко может оптимизировать применение на людях на основе данных, полученных на животных.

Уровень доз и интервал можно регулировать индивидуально для получения уровней в плазме мутантных полипептидов ПЛ-2 или иммуноконъюгатов, которые являются достаточными для поддержания терапевтического действия. Обычные дозы, предназначенные для введения пациенту путем инъекции, составляют от примерно 0,1 до 50 мг/кг/день, как правило, от примерно 0,5 до 1 мг/кг/день. Для достижения терапевтически эффективных уровней в плазме можно вводить несколько доз каждый день. Уровни в плазме можно оценивать, например, с помощью ЖХВР.

В случаях местного применения или избирательного поглощения эффективная местная концентрация иммуноконъюгатов может не соответствовать концентрации в плазме. Специалист в данной области может оптимизировать терапевтически эффективные местные дозы без чрезмерных экспериментов.

Применение в терапевтически эффективной дозе мутантных полипептидов ПЛ-2 или иммуноконъюгатов, представленных в настоящем описании, должно, как правило, обеспечивать терапевтическую пользу, не вызывая существенной токсичности. Токсичность и терапевтическую эффективность мутантного ПЛ-2 или иммуноконъюгата можно определять с помощью стандартных фармацевтических процедур на культурах клеток или экспериментальных животных (см., например, примеры 8 и 9). Анализы на клеточных культурах или опыты на животных можно применять для определения значений  $LD_{50}$  (доза, смертельная для 50% популяции) и  $ED_{50}$  (доза, терапевтически эффективная для 50% популяции). Соотношение доз, характеризующих токсические и терапевтические действия, обозначают как терапевтический индекс, который можно выражать в виде соотношения  $LD_{50}/ED_{50}$ . Мутантные ПЛ-2 и иммуноконъюгаты, имеющие высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид ПЛ-2 или иммуноконъюгат, предлагаемый в настоящем изобретении, характеризуется высоким терапевтическим индексом. Данные, полученные в анализах с использованием клеточных культур и в опытах на животных, можно применять для определения диапазона доз, которые можно применять на людях. Доза лежит предпочтительно в диапазоне концентраций в кровотоке, которые включают  $ED_{50}$ , обладающих невысокой токсичностью или не обладающих токсичностью. Доза может варьироваться в зависимости от различных факторов, например, от применяемой лекарственной формы, применяемого пути введения, состояния индивидуума и т.п. Точную препаративную форму, путь введения и дозу может выбирать индивидуально врач в зависимости от состояния пациента (см., например, Fingl и др., в: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, гл.1, 1975, с 1, публикация полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

Лечащему врачу пациентов, которым вводят мутантные ПЛ-2 или иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, должно быть очевидно, как и когда заканчивать, прерывать или регулировать введение из-за токсичности, дисфункции органов и т.п. И, наоборот, лечащему врачу должны быть очевидно, как регулировать лечение в сторону применения более высоких доз, если клинический ответ является неадекватным (предотвращая токсичность). Величина вводимой дозы при лечении представляющего интерес нарушения должна варьироваться в зависимости от серьезности состояния, подлежащего лечению, пути введения и т.п. Серьезность состояния можно, например, оценивать среди прочего с помощью стандартных прогностических методов оценки. Кроме того, доза и предполагаемая частота введения дозы должна также варьироваться в зависимости от возраста, веса тела и ответа индивидуального пациента.

Максимальную терапевтическую дозу мутантного полипептида ПЛ-2 или иммуноконъюгата, содержащего указанный полипептид, можно повышать по сравнению с дозами, в которых применяют ПЛ-2 дикого типа или иммуноконъюгат, содержащий ПЛ-2 дикого типа соответственно.

#### **Другие агенты и варианты лечения**

Мутантные полипептиды ПЛ-2 и иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, при лечении



можно вводить в сочетании с одним или несколькими другими агентами. Например, мутантный полипептид IL-2 или иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством. Понятие "терапевтическое средство" включает любое средство, которое вводят для лечения симптома заболевания у индивидуума, который нуждается в таком лечении. Указанное дополнительное терапевтическое средство может представлять собой любое действующее вещество, которое можно применять при конкретном показании, подлежащем лечению, предпочтительно с дополнительными видами активности, которые не оказывают отрицательное действие друг на друга. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой иммуномодулятор, цитостатическое средство, ингибитор клеточной адгезии, цитотоксическое средство, активатор клеточного апоптоза или средство, повышающее чувствительность клеток к индукторам апоптоза. В конкретном варианте осуществления изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой противораковое средство, например, агент, разрушающий микротрубочки, антимаболит, ингибитор топоизомеразы, интеркалятор ДНК, алкилирующий агент, средство гормональной терапии, ингибитор киназ, антагонист рецептора, активатор апоптоза опухолевых клеток или антиангиогенное средство.

Указанные другие средства могут присутствовать в комбинации в количествах, эффективных для указанных целей. Эффективное количество указанных других средств зависит от количества применяемого мутантного полипептида IL-2 или иммуноконъюгата, типа нарушения, подлежащего лечению, и других указанных выше факторов. Мутантные полипептиды и иммуноконъюгаты, как правило, применяют в таких же дозах и с использованием указанных в настоящем описании путей введения, или в дозах, составляющих примерно от 1 до 99% от указанных в настоящем описании доз, или в любой дозе и с использованием любого пути введения, которые согласно эмпирическим/клиническим данным рассматриваются как приемлемые.

Отмеченные выше комбинированные терапии предусматривают совместное введение (когда два или большее количество терапевтических средств включают в одну и ту же или в отдельные композиции) и раздельное введение, в этом случае введение мутантного полипептида IL-2 или иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, можно осуществлять до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адьюванта. Мутантные полипептиды IL-2 и иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно применять также в сочетании с лучевой терапией.

#### Изделия

Другим объектом изобретения является изделие, которое содержит продукты, применяемые для лечения, предупреждения и/или диагностирования указанных выше нарушений. Изделие представляет собой контейнер и этикетку или листовку-вкладыш в упаковку, которые размещены на контейнере или прилагаются к нему. Приемлемыми контейнерами являются, например, банки, пузырьки, шприцы, пакеты для внутривенного (IV) раствора и т.д. Контейнеры можно изготавливать из различных материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией является эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностирования состояния, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или пузырек, снабженный пробкой, которую можно прокалывать с помощью иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере одно действующее вещество в композиции представляет собой мутантный полипептид IL-2, предлагаемый в изобретении. На этикетке или листовке-вкладыше в упаковке указано, что композицию применяют для лечения выбранного состояния. Кроме того, изделие может включать (а) первый контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит мутантный полипептид IL-2, предлагаемый в изобретении; и (б) второй контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит дополнительное цитотоксическое или иное терапевтическое средство. Согласно этому варианту осуществления изобретения изделие может содержать листовку-вкладыш в упаковке, которая содержит информацию о том, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния. В альтернативном или дополнительном варианте изделие может дополнительно включать второй (или третий) контейнер с фармацевтически приемлемым буфером, таким как бактериостатическая вода для инъекций (БСВИ), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, оно может включать другие продукты, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, в частности, другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Как должно быть очевидно, любое из указанных выше изделий может включать иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, вместо или в дополнение к мутантному полипептиду IL-2.

#### Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 - схематическое изображение форматов иммуноконъюгатов Fab-IL-2-Fab (А) и IgG-IL-2 (Б), содержащих мутантный полипептид IL-2;

на фиг. 2 - результаты очистки конструкции "оголенного" (неконъюгированного) IL-2 дикого типа. (А) Хроматограмма, полученная после очистки с использованием His-метки, "оголенного" IL-2 дикого типа; (Б) результаты ДСН-ПААГ-анализа очищенного белка (8-12% Бис-Трис (NuPage, фирма

Invitrogen), подвижный буфер MES);

на фиг. 3 - результаты очистки конструкции "оголенного" IL-2 дикого типа. (А) Хроматограмма IL-2 дикого типа, полученная методом гель-фильтрации; (Б) результаты ДСН-ПААГ-анализа очищенного белка (8-12% Бис-Трис (NuPage, фирма Invitrogen), подвижный буфер MES);

на фиг. 4 - результаты, полученные методом аналитической гель-фильтрации IL-2 дикого типа, проведенной на колонке Супердекс 75, 10/300 GL.

Пул 1 содержал 74% видов с молекулярной массой 23 кДа и 26% видов с 20 кДа, Пул 2 содержал 40% видов с 22 кДа и 60% видов с 20 кДа;

на фиг. 5 - результаты очистки конструкции "оголенного" четырехмутантного IL-2. (А) Хроматограмма, полученная после очистки с использованием His-метки, четырехмутантного IL-2; (Б) результаты ДСН-ПААГ-анализа, очищенного белка (8-12% Бис-Трис (NuPage, фирма Invitrogen), подвижный буфер MES);

на фиг. 6 - результаты очистки конструкции "оголенного" четырехмутантного IL-2. (А) Хроматограмма, полученная методом гель-фильтрации, четырехмутантного IL-2; (Б) результаты ДСН-ПААГ-анализа очищенного белка (8-12% Бис-Трис (NuPage, фирма Invitrogen), подвижный буфер MES);

на фиг. 7 - результаты, полученные методом аналитической гель-фильтрации четырехмутантного IL-2, проведенной на колонке Супердекс 75, 10/300 GL (Пул 2, 20 кДа);

на фиг. 8 - результаты, демонстрирующие одновременное связывание с IL-2R и человеческим FAP конструкции Fab-IL-2-Fab на основе 29B11, содержащей IL-2 дикого типа или четырехмутантный, мишенью которой является FAP. (А) Результат SPR-анализа; (Б) SPR-сенсограмма;

на фиг. 9 - результаты анализа в растворе, демонстрирующие индукцию высвобождения IFN- $\gamma$  NK92-клетками, при воздействии конструкции Fab-IL-2-Fab на основе 4G8, содержащей IL-2 дикого типа или четырехмутантный, мишенью которой является FAP, по сравнению с пролейкином;

на фиг. 10 - результаты анализа в растворе, демонстрирующие индукцию пролиферации выделенных NK-клеток (внизу), при воздействии конструкции Fab-IL-2-Fab на основе 4G8, содержащей IL-2 дикого типа или четырехмутантный, мишенью которой является FAP, по сравнению с пролейкином;

на фиг. 11 - результаты анализа в растворе, демонстрирующие индукцию пролиферации активированных CD3 -Т-клеток при воздействии конструкции Fab-IL-2-Fab на основе 4G8, содержащей IL-2 дикого типа или четырехмутантный, мишенью которой является FAP, по сравнению с пролейкином;

на фиг. 12 - результаты анализа в растворе, демонстрирующие индукцию индуцированной активацией клеточной гибели (AICD) избыточно стимулированных Т-клеток при воздействии конструкции на основе 4G8 Fab-IL-2-Fab, содержащей IL-2 дикого типа или четырехмутантный, мишенью которой является FAP, по сравнению с пролейкином;

на фиг. 13 - результаты фосфо-STAT5 FACS-анализа в растворе с использованием конструкции на основе 4G8 Fab-IL-2-Fab, содержащей IL-2 дикого типа или четырехмутантный, мишенью которой является FAP, по сравнению с пролейкином. (А) регуляторные Т-клетки (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>); (Б) CD8<sup>+</sup>-Т-клетки (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>); (В) CD4<sup>+</sup>-Т-клетки (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>); (Г) NK-клетки (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>);

на фиг. 14 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab, мишенью которого является FAP. (А) Профиль элюции на колонке с белком G. (Б) Профиль элюции на колонке для гель-фильтрации с Супердекс 200. (В) Результаты ДСН-ПААГ-анализа (Novex Трис-глицин 4-20%) конечного продукта с использованием образца в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях;

на фиг. 15 - результаты очистки иммуноконъюгата Fab-IL-2 qm-Fab на основе 4G8, мишенью которого является FAP. (А) Профиль элюции на колонке с белком А. (Б) Профиль элюции на колонке для гель-фильтрации с Супердекс 200. (В) Результаты электрофореза в NuPAGE Novex Бис-Трис-миниеле (фирма Invitrogen), подвижный MOPS-буфер, конечного продукта с использованием образца в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях;

на фиг. 16 - результаты очистки иммуноконъюгата Fab-IL2QM-Fab на основе MHLG1 KV9, мишенью которого является MCSF. (А) Профиль элюции на колонке с белком А. (Б) Профиль элюции на колонке для гель-фильтрации с Супердекс 200. (В) Результаты электрофореза в миниеле NuPAGE Novex Бис-Трис (фирма Invitrogen), подвижный MOPS-буфер, конечного продукта с использованием образца в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях;

на фиг. 17 - результаты, демонстрирующие направленное связывание конструкций Fab-IL-2-Fab на экспрессирующих человеческий FAP НЕК 293-клетках;

на фиг. 18 - результаты, демонстрирующие направленное связывание конструкций Fab-IL-2-Fab на экспрессирующих человеческий FAP НЕК 293-клетках;

на фиг. 19 - результаты, демонстрирующие специфичность связывания конструкций Fab-IL-2-Fab, которую определяли на экспрессирующих человеческую DPPIV НЕК 293-клетках и на НЕК 293-клетках, трансфектированных имитатором. Справа представлены результаты, демонстрирующие связывание специфического в отношении DPPIV (CD26) антитела;

на фиг. 20 - результаты анализа интернализации FAP при связывании конструкций Fab-IL-2-Fab с FAP на фибробластах линии GM05389;

на фиг. 21 - результаты анализа индуцируемого IL-2 высвобождения IFN- $\gamma$  NK92-клетками в растворе;

на фиг. 22 - результаты анализа индуцируемого IL-2 высвобождения IFN- $\gamma$  NK92-клетками в растворе;

на фиг. 23 - результаты анализа индуцируемой IL-2 пролиферации NK92-клеток в растворе;

на фиг. 24 - результаты сравнительной оценки Fab-IL-2-Fab на основе клонов 28H1, 29B11 и 4G8 с помощью анализа в растворе фосфорилирования STAT5 с использованием PBMC. (А) NK-клетки (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>); (Б) CD8<sup>+</sup>-Т-клетки (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>); (В) CD4<sup>+</sup>-Т-клетки (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>); (Г) регуляторные Т-клетки (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>);

на фиг. 25 - данные об эффективности иммуноконъюгатов 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab и 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab, мишенью которых является FAP, на клеточной линии человеческой почечноклеточной аденокарциномы ACHN;

на фиг. 26 - данные об эффективности иммуноконъюгатов 4G8 FAP-IL-2 qm-Fab и 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab, мишенью которых является FAP, на клеточной линии мышины легочной карциномы Льюиса LLC1;

на фиг. 27 - данные об эффективности иммуноконъюгатов 28H1 Fab-IL-2 wt-Fab и 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab, мишенью которых является FAP, на клеточной линии мышины легочной карциномы Льюиса LLC1;

на фиг. 28 - изображения, полученные при небольшом увеличении (100 $\times$ ), легких мышей, обработанных наполнителем (контроль) (А) или взятыми в концентрации 9 мкг/г wt IL-2 (Б) или qm IL-2 (В). В легких мышей, обработанных 9 мкг/г wt IL-2, виден вазоцентрический мононуклеарный инфильтрат, переместившийся в альвеолярные пространства. Имеют место отек и кровоизлияние. У мышей, обработанных qm IL-2, обнаружен маргинальный инфильтрат вокруг нескольких сосудов;

на фиг. 29 - изображения, полученные при большем увеличении (200 $\times$ ), легких, показанных на фиг. 28. Краевое скопление (маргинация) и инфильтрация мононуклеарных клеток в кровеносных сосудах и вокруг них являются более серьезными у мышей, обработанных wt IL-2 (А), чем у мышей, обработанных qm IL-2 (Б и В);

на фиг. 30 - изображения, полученные при небольшом увеличении (100 $\times$ ), печени мышей, обработанных наполнителем (контроль) (А) или взятыми в концентрации 9 мкг/г wt IL-2 (Б) или qm IL-2 (В). У мышей, обработанных wt IL-2, обнаружена вазоцентрическая инфильтрация;

на фиг. 31 - результаты анализа секреции IFN- $\gamma$  NK92-клетками после инкубации с различными препаратами IL-2 дикого типа (wt) и четырехмутантного IL-2 (qm), в течение 24 (А) или 48 ч (Б);

на фиг. 32 - результаты анализа пролиферации NK92-клеток после инкубации с различными препаратами IL-2 дикого типа (wt) и четырехмутантного IL-2 (qm) в течение 48 ч;

на фиг. 33 - результаты анализа пролиферации NK92-клеток после инкубации с различными препаратами IL-2 дикого типа (wt) и четырехмутантного IL-2 (qm) в течение 48 ч;

на фиг. 34 - результаты анализа пролиферации NK-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28H1 IL-2, мишенью которых является FAP, или с пролейкином в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней;

на фиг. 35 - результаты анализа пролиферации CD4-Т-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28H1 IL-2, мишенью которых является FAP, или с пролейкином в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней;

на фиг. 36 - результаты анализа пролиферации CD8-Т-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28H1 IL-2, мишенью которых является FAP, или с пролейкином в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней;

на фиг. 37 - результаты анализа пролиферации NK-клеток (А), CD4-Т-клеток (Б) и CD8-Т-клеток (В) при инкубации с различными иммуноконъюгатами IL-2 или с пролейкином в течение 6 дней;

на фиг. 38 - результаты анализа фосфорилирования STAT в NK-клетках (А), CD8-Т-клетках (Б), CD4-Т-клетках (В) и регуляторных Т-клетках (Г) после 30-минутной инкубации с пролейкином, полученным на фирме-заявителе IL-2 дикого типа и четырехмутантным IL-2;

на фиг. 39 - результаты анализа фосфорилирования STAT в NK-клетках (А), CD8-Т-клетках (Б), CD4-Т-клетках (В) и регуляторных Т-клетках (Г) после 30-минутной инкубации с пролейкином, IgG-IL-2, содержащим IL-2 дикого типа, или IgG-IL-2, содержащим четырехмутантный IL-2;

на фиг. 40 - данные о выживаемости мышей линии Black 6 после введения (один раз в день в течение семи дней) иммуноконъюгатов IL-2, содержащих IL-2 дикого типа или четырехмутантный IL-2, в различных дозах;

на фиг. 41 - данные о концентрации в сыворотке иммуноконъюгатов IL-2 после однократного i.v.-введения конструкций IgG-IL-2, мишенью которых является FAP (А), и "ненаправленных" (не имеющих специфической мишени) (Б) конструкций IgG-IL-2, содержащих либо дикого типа (wt), либо четырехмутантный (qm) IL-2;

на фиг. 42 - данные о концентрации в сыворотке иммуноконъюгатов IL-2 после однократного i.v.-

введения "ненаправленных" конструкций Fab-IL-2-Fab, содержащих либо дикого типа (wt), либо четырехмутантный (qm) IL-2;

на фиг. 43 - результаты очистки четырехмутантного IL-2. (А) Хроматография с иммобилизованным ионом металла; (Б) гель-фильтрация; (В) ДСН-ПААГ в невосстанавливающих условиях (NuPAGE Novex Бис-Трис-гель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MES); (Г) аналитическая гель-фильтрация (Супердекс 75 10/300 GL);

на фиг. 44 - результаты анализа пролиферации предварительно активированных CD8- (А) и CD4- (Б) Т-клеток после шестидневной инкубации с различными иммуноконъюгатами IL-2;

на фиг. 45 - результаты анализа активации индуцированной клеточной гибели CD3<sup>-</sup>Т-клеток после шестидневной инкубации с различными иммуноконъюгатами IL-2 и обработки в течение ночи антителом к Fas;

на фиг. 46 - результаты очистки иммуноконъюгата IgG-IL-2 (четырехмутантный, (qm)) на основе 4G8, мишенью которого является FAP. (А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. (Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. (В) Анализ конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex Бис-Трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS. Г) Аналитическая гель-фильтрация конечного продукта на колонке с Супердекс 200 (содержание мономера 97%);

на фиг. 47 - результаты очистки иммуноконъюгата IgG-IL-2 qm на основе 28H1, мишенью которого является FAP. (А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. (Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. (В) Анализ конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (восстанавливающие условия: NuPAGE Novex Бис-Трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS; невосстанавливающие условия: NuPAGE Трис-ацетат (фирма Invitrogen), подвижный Трис-ацетатный буфер). Г) Аналитическая гель-фильтрация конечного продукта на колонке с Супердекс 200 (содержание мономера 100%);

фиг. 48 - результаты анализа связывания иммуноконъюгата IgG-IL-2 qm на основе 4G8, мишенью которого является FAP, с человеческим FAP, экспрессируемым в стабильно трансфектированных НЕК 293-клетках, по данным FACS, в сравнении с соответствующей конструкцией Fab-IL-2 qm-Fab;

на фиг. 49 - результаты анализа высвобождения интерферона (IFN)- $\gamma$  на NK92-клетках в растворе, индуцированного иммуноконъюгатом IgG-IL-2 qm на основе 4G8, мишенью которого является FAP, в сравнении с конструкцией Fab-IL-2 qm-Fab на основе 28H1;

на фиг. 50 - результаты обнаружения фосфорилированного STAT5 с помощью FACS в различных типах клеток после 20-минутной стимуляции в растворе иммуноконъюгатом IgG-IL-2 qm на основе 4G8, мишенью которого является FAP, в сравнении с конструкциями Fab-IL-2-Fab и Fab-IL-2 qm-Fab на основе 28H1, а также с пролейкином. А) NK-клетки (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>); Б) CD8<sup>+</sup>-Т-клетки (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>); В) CD4<sup>+</sup>-Т-клетки (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>); Г) регуляторные Т-клетки (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>).

#### Примеры

Ниже представлены примеры способов и композиций, предлагаемых в изобретении. Как должно быть очевидно, можно осуществлять на практике различные другие варианты осуществления изобретения с учетом представленного выше описания изобретения в целом.

Пример 1.

#### Общие методы

##### Методы рекомбинантной ДНК

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., Molecular cloning: A laboratory manual; изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии применяли согласно инструкциям производителей. Общую информацию, касающуюся нуклеотидных последовательностей легких и тяжелых цепей человеческих иммуноглобулинов, см. у: Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во NIH, публикация No 91-3242, 1991.

##### Секвенирование ДНК

Последовательности ДНК определяли с помощью секвенирования двух цепей.

##### Синтез генов

Требуемые сегменты генов либо создавали с помощью ПЦР с использованием соответствующих матриц, либо синтезировали на фирме Genentech AG (Регенсбург, Германия) из синтетических олигонуклеотидов и ПЦР-продуктов посредством автоматического синтеза генов. В случаях, когда точная генная последовательность не была доступна, создавали олигонуклеотидные праймеры на основе последовательностей ближайших гомологов и гены выделяли с помощью ОТ-ПЦР из РНК, полученной из соответствующей ткани. Сегменты генов, фланкированные единичными сайтами, распознаваемыми рестриктазами, клонировали в стандартных клонирующих/секвенирующих векторах. Плазмидную ДНК очищали из трансформированных бактерий и определяли концентрацию с помощью УФ-спектроскопии. Последовательность ДНК субклонированных фрагментов генов подтверждали ДНК-секвенированием. Создавали сегменты генов с требуемыми сайтами рестрикции, позволяющими субклонировать их в соответствующих экспрессионных векторах. Все конструкции создавали с 5'-концевой последовательностью ДНК,

кодирующей лидерный пептид, который направляет секрецию белков в эукариотических клетках. В SEQ ID NO: 263-273 представлены примеры лидерных пептидов и кодирующих их полинуклеотидных последовательностей.

#### **Получение слияний $\beta\gamma$ -субъединица IL-2R -Fc и слияния $\alpha$ -субъединица IL-2R-Fc**

Для изучения аффинности связывания рецептора IL-2 создавали инструмент, который позволяет экспрессировать гетеродимерный рецептор IL-2; Р-субъединицу рецептора IL-2 сливали с молекулой Fc, которую создавали таким образом, что она обладала способностью к гетеродимеризации (Fc("впадина")) (см. SEQ ID NO: 274 и 275), используя технологию "knobs-into-holes" (Merchant и др., Nat Biotech. 16, 1998, сс. 677-68). Затем  $\gamma$ -субъединицу рецептора IL-2 сливали с Fc("выступ")-вариантом (см. SEQ ID NO: 276 и 277), гетеродимеризованным с Fc("впадина"). Затем указанный гетеродимерный содержащий Fc-слияние белок применяли в качестве субстрата для анализа взаимодействия IL-2/IL-2-рецептор.  $\alpha$ -субъединицу IL-2R экспрессировали в виде мономерной цепи, несущей сайт расщепления AcTev и Avi His-метку (SEQ ID NO: 278 и 279). Соответствующие субъединицы IL-2R кратковременно экспрессировали в клетках НЕК EBNA 293 с сывороткой в случае конструкции  $\beta\gamma$ -субъединицы IL-2R и без сыворотки в случае конструкции  $\alpha$ -субъединицы. Конструкцию  $\beta\gamma$ -субъединицы IL-2R очищали на белке А (фирма GE Healthcare) с последующей гель-фильтрацией (фирма GE Healthcare, Супердекс 200).  $\alpha$ -Субъединицу IL-2R очищали с использованием His-метки на колонке NiNTA (фирма Qiagen) с последующей гель-фильтрацией (фирма GE Healthcare, Супердекс 75).

#### **Получение иммуноконъюгатов**

Более подробное описание получения и очистки иммуноконъюгатов Fab-IL-2-Fab, включая создание и созревание аффинности антигенсвязывающих фрагментов, представлено в разделе "Примеры", прилагаемом к публикации PCT WO 2011/020783, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Как описано в указанной публикации, различные антигенсвязывающие домены, мишенью которых является FAP, создавали с помощью метода фагового дисплея, включая клоны, обозначенные как 4G8, 3F2, 28H1, 29B11, 14B3 и 4B9, которые применяли в описанных ниже примерах. Клон 28H1 представлял собой антитело с созревшей аффинностью, основой которого является родительский клон 4G8, а клоны 29B11, 14B3 и 4B9 представляли собой антитела с созревшей аффинностью, основой которых являлся родительский клон 3F2. Антигенсвязывающий домен, мишенью которого является MCSP, обозначен в контексте настоящего описания как MHLG1 KV9.

Последовательности иммуноконъюгатов, содержащих IL-2 дикого типа, которые применяли в приведенных ниже примерах, представлены также в публикации PCT WO 2011/020783. Последовательности, соответствующие иммуноконъюгатам, которые содержали четырехмутантный IL-2, которые применяли в приведенных ниже примерах, представляли собой: для 4G8: SEQ ID NO: 211 и 233; для 3F2: SEQ ID NO: 209 и 231; для 28H1: SEQ ID NO: 219 и 233; для 29B11: SEQ ID NO: 221 и 231; для 14B3: SEQ ID NO: 229 и 231; для 4B9: SEQ ID NO: 227 и 231; для MHLG1-KV9: SEQ ID NO: 253 и 255. Последовательности ДНК создавали путем генного синтеза и/или классических методов молекулярной биологии и субклонировали в экспрессионных векторах млекопитающих (один для легкой цепи и один для тяжелой цепи слитого с IL-2 белка) под контролем промотора MPSV и против хода транскрипции относительно синтетического сайта полиА, каждый вектор нес последовательность EBV OriP. Иммуноконъюгаты, которые применяли в описанных ниже примерах, получали путем контрастфекции клеток линии НЕК293-EBNA, находящихся на экспоненциальной фазе роста, экспрессионными векторами млекопитающих, используя опосредуемую фосфатом кальция трансфекцию. Альтернативно этому НЕК293-клетки, растущие в суспензии, трансфектировали полиэтилемином (ПЭИ) с использованием соответствующих экспрессионных векторов. Альтернативно этому, для получения в бессывороточной среде применяли пулы стабильно трансфектированных CHO-клеток или клоны CHO-клеток. В то время как конструкции на основе 4G8, мишенью которых является FAP, такие как Fab-IL-2-Fab, содержащие дикого типа или (четырёх) мутантный IL-2, можно очищать с помощью аффинной хроматографии, используя в качестве матрикса белок А, конструкции с созревшей аффинностью на основе 28H1, мишенью которых является FAP, такие как Fab-IL-2-Fab, очищали с помощью аффинной хроматографии, используя в качестве матрицы белок G, при получении продукта в лабораторном масштабе.

В целом, метод состоял в следующем: конструкцию 28H1 Fab-IL-2-Fab, мишенью которой является FAP, содержащую дикого типа или (четырёх) мутантный IL-2, очищали от супернатантов с помощью одной стадии аффинной хроматографии (белок G) с последующей гель-фильтрацией (Супердекс 200, фирма GE Healthcare). Колонку с белком G уравнивали с использованием 20 мМ фосфата натрия, 20 мМ цитрата натрия, pH 7,5, вносили супернатант и колонку промывали 20 мМ фосфатом натрия, 20 мМ цитратом натрия, pH 7,5. Fab-IL-2-Fab элюировали с помощью 8,8 мМ муравьиной кислоты, pH 3. Элюированные фракции объединяли и очищали с помощью гель-фильтрации в буфере для конечной препаративной формы следующего состава: 25 мМ фосфат калия, 125 мМ хлорид натрия, 100 мМ глицин, pH 6,7. Ниже представлены примеры результатов очистки и аналитических исследований.

Конструкции, мишенью которых является FAP, такие как 3F2 Fab-IL-2-Fab или 4G8 Fab-IL-2-Fab, содержащие дикого типа или (четырёх) мутантный IL-2, очищали аналогичным методом, включающим

одну стадию очистки на белке А с последующей гель-фильтрацией (Супердекс 200, фирма GE Healthcare). Колонку с белком А уравнивали с использованием 20 мМ фосфата натрия, 20 мМ цитрата натрия, pH 7,5, вносили супернатант и колонку промывали 20 мМ фосфатом натрия, 20 мМ цитратом натрия, 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,5, после чего промывали 13,3 мМ фосфатом натрия, 20 мМ цитратом натрия, 500 мМ хлоридом натрия, pH 5,45. Необязательно осуществляли третью промывку 10 мМ MES, 50 мМ хлоридом натрия, pH 5. Fab-IL-2-Fab элюировали 20 мМ цитратом натрия, 100 мМ хлоридом натрия, 100 мМ глицином, pH 3. Элюированные фракции объединяли и очищали с помощью гель-фильтрации в конечном буфере для препаративной формы следующего состава: 25 мМ фосфат калия, 125 мМ хлорид натрия, 100 мМ глицин, pH 6,7. Ниже более подробно представлены примеры процедур очистки и результаты для отобранных указанных ниже конструкций.

Слитые белки IgG-IL-2 qm, мишенью которых является FAP, создавали на основе антител к FAP 4G8, 4B9 и 28H1, в них один индивидуальный четырехмутантный (qm) IL-2, сливали с С-концом одной гетеродимерной тяжелой цепи, как показано на фиг. 1B. Для достижения направленного переноса к строме опухоли, в которой происходит избирательная экспрессия FAP, применяли Fab-область двухвалентного антитела (явление avidности). Для достижения гетеродимеризации в присутствии индивидуального четырехмутантного IL-2 применяли технологию "knob-into-hole". Для того, чтобы минимизировать создание гомодимерных слияний IgG-цитокин, цитокин сливали с С-концом (с делецией С-концевого остатка Lys) содержащей "выступ" тяжелой цепи IgG через G<sub>4</sub>-(SG<sub>4</sub>)<sub>2</sub>- или (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-линкер. Слияние антитело-цитокин обладало IgG-подобными свойствами. Для снижения связывания FcγR/эффекторной функции и предупреждения коактивации FcR в Fc-домен интродуцировали мутации P329G L234A L235A (LALA). Последовательности этих иммуноконъюгатов представлены в SEQ ID NO: 297, 299 и 233 (28H1), SEQ ID NO: 301, 303 и 231 (4B9) и SEQ ID NO: 315, 317 и 233 (4G8). Кроме того, создавали слитый белок, мишенью которого является CEA, такой как IgG-IL-2 и контрольный на основе DP47GS "ненаправленный" слитый белок IgG-IL-2 qm, в котором IgG не связывается со специфической мишенью. Последовательности этих иммуноконъюгатов представлены в SEQ ID NO: 305, 307 и 309 (DP47GS) и SEQ ID NO: 319, 321 и 323 (CH1A1A).

Конструкции IgG-IL-2 создавали путем кратковременной экспрессии в клетках линии HEK293 EBNA и очищали в целом согласно методу, описанному выше для конструкций Fab-IL-2-Fab. В целом, метод состоял в следующем: слитые белки IgG-IL-2 очищали с использованием одной стадии аффинной хроматографии на белке А (HiTrap ProtA, фирма GE Healthcare), уравнивали с использованием 20 мМ фосфата натрия, 20 мМ цитрата натрия, pH 7,5. После внесения супернатанта колонку сначала промывали 20 мМ фосфатом натрия, 20 мМ цитратом натрия, pH 7,5, а затем промывали 13,3 мМ фосфатом натрия, 20 мМ цитратом натрия, 500 мМ хлоридом натрия, pH 5,45. Слитый белок IgG-цитокин элюировали с помощью 20 мМ цитрата натрия, 100 мМ хлорида натрия, 100 мМ глицина, pH 3. Фракции нейтрализовали и объединяли и очищали гель-фильтрацией (HiLoad 16/60 Супердекс 200, фирма GE Healthcare) в конечном буфере для продукта, имеющем следующий состав: 25 мМ фосфат калия, 125 мМ хлорид натрия, 100 мМ глицин, pH 6,7. Ниже представлены примеры результатов процедур очистки и результаты для отобранных указанных ниже конструкций.

Концентрацию белка в очищенных образцах белков определяли, измеряя оптическую плотность (ОП) при 280 нм, используя коэффициент молярной экстинкции, рассчитанный на основе аминокислотной последовательности. Чистоту и молекулярную массу иммуноконъюгатов анализировали с помощью ДСН-ПААГ в присутствии восстановителя (5 мМ 1,4-дителиотреитол) или без него и окрашивали Кумасси бриллиантовым голубым (SimpleBlue™ SafeStain, фирма Invitrogen). Гелевую систему NuPAGE® Pre-Cast (фирма Invitrogen) применяли согласно инструкциям производителя (4-20% Трис-глициновые гели или 3-12% Бис-Трис). Содержание агрегатов в образцах иммуноконъюгатов анализировали с использованием колонки для аналитической гель-фильтрации с Супердекс 200 10/300GL (фирма GE Healthcare) в подвижном буфере, содержащем 2 мМ MOPS, 150 мМ NaCl, 0,02% NaN<sub>3</sub>, pH 7,3, при 25°C.

#### **Аффинность связывания FAP**

Способность связывать FAP расщепленных Fab-фрагментов, применяемых в указанных примерах в качестве антигенсвязывающих фрагментов, определяли на основе резонанса поверхностного плазмона (SPR) с использованием устройства Biacore. В целом, метод состоял в следующем: антитело к His (Penta-His, фирма Qiagen 34660) иммобилизовали на CM5-чипах для захвата 10 нМ человеческого, мышинового или обезьян циномоглус FAP-His (20 с). Температура составляла 25°C и применяли HBS-EP в качестве буфера. Концентрация анализируемого Fab составляла от 100 до 0,41 нМ (с дублированием), скорость потока составляла 50 мкл/мин (ассоциация: 300 с, диссоциация: 600 с (4B9, 14B3, 29B11, 3F2) или 1200 с (28H1, 4G8), регенерация: 60 с, 10 мМ глицин pH 2). Аппроксимацию осуществляли на основе модели связывания 1:1, RI=0, R<sub>max</sub>=локальное значение (поскольку применяли формат захвата). в табл.2 представлены данные об аффинности одновалентных компонентов по данным SPR.

Таблица 2. Аффинность ( $K_D$ ) Fab-фрагментов, мишенью которых является FAP, к FAP по данным SPR

$K_D$ в нМ	Человеческий FAP	FAP обезьян циномолгус	Мышиный FAP
4B9 Fab	0,3 0,31	0,23 0,24	5 5,2
14B3 Fab	0,47 0,47	0,61 0,59	4,7 4,7
29B11 Fab	0,19 0,19	0,21 0,2	1,3 1,2
3F2 Fab	6 6	4,7 5,3	8,9 9,5
28H1 Fab	2,6 2,6	3,7 3,7	0,13 0,18
4G8 Fab	53 (48 стационарное состояние) 51 (48 стационарное состояние)	33 (33 стационарное состояние) 35 (34 стационарное состояние)	0,07 0,07

Анализ биологической активности имеющих специфическую мишень (направленных) иммуноконъюгатов IL-2 Биологическую активность иммуноконъюгатов Fab-IL-2-Fab, мишенью которых является FAP или MCSP, и иммуноконъюгатов IgG-IL-2, мишенью которых является FAP, содержащих дикого типа или (четырёх) мутантный IL-2, исследовали с использованием нескольких клеточных анализов в сравнении с поступающим в продажу IL-2 (пролейкин, фирма Novartis, Хирон).

#### Высвобождение IFN- $\gamma$ НК-клетками (в растворе)

НК92-клетки с недостаточной экспрессией IL-2 (100000 клетки/лунку в 96-луночный планшет с U-образным дном) инкубировали с иммуноконъюгатами IL-2 в различных концентрациях, которые содержали дикого типа или (четырёх) мутантный IL-2, в течение 24 ч в НК-среде (среда MEM-альфа фирмы Invitrogen (№ 22561-021), дополненная 10% FCS, 10% лошадиной сыворотки, 0,1 мМ 2-меркаптоэтанолом, 0,2 мМ инозитом и 0,02 мМ фолиевой кислотой). Супернатанты собирали и высвобождение IFN- $\gamma$  анализировали с использованием набора II для ELISA, содержащего антитело к человеческому IFN- $\gamma$ , фирма Becton Dickinson (№ 550612). Пролейкин (фирма Novartis) служил в качестве положительного контроля при оценке опосредуемой IL-2 активации клеток.

#### Пролиферация НК-клеток

Получали образцы крови здоровых добровольцев в содержащие гепарин шприцы и выделяли РВМС. Неповрежденные человеческие НК-клетки выделяли из РВМС, используя набор II для выделения человеческих НК-клеток фирмы Miltenyi Biotec (№130-091-152). Экспрессирующие CD25 клетки оценивали с помощью проточной цитометрии. Для анализа пролиферации 20000 выделенных человеческих НК-клеток инкубировали в течение 2 дней во влажной камере при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в присутствии различных иммуноконъюгатов IL-2, содержащих дикого типа или (четырёх) мутантный IL-2. Пролейкин (фирма Novartis) служил в качестве контроля. Через 2 дня содержание АТФ в клеточных лизатах измеряли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo фирмы Promega (№ G7571/2/3). Процент роста рассчитывали, принимая пролиферацию при наиболее высокой концентрации пролейкина за 100%, а пролиферацию необработанных нестимулированных IL-2 клеток за 0%

#### Анализ фосфорилирования STAT5

Получали образцы крови здоровых добровольцев в содержащие гепарин шприцы и выделяли РВМС. РВМС обрабатывали иммуноконъюгатами IL-2, содержащими дикого типа или (четырёх) мутантный IL-2 в указанных концентрациях или пролейкином (фирма Novartis) в качестве контроля. После 20-минутной инкубации при 37°C РВМС фиксировали предварительно нагретым Cytofix-буфером (фирма Becton Dickinson, № 554655) в течение 10 мин при 37°C, после чего повышали проницаемость клеток с помощью буфера III Phosflow Perm (фирма Becton Dickinson, № 558050) в течение 30 мин при 4°C. Клетки отмывали дважды ЗФР, содержащим 0,1% БСА, перед осуществлением FACS-окрашивания, для которого использовали смеси антител для проточной цитометрии для выявления различных клеточных популяций и фосфорилирования STAT5. Образцы анализировали с использованием устройства FACScan-тоII с HTS фирмы Becton Dickinson.

НК-клетки определяли как CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD8-позитивные Т-клетки определяли как CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> позитивные Т-клетки определяли как CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> и T<sub>reg</sub>-клетки определяли как CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>.

#### Пролиферация Т-клеток и AICD

Получали образцы крови здоровых добровольцев в содержащие гепарин шприцы и выделяли РВМС. Неповрежденные Т-клетки выделяли с использованием набора для выделения Т-клеток Pan T Cell Isolation Kit II фирмы Miltenyi Biotec (№ 130-091-156). Т-клетки предварительно стимулировали 1мкг/мл ФГА-М (фирма Sigma Aldrich, № L8902) в течение 16 ч перед добавлением пролейкина или иммуноконъюгатов Fab-IL-2-Fab, содержащих дикого типа или (четырёх) мутантный IL-2, к промытым клеткам в

течение еще 5 дней. Через 5 дней содержание АТФ в клеточных лизатах измеряли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo фирмы Promega (№ G7571/2/3). Относительную пролиферацию рассчитывали, принимая пролиферацию при наиболее высокой концентрации пролейкина за 100%.

Экспозицию фосфатидилсерина (PS) и клеточную гибель Т-клеток анализировали с помощью проточной цитометрии (FACSCantoII, фирма BD Biosciences) с использованием клеток, окрашенных аннексином V (набор для окрашивания Annexin-V-FLUOS, фирма Roche Applied Science) и йодидом пропидина (PI). Для индукции индуцированной активацией клеточной гибели (AICD) Т-клетки обрабатывали индуцирующим апоптоз антителом к Fas (фирма Millipore, клон Ch11) в течение 16 ч после 16-часовой обработки ФГА-М и 5-дневной обработки иммуноконъюгатами Fab-IL-2-Fab. Окрашивание аннексином V (Ann-V) осуществляли согласно инструкциям производителя. В целом, метод состоял в следующем: клетки отмывали Ann-V-связывающим буфером (1× маточный раствор: 0,01 М Hepes/NaOH, pH 7,4, 0,14М NaCl, 2,5мМ CaCl<sub>2</sub>) и окрашивали в течение 15 мин при КТ с помощью комплекса аннексии V-ФИТЦ (фирма Roche). Клетки вновь отмывали Ann-V-связывающим буфером перед добавлением 200 мкл/лунку Ann-V-связывающего буфера, содержащего PI (0,3 мкг/мл). Клетки немедленно анализировали с помощью проточной цитометрии.

#### **Связывание с экспрессирующими FAP клетками**

Связывание иммуноконъюгатов IgG-IL-2 qm и Fab-IL-2 qm-Fab, мишенью которых является FAP, с человеческим FAP, экспрессируемым на стабильно трансфектированных HEK293-клетках оценивали с помощью FACS. В целом, метод состоял в следующем: 250000 клеток на лунку инкубировали с взятыми в указанных концентрациях иммуноконъюгатами в круглодонном 96-луночном планшете в течение 30 мин при 4°C и однократно отмывали 3ФР/0,1% БСА. Связанные иммуноконъюгаты определяли после инкубации в течение 30 мин при 4°C с конъюгированным с ФИТЦ F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом козьего антитела, специфического в отношении F(ab')<sub>2</sub>, AffiniPure (фирма Jackson Immuno Research Lab, № 109-096-097, рабочий раствор: разведение 1:20 в 3ФР/0,1% БСА, свежеприготовленный), используя устройство FACS CantoII (программное обеспечение FACS Diva).

#### **Анализ с помощью FACS интернализации FAP при связывании**

Для нескольких известных в данной области антител к FAP известно, что они индуцируют интернализацию FAP при связывании (описано, например, у Baum и др., J Drug Target 15, 2007, сс. 399-406; Vaueg и др., Journal of Clinical Oncology, ASCO Annual Meeting Proceedings (издание после конференции), 28 мая 2010 г. (дополнение от 20 мая), реферат № 13062 (2010); Ostermann и др., Clin Cancer Res 14, 2008, сс. 4584-4592). По этой причине при создании изобретения анализировали способность к интернализации предлагаемых в изобретении иммуноконъюгатов Fab-IL-2-Fab. В целом, метод состоял в следующем: клетки линии GM05389 (фибробласты легкого человека), которые культивировали в среде EMEM, дополненной 15% FCS, отделяли, промывали, подсчитывали, анализировали их жизнеспособность и высевали с плотностью  $2 \times 10^5$  клеток/лунку в 12-луночные планшеты. На следующий день иммуноконъюгаты Fab-IL-2-Fab, мишенью которых является FAP, разводили холодной средой и давали связываться с клеточной поверхностью в течение 30 мин на льду. Избыток несвязанного антитела отмывали с помощью холодного 3ФР и клетки дополнительно инкубировали в 0,5 мл полной предварительно нагретой среды при 37°C в течение указанных периодов времени. Через различные моменты времени клетки переносили на лед, однократно отмывали холодным 3ФР и инкубировали с вторичным антителом (конъюгированное с ФИТЦ F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом козьего антитела, специфического в отношении F(ab')<sub>2</sub>, AffiniPure (фирма Jackson Immuno Research Lab, № 109-096-097, разведение 1:20) в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки промывали дважды 3ФР/0,1% БСА, переносили в 96-луночный планшет, центрифугировали (400 × g) в течение 4 мин при 4°C и клеточный дебрис ресуспендировали путем интенсивного перемешивания. Клетки фиксировали, используя 100 мкл 2% PFA (параформальдегид). Для FACS-оценки клетки ресуспендировали, используя по 200 мкл 3ФР/0,1% БСА/образец, и осуществляли измерения с использованием протокола для планшетов для устройства FACS CantoII (программное обеспечение FACS Diva). Пример 2

При создании изобретения были разработаны мутантные версии IL-2, которые содержали одну или несколько следующих мутаций (по сравнению с последовательностью IL-2 дикого типа, представленной в SEQ ID NO: 1):

1. T3A обеспечивает "выключение" предсказанного сайта O-гликозилирования;
2. F42A обеспечивает "выключение" взаимодействия IL-2/IL-2R $\alpha$ ;
3. Y45A обеспечивает "выключение" взаимодействия IL-2/IL-2R $\alpha$ ;
4. L72G обеспечивает "выключение" взаимодействия IL-2/IL-2R $\alpha$ ;

5. C125A ранее описанная мутация, препятствующая связыванию посредством дисульфидного мостика димеров IL-2.

Мутантный полипептид IL-2, содержащий все мутации 1-4, обозначен в контексте настоящего описания как четырехмутантный (qm) IL-2. Он может содержать также мутацию 5 (см. SEQ ID NO: 19).

Помимо трех мутаций F42A, Y45A и L72G, созданных для воздействия на связывание с CD25, T3A-



мутация выбрана для элиминации сайта O-гликозилирования и получения белкового продукта с более высокой гомогенностью и чистотой, когда полипептид или иммуноконъюгат IL-2 qm экспрессируется в эукариотических клетках, таких как CHO или НЕК293-клетки.

С целью очистки His6-метку интродуцировали на C-конец, соединяя через VD-последовательность. Для сравнения создавали немутантную аналогичную версию IL-2, включающую только мутацию C145A, препятствуя тем самым образованию нежелательных межмолекулярных дисульфидных мостиков (SEQ ID NO: 3). Соответствующие молекулярные массы без сигнальной последовательности составляли 16423 Да для "оголенного" IL-2 и 16169 Да для "оголенного" IL-2 qm. IL-2 дикого типа и четырехмутантным IL-2 с His-меткой трансфектировали клетки линии НЕК EBNA в бессывороточной среде (среда F17) У профильтрованного супернатанта заменяли буфер посредством перекрестного потока перед его внесением в картридж NiNTA Superflow (5 мл, фирма Qiagen). Колонку промывали буфером для промывки: 20 mM фосфат натрия, 0,5 M хлорид натрия, pH 7,4 и элюировали буфером для элюции: 20 mM фосфат натрия, 0,5 M хлорид натрия, 0,5 M имидазол, pH 7,4. После загрузки колонку отмывали 8 объемами колонки (CV) буфера для отмывки, 10 CV 5% буфера для элюции (что соответствовало 25 mM имидазолу), затем элюировали с использованием градиента имидазола вплоть до 0,5 M. Объединенный элюат окончательно очищали с помощью гель-фильтрации на колонке HiLoad 16/60 с Супердекс75 (фирма GE Healthcare) в 2 mM MOPS, 150 mM хлорид натрия, 0,02% азида натрия, pH 7,3. На фиг. 2 представлена хроматограмма, полученная после очистки с использованием His-метки "оголенного" IL-2 дикого типа. Пул 1 получали из фракций 78-85, пул 2 из фракций 86-111. На фиг. 3 представлена хроматограмма, полученная после гель-фильтрации IL-2 дикого типа, в каждом пуле объединены фракции 12-14. На фиг. 4 представлен результат аналитической гель-фильтрации IL-2 дикого типа на колонке с Супердекс 75, 10/300 GL (фирма GE Healthcare) в 2 mM MOPS, 150 mM хлорид натрия, 0,02% азида натрия, pH 7,3. В пул 1 и 2 входили два белка с молекулярной массой примерно 22 и 20 кДа. Пул 1 включал большее количество белка, имеющего больший размер, а пул 2 включал большее количество белка, имеющего меньший размер, предположительно такое различие является следствием различий в O-гликозилировании. Выходы составляли примерно 0,5 мг/л супернатанта на пул 1 и примерно 1,6 мг/л супернатанта на пул 2. На фиг. 5 представлена хроматограмма, полученная после очистки с использованием His-метки четырехмутантного IL-2. Пул 1 состоял из фракций 59-91, пул 2 из фракций 92-111. На фиг. 6 представлена хроматограмма, полученная после гель-фильтрации четырехмутантного IL-2, при этом сохраняли только пул 2, содержащий фракции 12-14. На фиг. 7 представлен результат аналитической гель-фильтрации четырехмутантного IL-2 на колонке с Супердекс 75, 10/300 GL (фирма GE Healthcare) в 2 mM MOPS, 150 mM хлорид натрия, 0,02% азида натрия, pH 7,3. Препарат "оголенного" четырехмутантного IL-2 включал только один белок 20 кДа. У этого белка был "выключен" сайт O-гликозилирования. Аликвоты "оголенных" IL-2 дикого типа и четырехмутантного хранили в замороженном состоянии при -80°C. Выходы составляли примерно 0,9 мг/л супернатанта.

Вторую партию меченного с помощью His четырехмутантного IL-2 очищали согласно описанному выше методу с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованном металле (IMAC) и затем с помощью гель-фильтрации (SEC). Применяемые буферы для IMAC представляли собой буфер для уравнивания и промывки колонки, содержащий 50 mM Трис, 20 mM имидазол, 0,5 M NaCl, pH 8, и буфер для элюции, содержащий 50 mM Трис, 0,5 M имидазол, 0,5 M NaCl, pH 8. Применяемый для SEC и конечный буфер для продукта включал 20 mM гистидин, 140 mM NaCl, pH 6. На фиг. 43 представлены результаты такой очистки. Выход составлял 2,3 мл/л супернатанта.

Затем определяли аффинность в отношении гетеродимера IL-2R  $\beta\gamma$  и  $\alpha$ -субъединицы IL-2R с помощью резонанса поверхностного плазмона (SPR). В целом, метод состоял в следующем: лиганд - либо  $\alpha$ -субъединицу человеческого IL-2R (Fc2), либо гетеродимер IL2-R, включающий  $\beta$  в качестве "выступа",  $\gamma$  в качестве "впадины" (Fc3) -иммобилизовали CM5-чипе. Затем "оголенные" IL-2 дикого типа (пул 1 и 2) или четырехмутантный IL-2 и пролейкин (фирма Novartis/Chiron) наносили на чип в качестве анализируемых веществ при 25°C в HBS-EP-буфере в концентрациях от 300 до 1,2 нМ (разведение 1:3). Скорость потока составляла 30 мкл/мин и применяли следующие условия: ассоциация 180 с, диссоциация: 300 с и регенерация: 2  $\times$  30 с 3 M MgCl<sub>2</sub> для гетеродимера IL2-R $\beta$  "выступ",  $\gamma$  "впадина", 10 с 50 mM NaOH для  $\alpha$ -субъединицы IL-2R. Применяли модель связывания 1:1 для аппроксимации (связывание 1:1, RI $\neq$ 0, Rmax=локальное значение для IL-2R  $\beta\gamma$ , кажущаяся величина K<sub>D</sub>, связывание 1:1, RI=0, Rmax = локальное значение для IL-2R $\alpha$ ). в табл. 3 представлены соответствующие величины K<sub>D</sub>, характеризующие связывание человеческого IL-2R дикого типа и четырехмутантного IL-2, а также пролейкина с IL-2R  $\beta\gamma$  и  $\alpha$ -субъединицей IL-2R.

Таблица 3. Аффинность мутантных полипептидов IL-2 к IL-2R с промежуточной аффинностью и  $\alpha$ -субъединице IL-2R

К <sub>D</sub> в нМ Т = 25°C	Hu IL-2R $\beta\gamma$ (кинетика)	Hu IL-2R $\alpha$ (кинетика)	Hu IL-2R $\alpha$ (стационарное состояние)
«оголенный» IL-2 wt, пул 1	5,6 5	17,4 16,6	30,3 23,9
«оголенный» IL-2 wt, пул 2	2,8 1,8	10,6 10	19,7 17,6
«оголенный» IL-2 qm	2,7 2	нет связывания	нет связывания
пролейкин	2,4 2,8	7,5 12,5	19 17,8

Полученные данные демонстрируют, что "оголенный" четырехмутантный IL-2 обладает требуемым поведением и утрачивает способность к связыванию с  $\alpha$ -субъединицей IL-2R, в то время как связывание с IL-2R  $\beta\gamma$  сохраняется и является сопоставимым со связыванием соответствующей конструкции IL-2 дикого типа и пролейкина. Различия между пулами 1 и 2 IL-2 дикого типа, по-видимому, могут быть связаны с различиями в О-гликозилировании. Эту вариабельность и гетерогенность можно преодолевать у четырехмутантного IL-2R путем интродукции мутации T23A.

## Пример 3.

Три мутации F42A, Y45A и L72G и мутацию T3A интродуцировали в формат Fab-IL-2-Fab (фиг. 1A), используя антитело к FAP 4G8 в качестве модели обеспечивающего направленный перенос домена либо в виде конструкции с одной мутацией: 1) 4G8 IL-2 T3A, 2) 4G8 IL-2 F42A, 3) 4G8 IL-2 Y45A, 4) 4G8 IL-2 L72G, либо их объединяли также в конструкциях Fab-IL-2 mt-Fab в виде: 5) трех мутаций F42A/Y45A/L72G, или 6) четырех мутаций T3A/F42A/Y45A/L72G для инактивации сайта О-гликозилирования. Для сравнения использовали конструкцию Fab-IL-2 wt-Fab на основе 4G8. Все конструкции содержали мутацию C145A, препятствующую образованию связанных дисульфидными мостиками димеров IL-2. Различные конструкции Fab-IL-2-Fab экспрессировали в НЕК 293-клетках и очищали согласно указанному выше методу с помощью белка А и гель-фильтрации, которые описаны выше. Затем аффинность отобранных вариантов IL 2 в отношении гетеродимера человеческого и мышиноного IL-2R  $\beta\gamma$  и в отношении  $\alpha$ -субъединицы человеческого и мышиноного IL-2R определяли с помощью резонанса поверхностного плазмона (SPR) (фирма Biacore), используя рекомбинантный гетеродимер IL-2R  $\beta\gamma$  и мономерный содержащий  $\alpha$ -субъединицу IL-2R, в следующих условиях:  $\alpha$ -субъединицу IL-2R иммобилизовали, используя две плотности иммобилизации, проточную ячейку с более высокой иммобилизацией применяли для мутантов, у которых утрачена способность связываться с CD25. Использовали следующие условия: химическая иммобилизация: гетеродимер человеческого IL-2R  $\beta\gamma$  - 1675 RU; гетеродимер мышиноного IL-2R  $\beta\gamma$  - 5094 RU;  $\alpha$ -субъединица человеческого IL-2R-1019 RU;  $\alpha$ -субъединица человеческого IL-2R-385 RU,  $\alpha$ -субъединица мышиноного IL-2R - 1182 RU;  $\alpha$ -субъединица мышиноного IL-2R - 378 RU, температура: 25°C, анализируемые субстанции: варианты содержащих Fab конструкций Fab-IL-2 на основе 4G8-от 3,1 до 200 нМ, скорость потока - 40 мкл/мин, ассоциация: 180 с, диссоциация: 180 с, регенерация: 10 мМ глицин, pH 1,5: 60 с, 40 мкл/мин. Аппроксимация: реакционная модель двух состояний (конформационное изменение), RI = 0 Rmax = локальное значение. Результаты кинетического анализа представлены в табл. 4.

Таблица 4. Аффинность иммуноконъюгатов, мишенью которых является FAP, содержащих мутантные полипептиды IL-2, к IL-2R с промежуточной аффинностью и к  $\alpha$ -субъединице IL-2R (К<sub>D</sub>)

Конструкция Fab-IL-2-Fab	Hu IL-2R $\beta\gamma$	Hu IL-2R $\alpha$	Mu IL-2R $\beta\gamma$	Mu IL-2R $\alpha$
4G8 IL-2 wt	3,8нМ	4,5нМ	45,6нМ	29нМ
4G8 IL-2 T3A	1,6нМ	4,9нМ	15,6нМ	15нМ
4G8 IL-2 F42A	4,7нМ	149нМ	57нМ	363нМ
4G8 IL-2 Y45A	3,9нМ	22,5нМ	41,8нМ	369нМ
4G8 IL-2 L72G	ND	45,3нМ	ND	ND
4G8 IL-2 трехмутантный F42A/Y45A/L72G	5,6нМ	нет связывания	68,8нМ	ND
4G8 IL-2 четырехмутантный T3A/F42A/Y45A/L72G	5,2нМ	нет связывания	56,2нМ	нет связывания

Одновременное связывание с гетеродимером IL-2R  $\beta\gamma$  и FAP продемонстрировано с помощью SPR. В целом, метод состоял в следующем: конструкцию человеческого IL-2R  $\beta\gamma$ , созданную с помощью технологии "knob-into-hole", иммобилизовали химически на CM5-чипе и 10 нМ конструкцию Fab-IL-2-Fab захватывали в течение 90 с. Человеческий FAP служил в качестве анализируемой субстанции и его использовали в концентрациях от 200 до 0,2 нМ. Использовали следующие условия: температура: 25°C, буфер: HBS-EP, скорость потока: 30 мкл/мин, ассоциация: 90 с, диссоциация: 120 с. Регенерацию осуществляли в течение 60 с, используя 10мМ глицин, pH 2. Аппроксимацию осуществляли с использованием модели связывания 1:1, RI $\neq$ 0, Rmax = глобальное значение. Анализ образования мостиков, проведенный с помощью SPR, продемонстрировал, что конструкции Fab-IL-2-Fab, как дикого типа, так и четырехму-

тантные, а также полученный с помощью созревания аффинности к FAP связывающийся клон 28H1 или его родительские антитела 3F2 или 4G8 в концентрации 10 нМ обладали способностью связываться одновременно с гетеродимером IL-2R  $\beta\gamma$ , иммобилизованном на чипе, а также и с человеческим FAP, применяемым в качестве анализируемой субстанции (фиг. 8). Результаты определения аффинности представлены в табл.5.

Таблица 5. Аффинность к FAP ( $K_D$ ) иммуноконъюгатов, мишенью которых является FAP, содержащих мутантные полипептиды IL-2 и связывающиеся с IL-2R с промежуточной аффинностью

Конструкция Fab-IL-2-Fab	$K_D$
4G8 Fab-IL-2 wt-Fab	5,0нМ
4G8 Fab-IL-2 qm-Fab	5,6нМ
29B11 Fab-IL-2 wt-Fab	0,32нМ
29B11 Fab-IL-2 qm-Fab	0,89нМ
3F2 Fab-IL-2 wt-Fab	1,2нМ

Взяты в совокупности, данные SPR-анализа демонстрируют, что I) мутация T3A не влияет на связывание с CD25, II) три мутации F42A, Y45A и L72G не влияют на аффинность к гетеродимеру IL-2R  $\beta\gamma$ , но они снижают аффинность к CD25 следующим образом: wt = T3A > Y45A (примерно в 5 раз ниже) > L72G (примерно в 10 раз ниже) > F42A (примерно в 33 раза ниже); III) комбинация трех мутаций F42A, Y45A и L72G в сочетании с воздействующей на сайт O-гликозилирования мутацией T3A или без указанной мутации приводит к полной потере способности связываться с CD25 при определении в условиях SPR, IV) хотя аффинность человеческого IL-2 к мышинному гетеродимеру IL-2R  $\beta\gamma$  и  $\alpha$ -субъединице IL-2R уменьшается примерно в 10 раз по сравнению с человеческими рецепторами IL-2R, отобранные мутации не влияют на аффинность к мышинному гетеродимеру IL-2R  $\beta\gamma$ , но аннулируют связывание с  $\alpha$ -субъединицей мышинного IL-2R соответственно. Этот результат свидетельствует о том, что мыши представляют собой приемлемую модель для изучения фармакологических и токсикологических воздействий мутантных IL-2, хотя в целом IL-2 обладает меньшей токсичностью для грызунов, чем для человека.

Помимо утраты сайта O-гликозилирования одним из дополнительных преимуществ комбинации четырех мутаций T3A, F42A, Y45A, L72G является снижение поверхностной гидрофобности четырехмутантного IL-2 вследствие замены экспонируемых на поверхности гидрофобных остатков, таких как фенилаланин, тирозин или лейцин, на аланин. Анализ температуры агрегации методом динамического рассеяния света продемонстрировал, что температура агрегации иммуноконъюгатов Fab-IL-2-Fab, мишенью которых является FAP, которые содержат дикого типа или четырехмутантный IL-2, находилась в одинаковом диапазоне: примерно 57-58°C для Fab-IL-2-Fab на основе родительского 3F2 и для производного 3F2 с созревшей аффинностью 29B11; и в диапазоне от 62-63°C для Fab-IL-2-Fab на основе родительского 4G8 и производных 4G8 с созревшей аффинностью 28H1, 4B9 и 14B3 4G8, что свидетельствует о том, что комбинация четырех мутаций не оказывает отрицательного воздействия на стабильность белка. В подтверждение предпочтительных свойств отобранных четырех мутаций IL-2 установлено, что выход после кратковременной экспрессии иммуноконъюгата в формате четырехмутантного Fab-IL-2 qm-Fab может даже превышать уровни экспрессии, обнаруженные при применении соответствующих конструкций Fab-IL-2 wt-Fab. И, наконец, фармакокинетический анализ (ФК) продемонстрировал, что конструкции на основе 4G8 как Fab-IL-2 qm-Fab, так и Fab-IL-2 wt-Fab обладают сопоставимыми ФК-свойствами (см. пример 9, ниже). На основе этих данных и данных клеточных анализов, которые описаны ниже в примере 4, четыре мутации T3A, F42A, Y45A, L72G отобраны в качестве идеальной комбинации мутаций для того, что аннулировать связывание CD25 с IL-2 в обладающем направленным действием иммуноконъюгате Fab-IL-2-Fab.

#### Пример 4.

Иммуноконъюгаты Fab-IL-2-Fab на основе 4G8, мишенью которых является FAP, содержащие IL-2 дикого типа или имеющий одну мутацию 4G8 IL-2 T3A, 4G8 IL-2 F42A, 4G8 IL-2 Y45A, 4G8 IL-2 L72G или IL-2, имеющий соответственно три мутации (F42A/Y45A/L72G) или четыре мутации (T3A/F42A/Y45A/L72G), последовательно тестировали с использованием описанных выше клеточных анализов в сравнении с пролейкином.

Индукцируемое IL-2 высвобождение IFN- $\gamma$  оценивали после инкубации NK-клеток линии NK92 с указанными конструкциями (фиг. 9). NK92-клетки экспрессируют на их поверхности CD25. Результаты продемонстрировали, что иммуноконъюгат Fab-IL-2-Fab, содержащий IL-2 дикого типа, обладал меньшей эффективностью в отношении индукции высвобождения IFN- $\gamma$ , чем пролейкин, что является ожидаемым с учетом примерно в 10 раз более низкой аффинности Fab-IL-2 wt-Fab к гетеродимеру IL-2R  $\beta\gamma$ . Интродукция индивидуальных мутаций, влияющих на связывание с CD25, а также комбинации трех мутаций, влияющих на связывание с CD25, в трехмутантный IL-2 привела к получению конструкций Fab-IL-2-Fab, которые оказались сопоставимыми в пределах ошибки метода с конструкцией, содержащей IL-2 дикого типа, с позиций эффективности и абсолютной индукции высвобождения IFN- $\gamma$ .

Таблица 6. Индукция высвобождения IFN- $\gamma$  NK-клетками иммуноконъюгатами Fab-IL-2-Fab, содержащими мутантные полипептиды IL-2

Конструкция	EC <sub>50</sub> [nM]
пролейкин	4,1
4G8 Fab-IL 2 wt-Fab	23,0
4G8Fab-IL-2 (T3A)-Fab	16,2
4G8 Fab-IL-2 (F42A)-Fab	15,4
4G8 Fab-IL-2(Y45A)-Fab	20,9
4G8 Fab-IL-2 (L72G)-Fab	16,3
4G8 Fab-IL-2 (трехмутантный 42/45/72)-Fab	24,4

Затем индукцию пролиферации выделенных человеческих NK-клеток иммуноконъюгатами Fab-IL-2-Fab оценивали на основе анализа пролиферации (Cell Titer Glo, фирма Promega) (фиг. 10). В отличие от NK92-клеток свежевыделенные NK-клетки не экспрессируют CD25 (или экспрессируют очень небольшие количества). Результаты продемонстрировали, что иммуноконъюгат Fab-IL-2-Fab, содержащий IL-2 дикого типа, обладал примерно в 10 раз более низкой эффективностью в отношении индукции пролиферации NK-клеток, чем пролейкин, что является ожидаемым, учитывая примерно в 10 раз более низкую аффинность иммуноконъюгата Fab-IL-2 wt-Fab к гетеродимеру IL-2R  $\beta\gamma$ . Интродукция индивидуальных мутаций, влияющих на связывание с CD25, а также комбинации трех мутаций, влияющих на связывание с CD25, в трехмутантный IL-2 привела к получению конструкций Fab-IL-2-Fab, которые оказались сопоставимыми в пределах ошибки метода с конструкцией, содержащей IL-2 дикого типа, с позиций эффективности и абсолютной индукции пролиферации; обнаружен лишь очень небольшой сдвиг эффективности у трехмутантного Fab-IL-2-Fab. Во втором эксперименте оценивали индукцию пролиферации активированных ФГА Т-клеток после инкубации с взятыми в различных количествах пролейкином и иммуноконъюгатами Fab-IL-2-Fab (фиг. 11). Поскольку активированные Т-клетки экспрессируют CD25, выраженное снижение Т-клеточной пролиферации удалось обнаружить при инкубации с иммуноконъюгатами, содержащими IL-2 с одной из мутаций F42A, L72G или Y45A; в случае F42A продемонстрировано наиболее выраженное снижение, далее в порядке убывания действия располагались мутации L72G и Y45A, в то время как при применении Fab-IL-2 wt-Fab или Fab-IL-2 (T3A)-Fab активация сохранялась практически на таком же уровне, что и при применении пролейкина. Эти данные свидетельствуют о снижении аффинности к CD25 при оценке с помощью SPR (см. описанный выше пример). Комбинация трех мутаций, влияющих на связывание с CD25, в трехмутантном IL-2 приводит к получению иммуноконъюгата, который опосредует значительное снижение индукции Т-клеточной пролиферации в растворе. В контексте этих результатов при создании изобретения оценивали клеточную гибель Т-клеток с использованием окрашивания аннексином V/PI с последующей сверхстимуляцией, индуцированной первой стимуляцией, которую осуществляли путем 16-часовой обработки 1 мкг/мл ФГА, второй стимуляцией путем обработки в течение 5 дней пролейкином или соответственно иммуноконъюгатами Fab-IL-2-Fab, с последующей третьей стимуляцией путем обработки 1 мкг/мл ФГА. С помощью такого процесса было обнаружено, что индуцированная активацией клеточная гибель (AICD) у сверхстимулированных Т-клеток существенно снижалась при использовании иммуноконъюгатов Fab-IL-2-Fab, содержащих IL-2 с индивидуальными мутациями F42A, L72G и Y45A, влияющими на связывание с CD25, при этом при применении F42A и L72G обнаружено наиболее сильное снижение, которое оказалось сходным со снижением достигаемым при применении трех мутаций в иммуноконъюгате, содержащем трехмутантный IL-2 (фиг. 12). В последней серии экспериментов изучали воздействия Fab-IL-2 qm-Fab на индукцию фосфорилирования STAT5 в сравнении с Fab-IL-2 wt-Fab и пролейкином в человеческих NK-клетках, CD4 -Т-клетках, CD8 -Т-клетках и Treg-клетках из человеческих PBMC (фиг. 13). Для NK-клеток и CD8 -Т-клеток, для которых характерно отсутствие экспрессии или очень низкий уровень экспрессии CD25 (что означает, что передача сигналов IL-2R опосредуется гетеродимером IL-2R  $\beta\gamma$ ), установлено, что формат Fab-IL-2-Fab, содержащий IL-2 дикого типа, обладал примерно в 10 раз более низкой эффективностью в отношении индукции фосфорилирования STAT5, чем пролейкин, и что эффективность Fab-IL-2 qm-Fab оказалась сопоставимой с эффективностью конструкции Fab-IL-2 wt-Fab. В случае CD4-Т-клеток, для которых характерна быстрая повышающая регуляция CD25 при стимуляции, иммуноконъюгат Fab-IL-2 qm-Fab оказался менее эффективным, чем Fab-IL-2 wt-Fab, но все еще обладал сопоставимой способностью индуцировать передачу сигналов IL-2R при применении в насыщающих концентрациях. Это противоположно данным, полученным для T<sub>reg</sub>-клеток, для которых эффективность Fab-IL-2 qm-Fab была существенно более низкой по сравнению с эффективностью иммуноконъюгата Fab-IL-2 wt-Fab, из-за высокого уровня экспрессии на CD25 T<sub>reg</sub>-клетках и, как следствие, высокой аффинности связывания иммуноконъюгата Fab-IL-2 wt-Fab с CD25 на T<sub>reg</sub>-клетках. В результате аннулирования способности связываться с CD25 у иммуноконъюгата Fab-IL-2 qm-Fab передача сигналов IL-2 в T<sub>reg</sub>-клетках активируется только через гетеродимер IL-2R  $\beta\gamma$  при его применении в концентрациях, в которых передача сигналов IL-2R активирует CD25-негативные эффекторные клетки через гетеродимер IL-2R  $\beta\gamma$ . В целом, установлено, что четырехмутантный IL-2, указанный в настоящем описании, обладает способностью активи-

ровать передачу сигналов IL-2R через гетеродимер IL-2R  $\beta\gamma$ , но не приводит ни к AICD, ни к преимущественной стимуляции  $T_{reg}$ -клеток по сравнению с другими эффекторными клетками.

Пример 5.

Основываясь на данных, описанных в примерах 2 и 3, создавали иммуноконъюгаты с созревшей аффинностью (иммуноконъюгаты, содержащие Fab с созревшей аффинностью) Fab-IL-2 qm-Fab, мишенью которых является FAP, на основе клонов 28H1 или 29B11 и очищали их с использованием методов, описанных в разделе "Общие методы" В целом, созданный на основе 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab, мишенью которого является FAP, очищали с использованием одной стадии аффинной хроматографии (белок G) с последующей гель-фильтрацией (Супердекс 200). Для уравнивания колонки использовали 3ФР и супернатант пула стабильных СНО-клеток (CDCHO среда) вносили на колонку с белком G (фирма GE Healthcare), колонку промывали 3ФР и затем образцы элюировали 2,5 мМ HCl и фракции немедленно нейтрализовали 10 $\times$  3ФР. Гель-фильтрацию осуществляли в конечном буфере для продукта, имеющем следующий состав: 25 мМ фосфат натрия, 125мМ хлорид натрия, 100мМ глицин, pH 6,7 на колонке Супердекс 200. На фиг. 14 представлены профили элюции после очистки и результаты аналитической характеристики продукта с помощью ДСН-ПААГ (4-20% бис-трис-мини-гель NuPAGE Novex, фирма Invitrogen, подвижный буфер MOPS, восстанавливающие и невосстанавливающие условия). С учетом низкой связывающей способности 28H1 Fab-фрагмента с белком G и белком A применение дополнительных стадий захвата может приводить к более высоким выходам продукта.

Иммуноконъюгаты Fab-IL-2 qm-Fab на основе клонов 4G8, 3F2 и 29B11, мишенью которых является FAP, и Fab-IL-2 qm-Fab на основе клона MHLG1 KV9, мишенью которых является MCSF, очищали с помощью одной стадии аффинной хроматографии (белок A) с последующей гель-фильтрацией (Супердекс 200). Для уравнивания колонки использовали 20 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, pH 7,5 и супернатант вносили на колонку с белком A. Первую стадию промывки осуществляли с помощью 20 мМ фосфата натрия, 20 мМ цитрата натрия, pH 7,5, после чего осуществляли вторую стадию промывки, используя: 13,3 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, 500 мМ хлорид натрия, pH 5,45. Иммуноконъюгаты Fab-IL-2 qm-Fab элюировали с помощью 20 мМ цитрата натрия, 100 мМ хлорида натрия, 100 мМ глицина, pH 3. Гель-фильтрацию осуществляли в конечном буфере для продукта, имеющем следующий состав: 25 мМ фосфат калия, 125 мМ хлорид натрия, 100 мМ глицин, pH 6.7. На фиг. 15 представлены профили элюции после очистки и результаты аналитической характеристики продукта с помощью ДСН-ПААГ (4-20% бис-трис-мини-гель NuPAGE Novex, фирма Invitrogen, подвижный буфер MOPS, восстанавливающие и невосстанавливающие условия) иммуноконъюгата 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab, на фиг. 16 - иммуноконъюгата MHLG1 KV9 Fab-IL-2 qm-Fab.

Слитые белки IgG-IL-2 qm, мишенью которых является FAP, на основе антител к FAP 4G8, 4B9 и 28H1 и контрольный слитый "ненаправленный" белок на основе DP47GS IgG-IL-2 qm создавали согласно методам, описанным выше в разделе "Общие методы". На фиг. 46 и 47 соответственно представлены хроматограммы и профили элюции, полученные при очистке (А, Б), а также результаты аналитического ДСН-ПААГ и гель-фильтрации конечных очищенных конструкций (В, Г) иммуноконъюгатов на основе 4G8 и 28H1. Выходы после кратковременной экспрессии составляли 42 мг/л для иммуноконъюгата IgG-IL-2 qm на основе 4G8 и 20 мг/л для иммуноконъюгата IgG-IL-2 qm на основе 28H1.

Способность связывать FAP иммуноконъюгатов IgG-IL-2 qm на основе антител к FAP 4G8 и 28H1 определяли с помощью метода резонанса поверхностного плазмона (SPR) с использованием устройства Biacore в сравнении с соответствующими немодифицированными антителами типа IgG. В целом, метод состоял в следующем: антитело к His (Penta-His, фирма Qiagen, № 34660) иммобилизовали CM5-чипах для захвата 10 нМ меченого с помощью His человеческого FAP (20 с). Температура составляла 25 $^{\circ}$ C и в качестве буфера применяли HBS-EP. Концентрации анализируемой субстанции находились в диапазоне от 50 до 0,05 нМ, скорость потока составляла 50 мкл/мин (ассоциация: 300 с, диссоциация: 900 с, регенерация: 60 с помощью 10 мМ глицина, pH 2). Аппроксимацию осуществляли на основе модели связывания 1:1, RI = 0, Rmax = локальное значение (поскольку применяли формат захвата). В табл. 7 представлены оцененные кажущиеся величины аффинности (пМ, авидность), определенные с помощью SPR, аппроксимированные с использованием модели связывания 1:1, RI = 0, Rmax = локальное значение.

Таблица 7

$K_D$ [пМ]	Hu FAP
4G8 IgG-IL-2 qm	100
4G8 IgG	50
28H1 IgG-IL-2 qm	175
28H1 IgG	200

Полученные данные свидетельствуют о том, что в пределах ошибки метода аффинность к человеческому FAP сохраняется у иммуноконъюгата на основе 28H1 или слегка снижается у иммуноконъюгата на основе 4G8 по сравнению с соответствующими немодифицированными антителами.

Пример 6.

Аффинность иммуноконъюгатов с созревшей аффинностью Fab-IL-2-Fab на основе 28H1 и 29B11, мишенью которых является FAP, каждый из которых содержал дикого типа или четырехмутантный IL-2,

и Fab-IL-2 wt-Fab на основе 3F2 определяли с помощью резонанса поверхностного плазмона (SPR) в отношении гетеродимера IL-2R  $\beta\gamma$  человека, мышей или обезьян циномоглус, используя рекомбинантный гетеродимер IL-2R  $\beta\gamma$  в следующих условиях: лиганд: гетеродимер IL-2R Р"выступ"у"впадина" человека, мышей и обезьян циномоглус, иммобилизованный на CM5-чипе, анализируемая субстанция: 28H1 или 29B11 Fab-IL-2-Fab (содержащий дикого типа или четырехмутантный IL-2), 3F2 Fab-IL-2-Fab (содержащий IL-2 дикого типа), температура: 25 или 37°C, буфер: HBS-EP, концентрации анализируемой субстанции: от 200 до 2,5 нМ, скорость потока: 30 мкл/мин, ассоциация: 300 с, диссоциация: 300 с, регенерация: 60 с, 3M MgCl<sub>2</sub>, аппроксимация: модель связывания 1:1, RI $\neq$ 0, Rmax = глобальное значение. Аффинность иммуноконъюгатов на основе 28H1 и 29B11 с созревшей аффинностью Fab-IL-2-Fab, мишенью которых является FAP, каждый из которых содержал дикого типа или четырехмутантный IL-2, и Fab-IL-2 wt-Fab на основе 3F2 определяли с помощью резонанса поверхностного плазмона (SPR) в отношении  $\alpha$ -субъединицы IL-2R человека, мышей или обезьян циномоглус, используя рекомбинантную мономерную  $\alpha$ -субъединицу IL-2R в следующих условиях: лиганд:  $\alpha$ -субъединица IL-2R человека, мышей и обезьян циномоглус, иммобилизованная CM5-чипе, анализируемая субстанция: 28H1 или 29B11 Fab-IL-2-Fab (содержащий дикого типа или мутантный IL-2), 3F2 Fab-IL-2-Fab (содержащий IL-2 дикого типа), температура: 25°C или 37°C, буфер: HBS-EP, концентрации анализируемой субстанции: от 25 до 0,3 нМ, скорость потока: 30 мкл/мин, ассоциация: 120 с, диссоциация: 600 с, регенерация: отсутствует, аппроксимация: модель связывания 1:1, RI  $\neq$  0, Rmax = глобальное значение.

Результаты кинетического анализа с использованием гетеродимера IL-2R  $\beta\gamma$  представлены в табл. 8. Таблица 8. Связывание иммуноконъюгатов, содержащих Fab с созревшей аффинностью и мутантный

IL-2, с гетеродимерами IL-2R  $\beta\gamma$

К <sub>D</sub> в нМ	Hu IL-2R $\beta\gamma$ (25°C)	Hu IL-2R $\beta\gamma$ (37°C)	Cyno IL-2R $\beta\gamma$ (25°C)	Cyno IL-2R $\beta\gamma$ (37°C)	Mu IL-2R $\beta\gamma$ (25°C)	Mu IL-2R $\beta\gamma$ (37°C)
28H1 Fab-IL-2 wt-Fab	9,7 9	19 22	11,5 11,6	29,2 30,4	112 79	186 219
28H1 Fab-IL-2 qm-Fab	7,5 6,9	14,3 14,7	8,9 8,4	21,3 21,2	66 54	142 106
29B11 Fab-IL-2 wt-Fab	6,5 5,7	9,5 12,4	6,9 6,7	14 19	93 74	71 74
29B11 Fab-IL-2 qm-Fab	7,2 7,4	13,1 13	7,8 8,4	16,7 18,1	60 63	44 42
3F2 Fab-IL-2 wt-Fab	5 4,8	ND	6,4 6,1	ND	40 40	ND

Установлено, что в то время как аффинность человеческого IL-2 к человеческому димеру IL-2R  $\beta\gamma$  составляла примерно 1 нМ, иммуноконъюгаты Fab-IL-2-Fab (содержащие дикого типа или четырехмутантный IL-2), оба, обладали пониженной аффинностью (от 6 до 10 нМ), и, как описано выше, аффинность "оголенного" IL-2 к мышинному IL-2R была примерно в 10 слабее, чем к IL-2R человека и обезьян циномоглус.

Результаты кинетического анализа с использованием  $\alpha$ -субъединицы IL-2R представлены в табл. 9. В выбранных условиях отсутствует выявляемое связывание иммуноконъюгатов, содержащих четырехмутантный IL-2R с  $\alpha$ -субъединицей IL-2R человека, мышей или обезьян циномоглус.

Таблица 9. Связывание иммуноконъюгатов Fab-IL-2-Fab, содержащих Fab с созревшей аффинностью и мутантный IL-2, с  $\alpha$ -субъединицей IL-2R

К <sub>D</sub> в нМ	Hu IL-2R $\alpha$ (25°C)	Hu IL-2R $\alpha$ (37°C)	Cyno IL-2R $\alpha$ (25°C)	Cyno IL-2R $\alpha$ (37°C)	Mu IL-2R $\alpha$ (25°C)	Mu IL-2R $\alpha$ (37°C)
28H1 Fab-IL-2 wt-Fab	16 16,2	28,8 28,2	16 16,2	36,5 35,6	43,3 44	67,5 61,1
28H1 Fab-IL-2 qm-Fab	нет связывания	Нет связывания	нет связывания	нет связывания	нет связывания	нет связывания
29B11 Fab-IL-2 wt-Fab	5 4,6	7,6 7,7	4,8 4,3	7,3 7,4	11,4 9,6	13,3 13,8
29B11 Fab-IL-2 qm-Fab	нет связывания	Нет связывания	нет связывания	нет связывания	нет связывания	нет связывания
3F2 Fab-IL-2 wt-Fab	5,7 6,1	ND	5 5,4	ND	12,3 12,1	ND

Аффинность иммуноконъюгатов на основе MHLG1-KV9 Fab-IL-2-Fab, мишенью которых является MCSP, содержащих дикого типа или четырехмутантный IL-2, определяли с помощью резонанса поверхностного плазмона (SPR) в отношении человеческого гетеродимера IL-2R  $\beta\gamma$ , используя рекомбинантный гетеродимер IL-2R  $\beta\gamma$ , в следующих условиях: человеческий гетеродимер IL-2R  $\beta\gamma$  "выступ"  $\gamma$  "впадина", иммобилизованный на CM5-чипе (1600 RU). MHLG1-KV9 Fab-IL-2 wt-Fab и Fab-IL-2 qm-Fab применяли в качестве анализируемых субстанций при 25°C в буфере HBS-P. Концентрации анализируемых субстанций при изучении в отношении IL-2R  $\beta\gamma$  составляли от 300 до 0,4 нМ (разведение 1:3), скорость про-

тока 30 мкл/мин, (продолжительность ассоциации 180 с, продолжительность диссоциации 300 с). Регенерацию в случае IL-2R  $\beta\gamma$  осуществляли, используя  $2 \times 30$  с 3 М  $MgCl_2$ . Данные аппроксимировали на основе модели связывания 1:1,  $RI \neq 0$ ,  $R_{max}$  = локальное значение в случае IL-2R  $\beta\gamma$ .

Аффинность иммуноконъюгатов Fab-IL-2-Fab на основе MHLG1-KV9, мишенью которых является MCSP, содержащих дикого типа или четырехмутантный IL-2, определяли с помощью резонанса поверхностного плазмона (SPR) в отношении человеческой  $\alpha$ -субъединицы IL-2R, используя рекомбинантную мономерную  $\alpha$ -субъединицу IL-2R в следующих условиях: человеческая  $\alpha$ -субъединица IL-2R, иммобилизованная на CM5-чипе (190 RU). MHLG1-KV9 Fab-IL-2 wt-Fab и Fab-IL-2 qm-Fab применяли в качестве анализируемых субстанций при 25°C в буфере HBS-P. Концентрации анализируемых субстанций при изучении в отношении IL-2R  $\alpha$  составляли от 33,3 до 0,4 нМ (разведение 1:3), скорость потока 30 мкл/мин, (продолжительность ассоциации 180 с, продолжительность диссоциации 300 с). Регенерацию в случае IL-2R  $\alpha$  осуществляли в течение 10 с с использованием 50мМ NaOH. Данные аппроксимировали на основе модели связывания 1:1,  $RI \neq 0$ ,  $R_{max}$  = глобальное значение в случае IL-2R  $\alpha$ .

Результаты кинетического анализа с использованием гетеродимера IL-2R  $\beta\gamma$  представлены в табл. 10.

Таблица 10

$K_D$ в нМ $T = 25^\circ C$	Hu IL 2R $\beta\gamma$ (кинетики)	Hu IL 2R $\alpha$ (кинетики)	Hu IL 2R $\alpha$ (стационарное состояние)
MHLG1-KV9 Fab-IL-2 wt-Fab	8,6 9,8	8,8 10,1	6,8 10,9
MHLG1-KV9 Fab-IL 2 qm-Fab	7,3 10,7	нет связывания	нет связывания

Данные подтверждают, что иммуноконъюгат MHLG1-KV9 Fab-IL-2 qm-Fab, мишенью которого является MCSP, сохранял аффинность к IL-2R  $\beta\gamma$ -рецептору, в то время как аффинность связывания с CD25 утрачивалась по сравнению с иммуноконъюгатом, содержащим IL-2 дикого типа.

Далее определяли аффинность иммуноконъюгатов IgG-IL-2 qm на основе 4G8 и 28H1 к гетеродимеру IL-2R  $\beta\gamma$  и  $\alpha$ -субъединице IL-2R с помощью резонанса поверхностного плазмона (SPR), осуществляя непосредственное сравнение с форматом Fab-IL-2 qm-Fab иммуноконъюгата. В целом, метод состоял в следующем: лиганды - либо  $\alpha$ -субъединицу человеческого IL-2R, либо гетеродимер человеческого IL-2R  $\beta\gamma$ -иммобилизовали на CM5-чипе. Затем на чип наносили иммуноконъюгаты IgG-IL-2 qm на основе 4G8 и 28H1, либо иммуноконъюгаты Fab-IL-2 qm-Fab на основе 4G8 и 28H1 в качестве анализируемых субстанций при 25°C в HBS-EP-буфере в концентрациях от 300 до 1,2 нМ (разведение 1:3). Скорость потока составляла 30 мкл/мин и применяли следующие условия: ассоциация: 180 с, диссоциация: 300 с и регенерация:  $2 \times 30$  с при использовании 3М  $MgCl_2$  в случае гетеродимера IL-2R  $\beta\gamma$ , 10 с при использовании 50мМ NaOH в случае  $\alpha$ -субъединицы IL-2R. Для аппроксимации применяли модель связывания 1:1 (связывание 1:1,  $RI \neq 0$ ,  $R_{max}$  = локальное значение для IL-2R  $\beta\gamma$ , кажущаяся величина  $K_D$ , связывание  $RI = 0$ ,  $R_{max}$  = локальное значение для IL-2R  $\alpha$ ). Соответствующие величины  $K_D$  представлены в табл. 11.

Таблица 11

Кажущаяся величина $K_D$ [нМ]	Hu IL-2R $\beta\gamma$	Hu IL-2R $\alpha$
4G8 IgG-IL-2 qm	5,9	нет связывания
4G8 Fab-IL-2 qm-Fab	10,4	нет связывания
28H1 IgG-IL-2 qm	6,2	нет связывания
28H1 Fab-IL-2 qm-Fab	11,4	нет связывания

Данные демонстрируют, что иммуноконъюгаты IgG-IL-2 qm на основе 4G8 и 28H1 связывались по меньшей мере с такой же высокой аффинностью, что и иммуноконъюгаты Fab-IL-2 qm-Fab, с гетеродимером IL-2R  $\beta\gamma$ , в то время как они не связывались с  $\alpha$ -субъединицей IL-2R из-за интродукции мутаций, которые оказывают воздействие на связывание с CD25. По сравнению с соответствующими иммуноконъюгатами Fab-IL-2 qm-Fab аффинность слитых белков IgG-IL-2 qm, вероятно, несколько повышается в пределах погрешности метода.

Пример 7.

При создании изобретения в первой серии экспериментов при оценке с помощью FACS было подтверждено, что иммуноконъюгаты Fab-IL-2-Fab, мишенью которых является FAP, содержащие либо дикого типа, либо мутантный IL-2, обладали способностью связываться с экспрессирующими человеческий FAP клетками линии НЕК 293-FAP (фиг. 17) и что наличие в IL-2 четырех мутаций не влияло на связывание с экспрессирующими FAP клетками (фиг. 18).

Таблица 12. Связывание иммуноконъюгатов Fab-IL-2-Fab с экспрессирующими FAP НЕК-клетками

Значения EC <sub>50</sub>	(нМ)
28Н1 Fab-IL-2-Fab	0,64
28Н1 Fab-IL-2 qm-Fab	0,70
29В11 Fab-IL-2-Fab	0,66
29В11 Fab-IL-2 qm-Fab	0,85
4G8 Fab-IL-2-Fab	0,65

В частности, в этих экспериментах по оценке связывания установлено, что связывающие FAP агенты в виде Fab-IL-2 qm-Fab 28Н1, 29В11, 14В3 и 4В9 с созревшей аффинностью обладали повышенной абсолютной способностью к связыванию с клетками-мишенями НЕК 293-FAP по сравнению с иммуноконъюгатами Fab-IL-2-Fab на основе родительских связывающих FAP агентов 3F2 (29В11, 14В3, 4В9) и 4G8 (28Н1) (фиг. 17), сохраняя при этом высокую специфичность и отсутствие связывания с НЕК 293-клетками, трансфектированными DPPIV, близким гомологом FAP, или НЕК 293-клетками, трансфектированными имитатором. В качестве положительного контроля применяли мышинное антитело к человеческому CD26-PE DPPIV, клон М-А261 (фирма BD Biosciences, № 555437) (фиг. 19). Анализ способности к интернализации продемонстрировал, что связывание иммуноконъюгатов Fab-IL-2-Fab не приводит к индукции интернализации FAP (фиг. 20).

В другом эксперименте с помощью FACS оценивали связывание иммуноконъюгатов IgG-IL-2 qm и Fab-IL-2 qm-Fab на основе 4G8, мишенью которых является FAP, с человеческим FAP, который экспрессируется на стабильно трансфектированных НЕК293-клетках. Результаты представлены на фиг. 48. Данные демонстрируют, что иммуноконъюгат IgG-IL-2 qm связывается с экспрессирующими FAP клетками, что характеризуется значением EC<sub>50</sub> составляющим 0,9 нМ, сопоставимым со значением, которое соответствует конструкции Fab-IL-2 qm-Fab на основе 4G8 (0,7 нМ).

Затем иммуноконъюгаты с созревшей аффинностью Fab-IL-2-Fab, мишенью которых является FAP, содержащие IL-2 дикого типа или четырехмутантный IL-2, тестировали с использованием клеточных анализов в сравнении с пролейкином согласно методам, описанным выше в примерах.

Оценивали с помощью ELISA индуцируемое IL-2 высвобождение IFN- $\gamma$  в супернатанте после инкубации NK-клеток линии NK92 с указанными иммуноконъюгатами (фиг. 21) в течение 24 ч. NK92-клетки экспрессируют на своей поверхности CD25. Результаты продемонстрировали, что иммуноконъюгат Fab-IL-2-Fab, который содержал IL-2 дикого типа, обладал меньшей способностью индуцировать высвобождение IFN- $\gamma$  по сравнению с пролейкином, что является ожидаемым с учетом примерно в 10 раз более низкой аффинности иммуноконъюгата Fab-IL-2 wt-Fab к гетеродимеру IL-2R  $\beta\gamma$ . Иммуноконъюгаты Fab-IL-2 qm-Fab оказались практически сопоставимыми с соответствующей конструкцией дикого типа выбранного клона с позиций эффективности и абсолютной индукции высвобождения IFN- $\gamma$ , несмотря на тот факт, что NK92-клетки экспрессируют в некотором количестве CD25. Однако было установлено, что конструкция 29В11 Fab-IL-2 qm-Fab индуцировала меньший уровень высвобождения цитокина по сравнению с конструкциями 29В11 Fab-IL-2 wt-Fab, а также 28Н1- и 4G8-конструкциями, для которых обнаружен лишь небольшой сдвиг эффективности Fab-IL-2 qm-Fab относительно Fab-IL-2 wt-Fab.

Кроме того, иммуноконъюгат Fab-IL-2 qm-Fab на основе MHLG1-KV9, мишенью которого является MCSP, сравнивали с иммуноконъюгатами Fab-IL-2 qm-Fab на основе 28Н1 и 29В11 с использованием анализа высвобождения IFN- $\gamma$  на NK92-клетках. Как продемонстрировано на фиг. 22, иммуноконъюгат Fab-IL-2 qm-Fab на основе MHLG1-KV9, мишенью которого является MCSP, практически сопоставим по способности индуцировать высвобождение IFN- $\gamma$  с иммуноконъюгатами Fab-IL-2 qm-Fab, мишенью которых является FAP.

Затем оценивали индукцию пролиферации NK92-клеток с помощью IL-2 в течение 3 дней с использованием анализа пролиферации, основанного на измерении АТФ, с помощью CellTiter Glo (фирма Promega) (фиг. 23). С учетом того, что NK92-клетки экспрессируют низкие уровни CD25, различие между иммуноконъюгатами Fab-IL-2-Fab, содержащими IL-2 дикого типа, и иммуноконъюгатами, содержащими четырехмутантный IL-2, можно выявлять с помощью анализа пролиферации, однако в условиях насыщения обоими для достижения сходной абсолютной индукции пролиферации.

В следующем эксперименте оценивали воздействие иммуноконъюгата на основе 28Н1 с созревшей аффинностью Fab-IL-2 qm-Fab, мишенью которого является FAP, на индукцию фосфорилирования STAT5 в сравнении с 28Н1 Fab-IL-2 wt-Fab и пролейкином с использованием человеческих NK-клеток, CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, CD8<sup>+</sup>-Т-клеток и T<sub>reg</sub>-клеток из человеческих PBMC (фиг. 24). Для NK-клеток и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток, для которых характерно отсутствие или очень низкий уровень экспрессии CD25 (т.е. передача сигналов IL-2R происходит через гетеродимер IL-2R  $\beta\gamma$ ), результаты продемонстрировали, что иммуноконъюгат Fab-IL-2-Fab, содержащий IL-2 дикого типа, обладал примерно >10 раз более низкой способностью индуцировать высвобождение IFN- $\gamma$  по сравнению с пролейкином и что иммуноконъюгат Fab-IL-2 qm-Fab был лишь немного более эффективным по сравнению с конструкцией Fab-IL-2 wt-Fab. На CD4<sup>+</sup>-Т-клетках продемонстрирована быстрая повышающая регуляция CD25 при стимуляции, иммуноконъю-



гат Fab-IL-2 qm-Fab оказался значительно менее эффективным, чем Fab-IL-2 wt-Fab, но все еще сохранял сопоставимую способность индуцировать передачу сигналов IL-2R при применении в насыщающих концентрациях. Это противоположно действию, обнаруженному при применении T<sub>reg</sub>-клеток, для которых эффективность Fab-IL-2 qm-Fab оказалась существенно более низкой по сравнению с эффективностью конструкции Fab-IL-2 wt-Fab вследствие высокого уровня экспрессии CD25 на T<sub>reg</sub>-клетках и в результате этого высокой аффинности связывания конструкции Fab-IL-2 wt-Fab с CD25 на T<sub>reg</sub>-клетках. В результате утраты способности связываться с CD25 у иммуноконъюгата Fab-IL-2 qm-Fab, передача сигналов IL-2 в T<sub>reg</sub>-клетках активируется только через гетеродимер IL-2R βγ при применении в концентрациях, в которых передача сигналов IL-2R активируется в CD25-негативных эффекторных клетках через гетеродимер IL-2R βγ. Соответствующие значения EC<sub>50</sub> (в пМ) представлены в табл. 13.

Таблица 13. Индукция высвобождения IFN-γ из NK-клеток иммуноконъюгатами Fab-IL-2-Fab на основе 28H1, мишенью которых является FAP, содержащими мутантные полипептиды IL-2

EC <sub>50</sub> [пМ]	NK-клетки	CD8 <sup>+</sup> -Т-клетки	CD4 <sup>+</sup> -Т-клетки	T <sub>reg</sub> -клетки
пролейкин	222	1071	92	1
28H1 Fab-IL-2 wt-Fab	3319	14458	3626	15
28H1 Fab-IL-2 qm-Fab	3474	20583	70712	19719

В другой серии экспериментов изучали биологическую активность иммуноконъюгатов на основе 4G8 IgG-IL-2 qm и Fab-IL-2 qm-Fab, мишенью которых является FAP, с использованием нескольких клеточных анализов.

Иммуноконъюгаты на основе 4G8 IgG-IL-2 qm и Fab-IL-2 qm-Fab на основе 28H1, мишенью которых является FAP, исследовали в отношении индукции высвобождения IFN-γ NK92-клетками, что индуцируется активацией передачей сигналов IL-2R βγ. На фиг. 49 продемонстрировано, что иммуноконъюгат IgG-IL-2 qm на основе 4G8, мишенью которого является FAP, обладал такой же эффективностью в отношении индукции высвобождения IFN-γ, что и иммуноконъюгат с созревшей аффинностью Fab-IL-2 qm-Fab на основе 28H1.

При создании изобретения изучали также воздействие иммуноконъюгата IgG-IL-2 qm на основе 4G8, мишенью которого является FAP, на индукцию фосфорилирования STAT5 в сравнении с иммуноконъюгатами Fab-IL-2 wt-Fab и Fab-IL-2 qm-Fab на основе 28H1, а также пролейкином с использованием человеческих NK-клеток, CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, CD8<sup>+</sup>-Т-клеток и T<sub>reg</sub>-клеток из человеческих РВМС. Результаты этих экспериментов представлены на фиг. 50. Для NK-клеток и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток установлено, что иммуноконъюгат IgG-IL-2 qm на основе 4G8 обладал примерно >10 раз более низкой способностью индуцировать фосфорилирование STAT5 по сравнению с пролейкином, но несколько более высокой эффективностью по сравнению с иммуноконъюгатами Fab-IL-2 wt-Fab и Fab-IL-2 qm-Fab на основе 28H1. Для CD4<sup>+</sup>-Т-клеток иммуноконъюгат IgG-IL-2 qm на основе 4G8 оказался менее эффективным, чем иммуноконъюгат Fab-IL-2 wt-Fab на основе 28H1, но не несколько более эффективным, чем иммуноконъюгат Fab-IL-2 qm-Fab на основе 28H1, для этого иммуноконъюгата установлена также способность индуцировать передачу сигналов IL-2R при применении в насыщающих концентрациях, сопоставимая со способностью пролейкина и Fab-IL-2 wt-Fab на основе 28H1. Это противоположно действию, обнаруженному при использовании T<sub>reg</sub>-клеток, для которых эффективность иммуноконъюгата IgG-IL-2 qm на основе 4G8 и иммуноконъюгата Fab-IL-2 qm-Fab на основе 28H1 оказалась несколько более низкой по сравнению с иммуноконъюгатом Fab-IL-2 wt-Fab.

Взятые в совокупности, полученные данные демонстрируют, что четырехмутантный IL-2, представленный в настоящем описании, обладает способностью активировать передачу сигналов IL-2R через гетеродимер IL-2R βγ, аналогично способности IL-2 дикого типа, но не приводит к более преимущественной стимуляции T<sub>reg</sub>-клеток по сравнению с другими эффекторными клетками.

#### Пример 8.

Противоопухолевое действие иммуноконъюгатов Fab-IL-2 qm-Fab, мишенью которых является FAP, оценивали *in vivo* в сравнении с иммуноконъюгатами Fab-IL-2 wt-Fab, мишенью которых является FAP, на моделях с использованием ксенотрансплантатов ACHN и сингенных моделей LLC1. Все иммуноконъюгаты Fab-IL-2-Fab, мишенью которых является FAP (содержащие дикого типа или четырехмутантный IL-2), распознавали мышинный FAP, а также мышинный IL-2R. Поскольку модели с использованием ксенотрансплантатов ACHN, созданные на SCID-мышьях, трансгенных по человеческому FcγRIII, давали выраженную позитивную реакцию на FAP при оценке методом иммуногистохимии (ИГХ), то указанная модель представляет собой модель с нарушенной иммунологической реактивностью и может отражать только иммунные эффекторные механизмы, опосредуемые NK-клетками и/или макрофагами/моноцитами, но лишенную опосредуемого Т-клетками иммунитета, и поэтому эта модель не может отражать AICD или действия, опосредуемые T<sub>reg</sub>-клетками. В отличие от вышеуказанной модели сингенная модель LLC1, созданная на полностью иммунокомпетентных мышьях, может также отражать адаптивные опосредуемые Т-клетками иммунные эффекторные механизмы, но отличается очень низким уровнем экспрессии FAP в мышинной строме. Таким образом, каждая из указанных моделей частично

отражает ситуацию, характерную для человеческих опухолей.

**Модель, созданная с использованием ксенотрансплантата почечноклеточной карциномы линии ACHN**

Иммуноконъюгаты 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab и 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab, мишенью которых является FAP, тестировали с использованием клеток клеточной линии человеческой почечноклеточной аденокарциномы ACHN, которые инъецировали в почки SCID-мышей, трансгенных по человеческому FcγRIII. ACHN-клетки исходно получали из ATCC (Американская коллекция типовых культур) и после размножения депонировали в собственном (внутреннем) банке клеток фирмы Glucart. ACHN-клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FCS, при 37°C в насыщенной водяными парами атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Полученный *in vitro* пассаж 18 применяли для внутрипочечной инъекции, его жизнеспособность составляла 98,4%. Делали небольшой надрез (2 см) в правой боковой области и брюшной стенке анестезированных SCID-мышей. Подкапсулярно в почку инъецировали 50 мкл суспензии (1×10<sup>6</sup> ACHN-клеток в среде AimV) (2мМ). Раны на коже и брюшную стенку закрывали с помощью скобок. Самок SCID-FcγRIII мышей (линия GLYCART-RCC), возраст которых в начале эксперимента составлял 8-9 недель (осемененные на фирме RCC, Швейцария), содержали в специфических условиях без патогенов с суточными циклами 12 ч света/12 ч темноты согласно принятым руководствам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол экспериментального исследования был рассмотрен и одобрен местными органами управления (P 2008016). После доставки животных выдерживали одну неделю для акклиматизации к новому окружению и для обследования. Регулярно осуществляли мониторинг состояния здоровья. Мышам инъецировали в почку в день опыта 0 по 1×10<sup>6</sup> ACHN-клеток, произвольно разделяли на группы и взвешивали. Через 1 неделю после инъекции опухолевых клеток мышам инъецировали *i.v.* 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab и 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab три раза в неделю в течение трех недель. Всем мышам инъецировали *i.v.* по 200 мкл соответствующего раствора. Мышам из группы, обработанной наполнителем, инъецировали ЗФР, мышам из групп обработки - иммуноконъюгат 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab или 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab. Для получения соответствующего количества иммуноконъюгата на 200 мкл маточные растворы разводили при необходимости ЗФР. На фиг. 25 продемонстрирована опосредуемая иммуноконъюгатами как 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab, так и 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab высокая эффективность на основе таких критериев, как повышенная медианная выживаемость, по сравнению с обработанной наполнителем группой, при этом эффективность иммуноконъюгата 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab оказалась более высокой, чем эффективность иммуноконъюгата 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab.

Таблица 14-А

Соединение	Доза	Состав буфера	Концентрация (мг/мл)
4G8 Fab-IL-2-Fab дикого типа, т.е. FAP 4G8 wt	20 мкг	25мМ фосфат калия, 125мМ NaCl, 100мМ глицин, рН 6,7	1,45
4G8 Fab-IL-2-Fab четырехмутантный, т.е. FAP 4G8 qm	20 мкг	25мМ фосфат калия, 125мМ NaCl, 100мМ глицин, рН 6,7	4,25

**Сингенная модель карциномы легкого Льюиса LLC1**

Иммуноконъюгаты 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab и 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab, мишенью которых является FAP, тестировали с использованием клеточной линии мышинной карциномы легкого Льюиса LLC1, для создания которой осуществляли *i.v.*-инъекцию мышам линии Black 6. Исходные клетки карциномы легкого Льюиса LLC1 получали из ATCC и после размножения депонировали во внутреннем банке клеток фирмы Glucart. Линию опухолевых клеток культивировали согласно общепринятым методам в среде DMEM, содержащей 10% FCS (фирма Gibco), при 37°C в насыщенной водяными парами атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Пассаж 10 применяли для трансплантации, его жизнеспособность составляла 97,9%. По 2×10<sup>5</sup> клеток на животное инъецировали *i.v.* в хвостовую вену в 200 мкл среды для культуры клеток Aim V (фирма Gibco). Мышей линии Black 6 (фирма Charles River, Германия), возраст которых в начале эксперимента составлял 8-9 недель, содержали в специфических условиях без патогенов с суточными циклами 12 ч света/12 ч темноты согласно принятым руководствам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол экспериментального исследования был рассмотрен и одобрен местными органами управления (P 2008016). После доставки животных выдерживали одну неделю для акклиматизации к новому окружению и для обследования. Регулярно осуществляли мониторинг состояния здоровья. Мышам инъецировали *i.v.* В день опыта 0 по 2×10<sup>5</sup> LLC1-клеток, произвольно разделяли на группы и взвешивали. Через 1 неделю после инъекции опухолевых клеток мышам инъецировали *i.v.* 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab или 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab три раза в неделю в течение трех недель. Всем мышам *i.v.* инъецировали по 200 мкл соответствующего раствора. Мышам из группы, обработанной наполнителем, инъецировали ЗФР, мышам из групп обработки -конструкцию 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab или 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab. Для получения соответствующего количества иммуноконъюгата на 200 мкл маточные растворы разводили при необходимости ЗФР. На фиг.

26 продемонстрировано, что конструкция 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab или конструкция с созревшей аффинностью 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab обладали более высокой эффективностью согласно таким критериям, как повышенная медианная выживаемость, при сравнении с обработанной наполнителем группой.

Таблица 14-Б

Соединение	Доза	Состав буфера	Концентрация (мг/мл)
28H1 Fab-IL-2-Fab четырехмутантный, т.е. FAP 28H1 qm	30 мкг	25мМ фосфат калия, 125мМ NaCl, 100мМ глицин, pH 6,7	2,74
4G8 Fab-IL-2-Fab четырехмутантный, т.е. FAP 4G8 qm	30 мкг	25мМ фосфат калия, 125мМ NaCl, 100мМ глицин, pH 6,7	4,25

В другом эксперименте тестировали иммуноконъюгаты 28H1 Fab-IL-2 wt-Fab и 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab, мишенью которых является FAP, с использованием такой же модели мышинной карциномы легкого Льюиса, созданной с помощью клеточной линии LLC1, для получения которой осуществляли i.v.-инъекцию мышам линии Black 6. Пассаж 9 применяли для трансплантации, его жизнеспособность составляла 94,5%. По  $2 \times 10^5$  клеток на животное инъецировали i.v. в хвостовую вену в 200 мкл среды для культуры клеток Aim V (фирма Gibco). Мышам инъецировали i.v. В день опыта 0 по  $2 \times 10^5$  LLC1-клеток, произвольно разделяли на группы и взвешивали. Через 1 неделю после инъекции опухолевых клеток мышам инъецировали i.v. 28H1 Fab-IL-2 wt-Fab или 28H1

Fab-IL-2 qm-Fab три раза в неделю в течение трех недель. Всем мышам инъецировали i.v. по 200 мкл соответствующего раствора. Мышам из группы, обработанной наполнителем, инъецировали ЗФР, мышам из групп обработки -конструкцию 28H1 Fab-IL-2 wt-Fab или 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab. Для получения соответствующего количества иммуноконъюгата на 200 мкл маточные растворы разводили при необходимости ЗФР. На фиг. 27 продемонстрировано, что иммуноконъюгаты 28H1 Fab-IL-2 wt-Fab и 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab обладали более высокой эффективностью согласно таким критериям, как повышенная медианная выживаемость, при сравнении с обработанной наполнителем группой, при этом эффективность иммуноконъюгата 28H1 Fab-IL-2 wt-Fab была несколько более высокой, чем иммуноконъюгата 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab.

Таблица 14-В

Соединение	Доза	Состав буфера	Концентрация (мг/мл)
28H1 Fab-IL-2-Fab четырехмутантный= FAP 28H1 qm	45 мкг	25мМ фосфат калия, 125мМ NaCl, 100мМ глицин, pH 6,7	2,74
28H1 Fab-IL-2-Fab дикого типа= FAP 28H1 wt	45 мкг	25мМ фосфат калия, 125мМ NaCl, 100мМ глицин, pH 6,7	1,66

Пример 9.

Затем осуществляли семидневное сравнительное исследование иммуноконъюгата Fab-IL-2 qm-Fab на основе 4G8, мишенью которого является FAP, и иммуноконъюгата Fab-IL-2 wt-Fab на основе 4G8, мишенью которого является FAP, для оценки токсичности при внутривенном введении и токсикокинетического анализа с использованием мышей линии Black 6 в табл.15 представлен план эксперимента по оценке токсичности и токсикокинетического анализа.

Таблица 15. План эксперимента

Групп	Тип	Доза [мкг/г]	Назначение	
1	D-ЗФР	0	титрометрический анализ токсичности	
2	4G8 Fab-IL-2 wt-Fab	4,5		
3		9,0		
4		4,5		
5	4G8 Fab-IL-2 qm-Fab	9,0		
6	4G8 Fab-IL-2 wt-Fab	4,5	токсикокинетический анализ	
7		9,0		
8		4G8 Fab-IL-2 qm-Fab		4,5
9		9,0		

Цель данного исследования заключалась в характеристике и сравнении профилей токсичности и проведении токсикокинетического анализа иммуноконъюгата 4G8 Fab-IL-2-Fab, содержащего интерлейкин-2 (IL-2) дикого типа, мишенью которого является FAP, и иммуноконъюгата 4G8 Fab-IL-2-Fab, содержащего четырехмутантный IL-2 (qm), мишенью которого является FAP, после ежедневных внутривенных введений не имеющим опухоль самцам мышей в течение 7 дней. Для этого исследования пяти группам по 5 самцов мышей/группу вводили внутривенно по 0 (используя наполнитель в качестве контроля), 4,5 или 9 мкг/г/день wt IL-2 или 4,5 или 9 мкг/г/день qm IL-2. Еще четырем группам мышей по 6 самцов мышей/группу вводили 4,5 или 9 мкг/г/день wt IL-2 или 4,5 или 9 мкг/г/день qm IL-2 для осуще-

ствления токсикокинетических анализов. Продолжительность исследования варьировалась от 7 до 5 дней в зависимости от клинических признаков, обнаруженных у животных, которым вводили 4,5 и 9 мкг/г/день wt IL-2. Оценка токсичности основывалась на смертности, прижизненных наблюдениях, весе тела и клинической и анатомической патологии. У животных в различные моменты времени отбирали образцы крови в группах, предназначенных для токсикокинетического анализа, для осуществления токсикокинетического анализа. Данные токсикокинетического анализа продемонстрировали, что у мышей, обработанных wt IL-2 или qm IL-2, обнаружены выявляемые уровни в плазме вплоть до момента последнего взятия образца крови, что свидетельствует о том, что мыши подвергаются воздействию соответствующими соединениями в процессе обработки. Значения  $AUC_{0-inf}$  полученные в день 1, позволяют предположить наличие сопоставимой экспозиции wt IL-2 и qm IL-2 при применении в обеих дозах. Несколько образцов отбирали в день 5 и в них обнаружены концентрации в плазме, эквивалентные концентрациям, обнаруженным в день 1, что позволяет предположить отсутствие накопления любого соединения после 5 дней дозирования. Более конкретно, были получены следующие данные.

#### Токсикокинетика (ТК)

В табл. 16 обобщены усредненные токсикокинетические параметры в плазме для 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab, мишенью которого является FAP, и 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab, мишенью которого является FAP, полученные с использованием программы WinNonLin, версия 5.2.1 и поступающего в продажу каппа-специфического ELISA (набор для ELISA для количественной оценки человеческой каппа-цепи, фирма Bethyl Laboratories).

Таблица 16

Параметр	Единицы	Группа 6, 4G8-FAP IL-2 дикого типа	Группа 7, 4G8-FAP IL-2 дикого типа	Группа 8, 4G8-FAP мутантный IL-2	Группа 9, 4G8-FAP мутантный IL-2
Сmax	нг/мл	47198	97986	60639	146416
Сmax/дозу	(нг/мл) (мкг/г)	0,011	0,011	0,0135	0,016
AUC	нг×ч/мл	331747	747499	355030	926683
AUC/дозу	нг×ч/мл(мкг/г)	0,074	0,083	0,079	0,103
T1/2z	ч	3,6	3,11	4, 3	3,12
исходная доза	мкг/г	4,5	9	4,5	9
путь введения		IV	IV	IV	IV

ТК-параметры рассчитывали с помощью программы WinNonLin, версия 5.2.1, используя некомпартментальный анализ

Индивидуальные концентрации в сыворотке представлены ниже:

Группа (доза)	День отбора крови	Время (ч)	Животные	Конц. в сыворотке (нг/мл)	Средняя конц. (нг/мл)
Группа 6 (4,5 мкг/г) 4G6 Fab-IL2-Fab WT	1	1	26	64241	47198
			27	30155	
	1	5,5	28	14693	15784
			29	16875	
	1	24	30	318	419
			31	520	
	5	5,5	29	13061	13335
			30	13620	
31			13325		
Группа 7 (9 мкг/г) 4G6 Fab-IL2-Fab WT	1	1	32	101208	97986
			33	94764	
	1	5,5	34	35766	34062
			35	32359	
	1	24	36	573	580
			37	588	
	5	5,5	32	31779	37473
			33	51143	
35			53409		
36			13562		
Группа 8 (4,5 мкг/г) 4G6 Fab-IL2-Fab мутант	1	1	38	73326	60639
			39	47953	
	1	5,5	40	12168	13269
			41	14371	
	1	24	42	494	490
			43	487	
	5	5,5	40	6561	10957
			41	15352	
5	24	38	608	721	
		39	543		
42			1298		
43			437		
Группа 9 (9 мкг/г) 4G6 Fab-IL2-Fab мутант	1	1	44	162970	146416
			45	129862	
	1	5,5	46	20475	24800
			47	29125	
	1	24	48	478	493
			49	509	

Группа (доза)	День отбора крови	Время (ч)	Животные	Конц. в сыворотке (нг/мл)	Средняя конц. (нг/мл)
	5	5,5	46 47	20504 75557	48031
	5	24	44 45 48 49	634 796 661 719	703

Эти данные демонстрируют, что как 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab, так и 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab обладали сопоставимыми фармакокинетическими свойствами, но для 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab имела место несколько более высокая экспозиция.

#### Смертность

В группе, обработанной 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab, мишенью которого является FAP, в дозе 9 мкг/г, одно животное погибло в результате обработки, проведенной в день 5. Перед гибелью у него обнаружена пониженная активность, холодная кожа и сгорбленная поза. Указанное животное, вероятно, погибло в результате комбинации клеточной инфильтрации в легкое, которая сопровождалась отеком и кровоизлиянием, и заметного некроза костного мозга. Данные о смертности обобщены в табл.17.

Таблица 17. Смертность в день 5

Группа	Тип	Доза [мкг/г]	Обнаруженная гибель	Серьезная токсичность/ умерщвление**	Всего
1	D-3ФП	0	0/5	0/5	0/5
2	4G8 Fab-IL-2 wt-Fab	4,5	0/5	5/5	5/5
3	Fab	9	1/5*	4/5	4/5
4	4G8 Fab-IL-2 qm-Fab	4,5	0/5	0/5	0/5
5	Fab	9	0/5	0/5	0/5
6	4G8 Fab-IL-2 wt-Fab	4,5	1/6	5/6	6/6
7		9	2/6	4/6	6/6
8	4G8 Fab-IL-2 qm-Fab	4,5	0/6	0/6	0/6
9		9	0/6	0/6	0/6

\* до аутопсии

\*\* исследование планировали осуществлять в течение 7 дней, но у всех мыши, обработанных иммуноконъюгатом, содержащим IL-2 дикого типа, обнаружены поражения к дню 5 и их умерщвляли, поскольку отсутствовала вероятность их выживания

#### Клинические обследования

Такие признаки, как пониженная активность, холодная кожа и сгорбленная поза, обнаружены у животных которых обрабатывали wt IL-2 в дозах 4,5 и 9 мкг/г/день. Данные клинических обследований обобщены в табл. 18.

Таблица 18. Клинические обследования в день 5

Группа	Тип	Доза [мкг/г]	Сгорбленная поза	Пониженная активность	Холодное на ощупь тело
1	D-3ФП	0	0/5	0/5	0/5
2	4G8 Fab-IL-2 wt-Fab	4,5	4/5	4/5	5/5
3	Fab	9	5/5	5/5	5/5
4	4G8 Fab-IL-2 qm-Fab	4,5	0/5	0/5	0/5
5	Fab	9	0/5	0/5	0/5
6	4G8 Fab-IL-2 wt-Fab	4,5	6/6	2/6	2/6
7		9	6/6	5/6	6/6
8	4G8 Fab-IL-2 qm-Fab	4,5	0/6	0/6	0/6
9		9	0/6	0/6	0/6

#### Вес тела

Умеренное снижение веса тела обнаружено после 5 дней обработки у животных, которым вводили wt IL-2 в дозе 4,5 или 9 мкг/г/день (составлявшее 9 и 11% соответственно). Небольшое снижение веса тела обнаружено после 5 дней обработки у животных, которым вводили qm IL-2 в дозе 4,5 или 9 мкг/г/день (составлявшее 2 и 1% соответственно). Умеренное (9%) снижение веса тела обнаружено также в контрольной группе животных, обработанных наполнителем, после 5 дней обработки. Однако процент снижения должен составлять 5%, если исключить погибшее животное (животное № 3). Снижение веса тела в обработанной наполнителем группе может быть связано со стрессом.

#### Гематология

Пониженное содержание тромбоцитов обнаружено у животных, которым вводили в дозе 4,5 (~4,5-кратное) и 9 мкг/г/день (~11-кратное) 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab, что коррелировало со снижением количества

мегакариоцитов в костном мозге, а также с системными истощающими действиями (фибрин) в селезенке и легком этих животных (см. раздел "Гистопатология", ниже). Эти данные свидетельствуют о том, что пониженное содержание тромбоцитов, вероятно, обусловлено объединенными воздействиями поглощения и снижения производства/скученности в костном мозге из-за повышения производства лимфоцитов/миелоидных клеток вследствие непосредственного или косвенного воздействия IL-2.

Гематологические данные свидетельствуют о наличии нестройной взаимосвязи с введением соединения, они демонстрируют абсолютное снижение количества лимфоцитов при обработке 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозе 4,5 (~5-кратное) и 9 мкг/г (~3 -кратное) по сравнению со средним количеством в обработанной наполнителем группе. Эти данные не свидетельствуют о четкой зависимости от дозы, но могут рассматриваться как вторичные, связанные с эффектами, которые ассоциированы со стрессом, обнаруженным при прижизненных исследованиях, или повышенным фармакологическим действием соединения (лимфоциты мигрируют в ткани). Не обнаружено связанных с обработкой гематологических изменений в ответ на введение 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab. Несколько отдельных гематологических данных статистически отличались от соответствующих данных для контролей. Однако этих данных недостаточно для предположения, что они свидетельствуют о патологических изменениях.

#### **Макроскопическая патология и гистопатология**

Связанные с обработкой макроскопические признаки, включая увеличенную селезенку, обнаружены у 5/5 и 4/5 мышей из групп, которые обрабатывали 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозах 4,5 и 9 мкг/г соответственно, и у 1/5 мышей из групп, которые обрабатывали 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в обеих дозах 4,5 и 9 мкг/г.

Связанные с обработкой гистопатологические признаки обнаружены в группах, обработанных 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозах 4,5 и 9 мкг/г, и 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в дозах 4,5 и 9 мкг/г, в легком, костном мозге, печени, селезенке и тимусе, они отличались по частоте встречаемости, серьезности стадии или природе изменений, что будет описано ниже.

Связанные с обработкой гистопатологические признаки в легком включали инфильтрацию мононуклеарных клеток от слабой до выраженной, которая обнаружена у 5/5 мышей из групп, которых обрабатывали 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозах 4,5 и 9 мкг/г, и маргинальную инфильтрацию у 5/5 мышей из групп, которые обрабатывали 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в дозах 4,5 и 9 мкг/г. Инфильтрация мононуклеарных клеток включает инфильтрацию лимфоцитов (некоторые из них, как установлено, имели цитоплазматические гранулы), а также реактивных макрофагов. Эти клетки, как установлено, часто имели вазоцентрическое распределение, часто их маргинация обнаруживалась внутри сосудов в легком. Установлено также, что эти клетки окружали также сосуд, но в более серьезных случаях их распределение было более диффузным. Кровоизлияние от маргинального до слабого обнаружено у 5/5 мышей из групп, которые обрабатывали 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозах 4,5 и 9 мкг/г, и маргинальным у 2/5 мышей из группы, которую обрабатывали 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в дозе 9 мкг/г. Хотя кровоизлияние наиболее часто являлось периваскулярным, в более серьезных случаях оно было обнаружено в альвеолярном пространстве. Отек от слабого до умеренного обнаружен у 5/5 мышей из групп, которые обрабатывали 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозах 4,5 и 9 мкг/г, и маргинальным у 5/5 мышей из группы, которую обрабатывали 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в дозе 9 мкг/г. Хотя отек часто являлся периваскулярным, в более серьезных случаях он обнаружен также в альвеолярном пространстве. Маргинальная дегенерация клеток и кариорексис обнаружены у 2/5 и 5/5 мышей из групп, которые обрабатывали 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозах 4,5 и 9 мкг/г соответственно, и они включали дегенерацию инфильтрующихся или реактивных лимфоцитов. Отобранные с помощью красителя MSB животные оказались позитивными по фибрину в легких животных из групп, которые обрабатывали 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в обеих дозах 4,5 и 9 мкг/г, что коррелировало со снижением количества тромбоцитов, обнаруженных у этих животных.

Связанные с обработкой признаки в костном мозге, включая увеличение от маргинальной до слабой общей насыщенности клетками костного мозга, обнаружено у 5/5 мышей и 2/5 мышей из групп, обработанных как 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab, так и 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в дозе 4,5 мкг/г, и 5/5 мышей и 2/5 мышей из групп, обработанных каждой из указанной конструкций в дозе 9 мкг/г соответственно. Это характеризовалось повышением от маргинального до умеренного уровня лимфоцитарной-миелоцитарной гиперплазии в этих группах, что подтверждалось, в частности, повышением количества CD3-позитивных Т-клеток в костном мозге и синусах (в частности, Т-лимфоцитов, что подтверждено с помощью иммуногистохимии с использованием рап-Т-клеточного маркера CD3 на отобранных животных). Увеличение CD3-позитивных Т-клеток было умеренным в обеих группах, обработанных 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab, и от маргинального до слабого в обеих группах, обработанных 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab. Снижение от маргинального до слабого мегакариоцитов обнаружено у 2/5 мышей из группы, обработанной 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозе 4,5 мкг/г, и 5/5 у мышей, обработанных этой же конструкцией в дозе 9 мкг/г, снижение от маргинального до умеренного эритроидных предшественников обнаружено у 3/5 мышей из группы, обработанной 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозе 4,5 мкг/г, и у 5/5 мышей, обработанных этой же конструкцией в дозе 9 мкг/г. Некроз костного мозга обнаружен у 1/5 мышей в группе, обработанной 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозе 4,5 мкг/г (минимальный) и у 5/5 мышей (от слабого до выраженного), обработанных этой же конструкцией в дозе 9 мкг/г. Пониженное количество мегакариоцитов в костном мозге коррелировало с пониженным содержанием тромбоцитов, что может являться прямым результатом переполнения костного мозга в

результате увеличения лимфоцитов/миелоидных предшественников и/или некроза костного мозга, и/или истощения тромбоцитов из-за воспаления в различных тканях (см. данные для селезенки и легкого). Обнаруженное в костном мозге снижение содержания эритроидных предшественников не коррелировало с данными гематологического исследования периферической крови, вероятно, из-за связанных со временем факторов (исследования костного мозга проводили до оценки периферической крови) и более продолжительным временем полужизни периферических эритроцитов (по сравнению с тромбоцитами). Механизм некроза костного мозга в костном мозге может быть вторичным, являясь следствием выраженного сверхпереполнения полости мозга (из-за производства и роста лимфоцитов/миелоидных клеток), системного или локального высвобождения цитокинов из находящихся на стадии пролиферации типов клеток, фактора, связанного с локальными воздействиями гипоксии, или других фармакологических действий соединения.

Связанные с обработкой признаки в печени, включая наличие от слабой до умеренной первичной вазоцентрической инфильтрации мононуклеарных клеток и от маргинального до умеренного некроза индивидуальных клеток, обнаружено у 5/5 мышей, обработанных 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозах 4,5 и 9 мкг/мг. Маргинальный некроз индивидуальных клеток обнаружен у 2/5 и 4/5 мышей, обработанных 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в дозах 4,5 и 9 мкг/мг, соответственно. Мононуклеарный инфильтрат состоял в основном из лимфоцитов (в частности, Т-лимфоцитов, что подтверждено с помощью иммуногистохимии с использованием рап-Т-клеточного маркера CD3, выполненной на отобранных животных), для него наиболее часто характерно вазоцентрическое расположение, а также очень редко расположение в центральных и портальных сосудах. Отобранных для иммуногистохимического исследования животных окрашивали F4/80, у них обнаружено повышенное количество и размер (активированных) макрофагов/клеток Купфера в гепатических синусоидах в группах, обработанных 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab и 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в дозе 9 мкг/мг.

Связанные с обработкой признаки в селезенке, включая наличие от умеренной до выраженной лимфоидной гиперплазии/инфильтрации и от слабой до умеренной гиперплазии/инфильтрации макрофагов, обнаружено в 5/5 мышей в группах, обработанных 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозах 4,5 и 9 мкг/мг, и от слабой до умеренной лимфоидной гиперплазии/инфильтрации и от маргинальной до слабой гиперплазии/инфильтрации макрофагов - у 5/5 мышей в группах, обработанных 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в дозах 4,5 и 9 мкг/мг.

Иммуногистохимическое исследование, проведенное с использованием мышей, обработанных 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab и 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в дозе 9 мкг/мг, с использованием рап-Т-клеточного маркера CD3, а также маркера макрофагов F4/80 продемонстрировало различные картины. При применении 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозе 9 мкг/мг картина иммунореактивности Т-клеток и макрофагов сохранялась, прежде всего, в областях красной пульпы, поскольку архитектура первичных фолликулов была изменена лимфоцитозом и некрозом (что описано ниже). При применении 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в дозе 9 мкг/мг специальное окрашивание продемонстрировало наличие картины, сходной с обнаруженной у обработанных наполнителем контрольных мышей, но с распространением в периартериальные лимфоцитарные оболочки (PALS) белой пульпы Т-клеточной популяции и наличием более крупной расширенной области красной пульпы. Позитивное в отношении Т-клеток и макрофагов окрашивание обнаружено также внутри красной пульпы, аналогичное по картине с окрашиванием в контрольной обработанной наполнителем группе, но расширенное. Эти результаты коррелируют с данными макроскопических исследований увеличенной селезенки. Маргинальный некроз обнаружен у 3/5 мышей и от маргинального до слабого у 5/5 мышей в группах, обработанных 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозах 4,5 и 9 мкг/мг соответственно. Некроз, как правило, был локализован вокруг области первичных фолликулов, и при окрашивании с помощью MSB отобранные животные давали положительную реакцию на фибрин в группах, обработанных 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в обеих дозах 4,5 и 9 мкг/мг, что коррелировало, в частности, со сниженным содержанием тромбоцитов, обнаруженным у этих животных. Лимфоцитоз обнаружен в группах, обработанных 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозе 4,5 мкг/г (от минимального до слабого) и 9 мкг/г (от умеренного до выраженного).

Связанные с обработкой признаки в тимусе, включая увеличение от минимального до слабого содержания лимфоцитов в группе, обработанной 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab как в дозе 4,5, так и 9 мкг/мг, и обработанной 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в дозе 4,5 мкг/мг. Кору и мозговое вещество тимуса не исследовали по отдельности в группах, обработанных 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab, однако иммуногистохимическое исследование с использованием рап-Т-клеточного маркера (CD3), проведенное на отобранных животных, которых обрабатывали 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозе 9 мкг/мг и 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в дозе 9 мкг/мг, продемонстрировало сильное позитивное окрашивание большинства клеток в тимусе. Повышенное содержание лимфоцитов в тимусе рассматривается как непосредственное фармакологическое действие обоих соединений, при котором IL-2 индуцировал пролиферацию лимфоцитов, мигрирующих в тимус (Т-клетки) из костного мозга для дополнительной дифференцировки и клональной экспансии. Это имело место во всех группах, кроме группы, обработанной 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в дозе 9 мкг/мг, в которой, вероятно, имело место временное действие. Лимфоцитоз оказался слабым в группе, обработанной 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозе 4 мкг/мг, и от умеренного до выраженного в группе, обработанной 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозе 9 мкг/мг. Умеренное истощение лимфоидных элементов обнаружено в группах, обработанных 4G8 Fab-IL-

2 wt-Fab в дозах как 4,5, так и 9 мкг/мл. Поскольку эти результаты являются более значительными в группах, обработанных 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозах 4,5 и 9 мкг/мг, эти животные были отнесены к агонирующим в день 5, и лимфоцитоз от слабого до выраженного, а также умеренное лимфоидное истощение могут быть связаны с указанным прижизненным фактором (связанные со стрессом действия вследствие плохого физического состояния).

Гистопатологические признаки нестройной взаимосвязи между введением соединения и проявлениями в печени включают маргинальную инфильтрацию/активацию смешанных клеток (лимфоцитов и макрофагов), обнаруженную в виде небольшого очага/микрогрануломатоза, произвольно расположенных в печени у 5/5 мышей из групп, обработанных 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в обеих дозах 4,5 и 9 мкг/мг. Это маргинальное изменение обнаружено также в контрольной обработанной наполнителем группе, но реже и менее серьезное. Расширение и атрофия железистой области желудка от маргинального до слабого обнаружены у 5/5 мышей, а маргинальная атрофия ворсинок подвздошной кишки обнаружена у 3/5 мышей, обработанных 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозе 9 мкг/мг. Этот факт наиболее вероятно связан с плохим физическим состоянием, обнаруженным при проведении прижизненных исследований на этих мышях, отражением которого был пониженный вес тела, прежде всего в группе, обработанной 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозе 9 мкг/мг.

Признаки в месте инъекции, включая инфильтрат смешанных клеток, периваскулярный отек и миодегенерацию, обнаружены как в обработанной наполнителем контрольной группе, так и в группах, обработанных 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab в дозе 9 мкг/мг, и 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в дозе 9 мкг/мг. У одного животного обнаружен эпидермальный некроз. Эти признаки не связаны с самой(ими) обработкой(ами), а с ежедневными i.v.-инъекциями и манипуляциями с хвостом. У другого животного обнаружена инфильтрация макрофагами скелетной мышцы (обнаружена на гистологическом срезе ткани легкого), ассоциированная с миодегенерацией и миорегенерацией, вероятно, вследствие хронического повреждения и не связанная с обработкой. Маргинальное лимфоидное истощение обнаружено у 3/5 и 4/5 мышей в группах, обработанных 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в дозах 4,5 и 9 мкг/мг соответственно, что наиболее вероятно связано с нормальными физиологическими изменениями, обнаруженными в тимусе мышей с увеличением их возраста (обнаружены также с аналогичной встречаемостью и серьезностью у 4/5 мышей из обработанной наполнителем контрольной группы животных).

В целом, ежедневное внутривенное введение 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab или 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab в дозах 4,5 или 9 мкг/г/день в течение промежутка времени, составляющего вплоть до 5 дней, самцам мышей привело к сходным, связанным с обработкой гистологическим признакам, характерным для обоих соединений. Однако изменения были более значительными и более серьезными при применении иммуноконъюгата 4G8 Fab-IL-2 wt-Fab, мишенью которого является FAP, в легком (фиг. 28 и 29) (моноклеарная инфильтрация лимфоцитами и реактивными макрофагами, кровоизлияние и отек), в костном мозге (лимфомиелогиперплазия и повышенная и повышенная насыщенность клетками), в печени (фиг. 30) (некроз индивидуальных клеток, увеличение количества и активация клеток Купфера/макрофагов), в селезенке (выраженное увеличение, инфильтрация/гиперплазия макрофагов и лимфоцитов) и в тимусе (повышенное содержание лимфоцитов). Кроме того, смертность, лимфоцитоз, некроз или дегенерация клеток в легком, селезенке, костном мозге и тимусе, а также снижение количества мегакариоцитов и эритроцитов в костном мозге и пониженное содержание тромбоцитов в периферической крови обнаружены только у животных, которых обрабатывали wt IL-2. На основе клинических и анатомических признаков, а также на основе клинических наблюдений и сопоставимой системной экспозиции обоих соединений, можно сделать заключение о том, что qm IL-2 в условиях данного исследования обладал существенно менее выраженной системной токсичностью после введения 5 доз, чем wt IL-2.

Пример 10.

Индукция IL-2 дикого типа и четырехмутантным IL-2 секрети IFN- $\gamma$  НК-клетками НК-92-клетки выдерживали в минимальной среде в течение 2 ч перед посевом из расчета 100000 клеток/лунку в 96-луночный плоскодонный планшет. Конструкции IL-2 добавляли титрометрически к высевным НК-92-клеткам. Через 24 или 48 ч планшеты центрифугировали перед сбором супернатантов для определения количества человеческого IFN- $\gamma$ , используя поступающий в продажу набор для IFN- $\gamma$  ELISA (фирма BD, № 550612).

Тестировали два различных, полученных при создании настоящего изобретения препарата IL-2 дикого типа (вероятно, несколько отличающихся по профилям их О-гликозилирования см. пример 2), поступающий в продажу IL-2 дикого типа (пролейкин) и полученный при создании настоящего изобретения четырехмутантный IL-2 (первая партия).

На фиг. 31 продемонстрировано, что четырехмутантный IL-2 обладает такой же эффективностью, что поступающий в продажу (пролейкин) или полученный при создании изобретения IL-2 дикого типа в отношении индукции секреции IFN- $\gamma$  НК-клетками в течение 24 (А) или 48 ч (Б).

Пример 11. Индукция IL-2 дикого типа и четырехмутантным IL-2 пролиферации НК-клеток

НК-92-клетки выдерживали в минимальной среде в течение 2 ч перед посевом из расчета 100000 клеток/лунку в 96-луночный плоскодонный планшет. Конструкции IL-2 добавляли титрометрически к



высеянным NK-92-клеткам. Через 48 ч оценивали содержание АТФ для определения количества жизнеспособных клеток с использованием набора для анализа "CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay" фирмы Promega согласно инструкциям производителя.

Тестировали такие же препараты IL-2, что и в примере 10.

На фиг. 32 продемонстрировано, что все тестируемые молекулы обладали способностью индуцировать пролиферацию NK-клеток. При применении в низких концентрациях ( $< 0,01M$ ) четырехмутантный IL-2 оказался несколько менее активным, чем полученный при создании изобретения IL-2 дикого типа, а все полученные при создании изобретения препараты оказались менее активными, чем поступающий в продажу IL-2 дикого типа (пролейкин).

Во втором эксперименте тестировали следующие препараты IL-2: IL-2 дикого типа (пул 2), четырехмутантный IL-2 (первая и вторая партия).

На фиг. 33 продемонстрировано, что все тестируемые молекулы обладали примерно одинаковой способностью индуцировать пролиферацию NK-клеток, при этом два препарата, содержащие мутантный IL-2, оказались лишь минимально менее активными, чем препараты IL-2 дикого типа, при применении в наиболее низких концентрациях.

Пример 12.

Индукция пролиферации человеческих PBMC иммуноконъюгатами, содержащими IL-2 дикого типа или четырехмутантный IL-2

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) получали с помощью Histopaque-1077 (фирма Sigma Diagnostics Inc., Сент-Луис, шт. Миссури, США). В целом, метод состоял в следующем: образцы венозной крови здоровых добровольцев отбирали в гепаринизированные шприцы. Кровь разводили в соотношении 2:1 ЗФР, не содержащим кальций и магний, и наслаивали на Histopaque-1077. Градиент центрифугировали при  $450 \times g$  в течение 30 мин при комнатной температуре (КТ) без перерыва. Собирали содержащую PBMC интерфазу, и отмывали трижды ЗФР ( $350 \times g$ , после чего центрифугировали при  $300 \times g$  в течение 10 мин при КТ).

Затем PBMC метили с помощью 40нМ CFSE (сложный сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина) в течение 15 мин при  $37^\circ C$ . Клетки отмывали 20 мл среды перед выделением меченых PBMC в течение 30 мин при  $37^\circ C$ . Клетки отмывали, подсчитывали и по 100000 клеток высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном. Предварительно разведенный пролейкин (поступающий в продажу IL-2 дикого типа) или IL2-иммуноконъюгаты добавляли титрометрически к посеянным клеткам, которые инкубировали в течение указанных промежутков времени. Через 4-6 дней клетки отмывали, окрашивали для выявления соответствующих маркеров клеточной поверхности и анализировали с помощью FACS, используя устройство BD FACSCantoII. NK-клетки определяли как  $CD3^+/CD56^+$ , CD4-T-клетки как  $CD3^+/CD8^+$ , а CD8-T-клетки как  $CD3^+/CD8^+$ .

На фиг. 34 продемонстрированы данные о пролиферации NK-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28Н1 IL-2, мишенью которых является FAP, в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней. Все тестируемые конструкции индуцировали пролиферацию NK-клеток в зависимости от концентрации. Пролейкин оказался более эффективным, чем иммуноконъюгаты при применении в более низких концентрациях, однако это различие не обнаружено при более высоких концентрациях. В более ранние моменты времени (день 4), конструкции IgG-IL2 обладали несколько более высокой эффективностью, чем конструкции Fab-IL2-Fab. В более поздние моменты времени (день 6) эффективность всех конструкций была сопоставимой, при этом конструкция Fab-IL2 qm-Fab обладала слабой эффективностью при применении в низких концентрациях.

На фиг. 35 продемонстрированы данные о пролиферации CD4-T-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28Н1 IL-2, мишенью которых является FAP, в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней. Все тестируемые конструкции индуцировали пролиферацию CD4-T-клеток в зависимости от концентрации. Пролейкин оказался более эффективным, чем иммуноконъюгаты, а иммуноконъюгаты, содержащие IL-2 дикого типа, обладали несколько более высокой эффективностью, чем содержащие четырехмутантный IL-2. Также как и в случае NK-клеток, конструкция Fab-IL2 qm-Fab обладала наименьшей активностью. Наиболее вероятно, пролиферирующие CD4-T-клетки частично представляют собой регуляторные T-клетки, по меньшей мере в случае конструкций, содержащих IL-2 дикого типа.

На фиг. 36 продемонстрированы данные о пролиферации CD8-T-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28Н1 IL-2, мишенью которых является FAP, в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней. Все тестируемые конструкции индуцировали пролиферацию CD8-T-клеток в зависимости от концентрации. Пролейкин оказался более эффективным, чем иммуноконъюгаты, а иммуноконъюгаты, содержащие IL-2 дикого типа, обладали несколько более высокой эффективностью, чем содержащие четырехмутантный IL-2. Также как и в случае NK-клеток и CD4-T-клеток, конструкция Fab-IL2 qm-Fab обладала наименьшей активностью.

На фиг. 37 представлены результаты другого эксперимента, в котором осуществляли сравнение 28Н1 IgG-IL-2, мишенью которого является FAP, содержащий либо дикого типа, либо четырехмутантный IL-2, и пролейкина. Продолжительность инкубации составляла 6 дней. Как продемонстрировано на

чертеже, все три содержащие IL-2 конструкции индуцировали пролиферацию NK-клеток (А) и CD8-Т-клеток (В) в зависимости от дозы с одинаковой эффективностью. В отношении CD4-Т-клеток (Б) иммуноконъюгат IgG-IL2 qm обладал более низкой активностью, особенно при применении в средних концентрациях, что может являться следствием отсутствия активности в отношении CD25-позитивных (включая регуляторные) Т-клеток, которые представляют собой подпопуляцию CD4-Т-клеток.

Пример 13. Активация эффекторных клеток IL-2 дикого типа и четырехмутантным IL-2 (pSTAT5-анализ)

РВМС получали согласно описанному выше методу. 500000 РВМС/лунку высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном и выдерживали в течение 45 мин при 37°C в среде RPMI, содержащей 10% FCS и 1% глутамакса (фирма Gibco). Затем РВМС инкубировали с пролейкином, полученным при создании изобретения IL-2 дикого типа или четырехмутантным IL-2, в указанных концентрациях в течение 20 мин при 37°C для индукции фосфорилирования STAT5. Затем клетки немедленно фиксировали (фирма BD, Cytotfix-буфер) в течение 10 мин при 37°C и однократно отмывали, затем осуществляли стадию повышения проницаемости (фирма BD, буфер III Phosflow Perm) в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки отмывали 3ФР /0,1% БСА и окрашивали смесями применяемыми для FACS антител для выявления NK-клеток (CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>), CD8<sup>+</sup>-Т-клеток (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup>-Т-клеток (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/CD127<sup>+</sup>) или T<sub>reg</sub>-клеток (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/CD127<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>), а также pSTAT5 в течение 30 мин при КТ в темноте. Клетки отмывали дважды 3ФР/0,1% БСА и ресуспендировали в 2% PFA перед анализом методом проточной цитометрии (фирма BD, устройством FACSCantoII).

На фиг. 38 продемонстрированы данные о фосфорилировании STAT в NK-клетках (А), CD8-Т-клетках (Б), CD4-Т-клетках (В) и регуляторных Т-клетках (Г) после 30-минутной инкубации с пролейкином, полученными при создании изобретения IL-2 дикого типа (пул 2) и четырехмутантным IL-2 (партия 1). Все три препарата IL-2 обладали одинаковой эффективностью в отношении индукции фосфорилирования STAT в NK-клетках, а также в CD8-Т-клетках. В CD4-Т-клетках и даже еще в большей степени в регуляторных Т-клетках четырехмутантный IL-2 обладал более низкой активностью, чем препараты, содержащие IL-2 дикого типа.

Пример 14. Активация эффекторных клеток иммуноконъюгатом IgG-IL-2, содержащим IL-2 дикого типа и четырехмутантный IL-2 (pSTAT5-анализ)

Условия эксперимента соответствовали описанным выше (см. пример 13).

На фиг. 39 продемонстрированы данные о фосфорилировании STAT в NK-клетках (А), CD8-Т-клетках (Б), CD4-Т-клетках (В) и регуляторных Т-клетках (Г) после 30-минутной инкубации с пролейкином, IgG-IL-2, содержащим IL-2 дикого типа, или IgG-IL-2 содержащим четырехмутантный IL-2. В клетках всех типов пролейкин обладал более высокой эффективностью в отношении индукции фосфорилирования STAT, чем иммуноконъюгаты IgG-IL-2. Конструкции IgG-IL-2, содержащие IL-2 дикого типа и четырехмутантный IL-2, обладали одинаковой эффективностью в NK-клетках, а также CD8-Т-клетках. В CD4-Т-клетках и даже еще в большей степени в регуляторных Т-клетках четырехмутантный IgG-IL-2 обладал более низкой активностью, чем иммуноконъюгат IgG-IL-2, содержащий IL-2 дикого типа.

Пример 15. Максимальные переносимые дозы (MTD) иммуноконъюгатов Fab-IL2 wt-Fab и Fab-IL2 qm-Fab, мишенью которых является FAP

Проводили оценку воздействия возрастающих доз иммуноконъюгатов Fab-IL2-Fab, мишенью которых является FAP, содержащих либо дикого типа (wt), либо четырехмутантный (qm) IL-2, на не имеющих опухоли иммунокомпетентных мышах линии Black 6.

Самок мышей линии Black 6 (фирма Charles River, Германия), возраст которых в начале эксперимента составлял 8-9 недель, содержали в специальных условиях без патогенов с суточными циклами 12 ч света/12 ч темноты согласно принятым руководствам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол экспериментального исследования был рассмотрен и одобрен местными органами управления (P 2008016). После доставки животных выдерживали в течение одной недели для акклиматизации к новому окружению и для обследования. В течение всего периода времени регулярно осуществляли мониторинг состояния здоровья.

Мышам инъецировали i.v. один раз в день в течение 7 дней 4G8 Fab-IL2 wt-Fab в дозах 60, 80 и 100 мкг/мышь или 4G8 Fab-IL2 qm-Fab в дозах 100, 200, 400, 600 и 1000 мкг/мышь. Всем мышам инъецировали i.v. 200 мкл соответствующего раствора. Для получения соответствующего количества иммуноконъюгата на 200 мкл маточные растворы при необходимости разводили 3ФР.

На фиг. 40 продемонстрировано, что MTD (максимальная переносимая доза) Fab-IL2 qm-Fab оказалась в 10 раз выше, чем Fab-IL2 wt-Fab, а именно, она составляла 600 мкг/мышь при ежедневном введении Fab-IL2 qm-Fab в течение 7 дней по сравнению с 60 мкг/мышь при ежедневном введении Fab-IL2 wt-Fab в течение 7 дней.

Таблица 19

Соединение	Доза	Состав буфера	Концентрация (мг/мл)
4G8 Fab-IL2 wt-Fab	60, 80, 100 мкг	25мМ фосфат калия, 125мМ NaCl, 100мМ глицин, pH 6,7	3,32 (маточный раствор)
4G8 Fab-IL2 qm-Fab	100, 200, 400, 600, 1000 мкг	25мМ фосфат калия, 125мМ NaCl, 100мМ глицин, pH 6,7	4,25 (маточный раствор)

Пример 16. Фармакокинетические характеристики одноразовой дозы иммуноконъюгатов IgG-IL2 wt и qm, мишенью которых является FAP, и "ненаправленных" иммуноконъюгатов IgG-IL2 wt и qm

Фармакокинетическое (ФК) исследование одноразовой дозы иммуноконъюгатов IgG-IL2, мишенью которых является FAP, содержащих либо дикого типа, либо четырехмутантный IL-2, и "ненаправленных" иммуноконъюгатов IgG-IL-2, содержащих либо дикого типа, либо четырехмутантный IL-2, осуществляли на не имеющих опухоли иммунокомпетентных мышцах линии 129.

Самок мышей линии 129 (фирма Harlan, Великобритания), возраст которых в начале эксперимента составлял 8-9 недель, содержали в специальных условиях без патогенов с суточными циклами 12 ч света/12 ч темноты согласно принятым руководствам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол экспериментального исследования был рассмотрен и одобрен местными органами управления (P 2008016). После доставки животных выдерживали в течение одной недели для акклиматизации к новому окружению и для обследования. В течение всего периода времени регулярно осуществляли мониторинг состояния здоровья.

Мышам однократно инъецировали i.v. иммуноконъюгаты, мишенью которых является FAP, такие как 28H1 IgG-IL2 wt (2,5 мг/кг) или 28H1 IgG-IL2 qm (5 мг/кг), или "ненаправленные" иммуноконъюгаты DP47GS IgG-IL2 wt (5 мкг/кг) или DP47GS IgG-IL2 qm (5 мг/кг). Всем мышам инъецировали i.v. по 200 мкл соответствующего раствора. Для получения соответствующего количества иммуноконъюгата на 200 мкл маточные растворы при необходимости разводили 3ФР.

У мышей брали образцы крови в следующие моменты времени: 1, 8, 24, 48, 72, 96 ч и после этого через каждые 2 дня в течение 3 недель. Сыворотку экстрагировали и хранили при -20°C до осуществления анализа ELISA. Концентрации иммуноконъюгатов в сыворотке определяли, применяя ELISA для количественной оценки антитела, входящего в содержащий IL-2 иммуноконъюгат (фирма Roche-Penzberg). Абсорбцию определяли, осуществляя измерения при длине волны 405 нм и длине референс-волны 492 нм (настраиваемый ридер для микропланшетов типа VersaMax, фирма Molecular Devices).

На фиг. 41 представлены результаты фармакокинетического исследования указанных иммуноконъюгатов IL-2. Как конструкции, мишенью которых является FAP (А), так и "ненаправленные" (Б) конструкции IgG-IL2 qm, имели более продолжительное время полужизни в сыворотке (примерно 30 ч) по сравнению с соответствующими конструкциями IgG-IL2 wt (примерно 15 ч).

Таблица 20

Соединение	Доза	Состав буфера	Концентрация (мг/мл)
28H1-IgG-IL2 wt	2,5 мг/кг	20мМ гистидин, 140мМ NaCl, pH 6,0	3,84 (маточный раствор)
28H1-IgG-IL2 qm	5 мг/кг	20мМ гистидин, 140мМ NaCl, pH 6,0	2,42 (маточный раствор)
DP47GS-IgG-IL2wt	5 мг/кг	20мМ гистидин, 140мМ NaCl, pH 6,0	3,74 (маточный раствор)
DP47GS-IgG-IL2QM	5 мг/кг	20мМ гистидин, 140мМ NaCl, pH 6,0	5,87 (маточный раствор)

Пример 17. Фармакокинетические характеристики одноразовой дозы "ненаправленных" иммуноконъюгатов Fab-IL2 wt-Fab и Fab-IL2 qm-Fab

Фармакокинетическое (ФК) исследование одноразовой дозы "ненаправленных" иммуноконъюгатов Fab-IL2-Fab, содержащих либо дикого типа, либо четырехмутантный IL-2, осуществляли на не имеющих опухоли иммунокомпетентных мышцах линии 129.

Самок мышей линии 129 (фирма Harlan, Великобритания), возраст которых при начале эксперимента составлял 8-9 недель, содержали в специальных условиях без патогенов с суточными циклами 12 ч света/12 ч темноты согласно принятым руководствам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол экспериментального исследования был рассмотрен и одобрен местными органами управления (P 2008016). После доставки животных выдерживали в течение одной недели для акклиматизации к новому окружению и для обследования. В течение всего периода регулярно осуществляли мониторинг состояния здоровья.

Мышам однократно инъецировали *i.v.* иммуноконъюгаты DP47GS Fab-IL2 wt-Fab в дозе 65 нмоль/кг или DP47GS Fab-IL2 qm-Fab в дозе 65нМ/кг. Всем мышам инъецировали *i.v.* по 200 мкл соответствующего раствора. Для получения соответствующего количества иммуноконъюгата на 200 мкл маточные растворы при необходимости разводили 3ФР.

У мышей брали образцы крови в следующие моменты времени: 0,5, 1, 3, 8, 24, 48, 72, 96 ч и после этого через каждые 2 дня в течение 3 недель. Сыворотку экстрагировали и хранили при -20°C до осуществления анализа ELISA. Концентрации иммуноконъюгатов в сыворотке определяли, применяя ELISA для количественной оценки антитела, входящего в содержащий IL-2 иммуноконъюгат (фирма Roche-Penzberg). Абсорбцию определяли, осуществляя измерения при длине волны 405 нм и длине референс-волны 492 нм (настраиваемый ридер для микропланшетов типа VersaMax, фирма Molecular Devices).

На фиг. 42 представлены результаты фармакокинетического исследования указанных иммуноконъюгатов IL-2. Конструкции Fab-IL2-Fab wt и qm имели время полужизни в сыворотке, составлявшее приблизительно 3-4 ч. Различие во времени полужизни в сыворотке между конструкциями, содержащими IL-2 дикого типа или четырехмутантный IL-2, оказалось менее выраженным для Fab-IL2-Fab-конструкций, чем для IgG-подобных иммуноконъюгатов, которые сами имели более продолжительное время полужизни.

Таблица 21

Соединение	Доза	Состав буфера	Концентрация (мг/мл)
DP47GS Fab-IL2 wt- Fab	65нМ/кг	100мМ глицин, 125мМ NaCl, 25мМ KН <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,7	3,84 (маточный раствор)
DP47GS Fab-IL2 qm- Fab	65нМ/кг	100мМ глицин, 125мМ NaCl, 25мМ KН <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,7	2,42 (маточный раствор)

#### Пример 18. Активация индуцированной клеточной гибели активируемых IL-2 PBMC

Свежевыделенные из организма здоровых доноров PBMC предварительно активировали в течение ночи с помощью ФГА-М в концентрации 1 мкг/мл в среде RPMI1640, содержащей 10% FCS и 1% глутамин. После предварительной активации PBMC собирали, метили с помощью 40нМ CFSE в 3ФР и высевали в 96-луночные планшеты из расчета 100000 клеток/луночку. Предварительно активированные PBMC стимулировали, используя в различных концентрациях иммуноконъюгаты IL-2 (4B9 IgG-IL-2 wt, 4B9 IgG-IL-2 qm, 4B9 Fab-IL-2 wt-Fab и 4B9 Fab-IL-2 qm-Fab). Через 6 дней после обработки с помощью IL-2 PBMC обрабатывали в течение ночи активирующим антителом к Fas в концентрации 0,5 мкг/мл. Через 6 дней анализировали пролиферацию CD4<sup>+</sup>(CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) и CD8<sup>+</sup>(CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) Т-клеток, используя разведения CFSE. Процент живых Т-клеток после обработки антителом к Fas определяли путем установки дискриминационного окна на CD3<sup>+</sup> -, аннексии V-негативных живых клеток.

Как продемонстрировано на фиг. 44, все конструкции индуцировали пролиферацию предварительно активированных Т-клеток. При применении в низких концентрациях конструкции, содержащие IL-2 дикого типа (wt), оказались более активными, чем содержащие IL-2 qm конструкции. IgG-IL-2 wt, Fab-IL-2 wt-Fab и пролейкин обладали сходной активностью. Конструкция Fab-IL-2 qm-Fab обладала несколько более низкой активностью, чем IgG-IL-2 qm.

Конструкции, содержащие IL-2 дикого типа, обладали более высокой активностью в отношении CD4-Т-клеток, чем в отношении CD8-Т-клеток, наиболее вероятно из-за активации регуляторных Т-клеток. Конструкции, содержащие четырехмутантный IL-2, обладали сходной активностью в отношении CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>Т-клеток.

Как продемонстрировано на фиг. 45, Т-клетки, стимулированные IL-2 дикого типа в высоких концентрациях, обладали большей чувствительностью к индуцируемому антителом к Fas апоптозу, чем Т-клетки, обработанные четырехмутантным IL-2.

Хотя выше изобретение описано выше достаточно подробно с помощью иллюстраций и примеров, приведенных для целей лучшего понимания, описание и примеры не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Все процитированные в настоящем описании патентные и научные публикации полностью включены в него в качестве ссылки.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид IL-2 и антигенсвязывающий фрагмент, где указанный мутантный IL-2 полипептид представляет собой молекулу человеческого IL-2, содержащего аминокислотные замены F42A, Y45A и L72G (нумерация соответствует последовательности человеческого IL-2 SEQ ID NO: 1);

и где указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу иммуноглобулина субкласса IgG<sub>1</sub>, специфичного в отношении фибробласт-активирующего белка (FAP), содержащего

(i) последовательность SEQ ID NO: 41 вариабельной области тяжелой цепи и последовательность

SEQ ID NO: 39 варибельной области легкой цепи;

(ii) последовательность SEQ ID NO: 51 варибельной области тяжелой цепи и последовательность SEQ ID NO: 49 варибельной области легкой цепи;

(iii) последовательность SEQ ID NO: 111 варибельной области тяжелой цепи и последовательность SEQ ID NO: 109 варибельной области легкой цепи;

(iv) последовательность SEQ ID NO: 143 варибельной области тяжелой цепи и последовательность SEQ ID NO: 141 варибельной области легкой цепи или

(iv) последовательность SEQ ID NO: 151 варибельной области тяжелой цепи и последовательность SEQ ID NO: 149 варибельной области легкой цепи.

2. Иммуноконъюгат по п.1, где указанный мутантный полипептид IL-2 дополнительно содержит аминокислотные замены T3A и/или аминокислотную замену C125A.

3. Иммуноконъюгат по п.1 или 2, где указанный мутантный полипептид IL-2 содержит последовательность SEQ ID NO: 19.

4. Иммуноконъюгат по любому из пп.1-3, где указанный мутантный полипептид IL-2 соединен его аминоконцевой аминокислотой с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина.

5. Иммуноконъюгат по любому из пп.1-4, где иммуноконъюгат содержит не более одного мутантного полипептида IL-2.

6. Иммуноконъюгат по любому из пп.1-5, где молекула иммуноглобулина субкласса IgG<sub>1</sub> содержит в Fc-домене модификацию, способствующую гетеродимеризации двух неидентичных тяжелых цепей иммуноглобулина.

7. Иммуноконъюгат по п.6, где модификация представляет собой модификацию по типу "knob-into-hole" ("выступ-впадина"), содержащую модификацию "выступ" в одной из тяжелых цепей иммуноглобулина и модификацию "впадина" в другой тяжелой цепи иммуноглобулина, где модификация "выступ" содержит аминокислотную замену T366W в одной из двух тяжелых цепей иммуноглобулина, и модификация "впадина" содержит аминокислотные замены T366S, L368A и Y407V в другой одной из двух тяжелых цепей иммуноглобулина.

8. Иммуноконъюгат по п.7, где тяжелая цепь иммуноглобулина, содержащая модификацию "выступ", дополнительно содержит аминокислотную замену S354C, и тяжелая цепь иммуноглобулина, содержащая модификацию "впадина", дополнительно содержит аминокислотную замену Y349C.

9. Иммуноконъюгат по любому из пп.1-8, где молекула IgG<sub>1</sub> содержит в своем Fc-домене одну или более аминокислотных мутаций, которые снижают связывающую аффинность иммуноконъюгата в отношении FcγRIIIa, FcγRI или FcγRIIa рецептора.

10. Иммуноконъюгат по п.9, где молекула IgG<sub>1</sub> содержит аминокислотные мутации L234A, L235A и 3329G.

11. Иммуноконъюгат по любому из пп.1-10, содержащий

(i) полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 297, полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 299, и полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 233;

(ii) полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 301, полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 303, полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 231; или

(iii) полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 315, полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 317, полипептидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 233.

12. Иммуноконъюгат по любому из пп.1-11, где указанная молекула иммуноглобулина IgG<sub>1</sub>, специфичная к FAP, содержит варибельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 111 и варибельную область легкой цепи SEQ ID NO: 109.

13. Иммуноконъюгат по любому из пп.1-12, содержащий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 301, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 303 и полипептидную последовательность SEQ ID NO: 231.

14. Иммуноконъюгат по любому из пп.1-13, в основном состоящий из мутантного полипептида IL-2 и молекулы IgG<sub>1</sub>, связанными последовательностью-линкером.

15. Выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат по любому из пп.1-14.

16. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.15.

17. Способ получения иммуноконъюгата по любому из пп.1-14, содержащего мутантный полипеп-

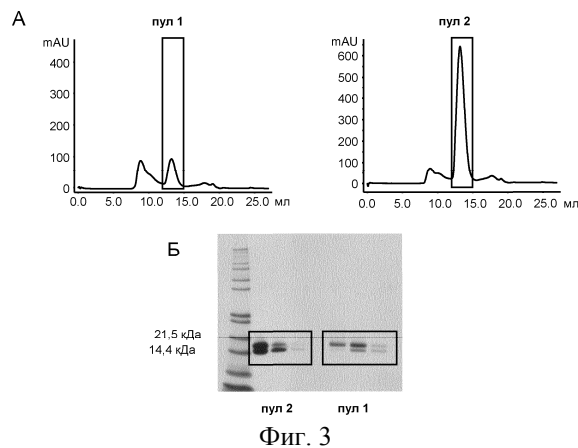
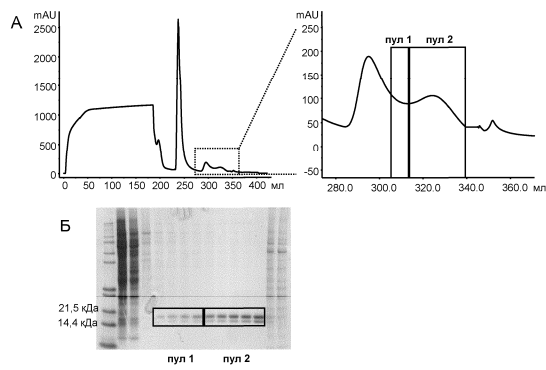
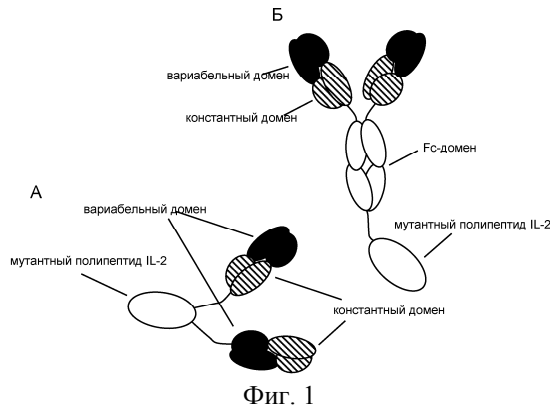
тид IL-2 и антигенсвязывающий фрагмент, включающий культивирование клетки-хозяина по п.16 в условиях, пригодных для экспрессии иммуноконъюгата.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноконъюгат по любому из пп.1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

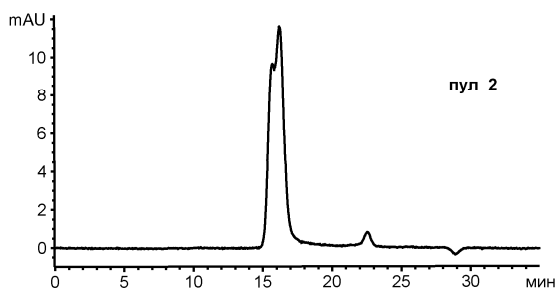
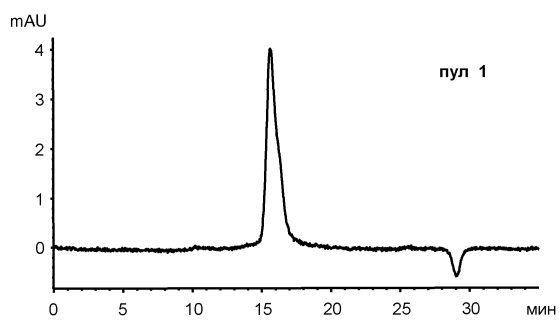
19. Применение иммуноконъюгата по любому пп.1-14 для лечения карциномы.

20. Применение иммуноконъюгата по любому из пп.1-14 для получения лекарственного средства для лечения карциномы.

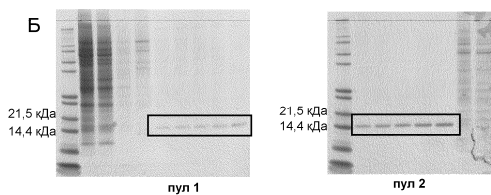
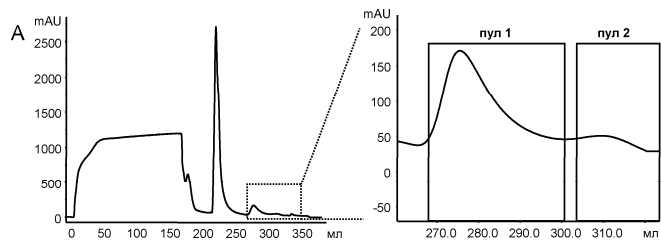
21. Способ лечения карциномы у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму терапевтически эффективного количества композиции, содержащей иммуноконъюгат по любому из пп.1-14 в фармацевтически приемлемой форме.



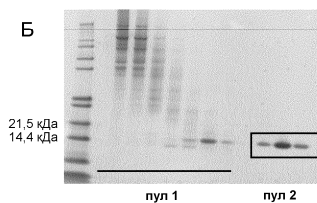
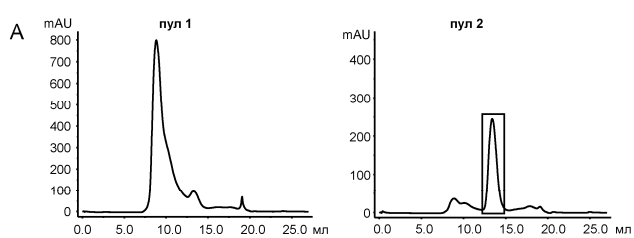
040858



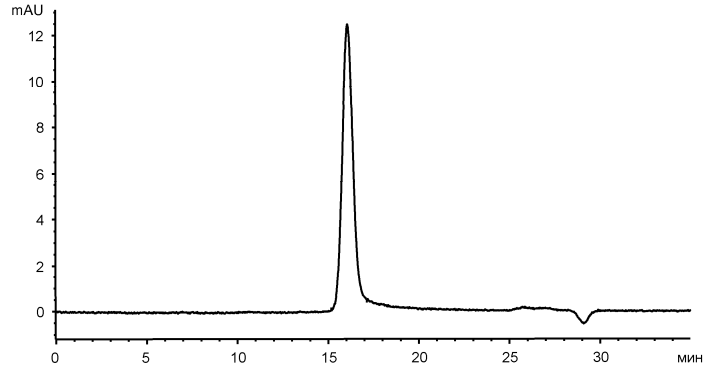
Фиг. 4



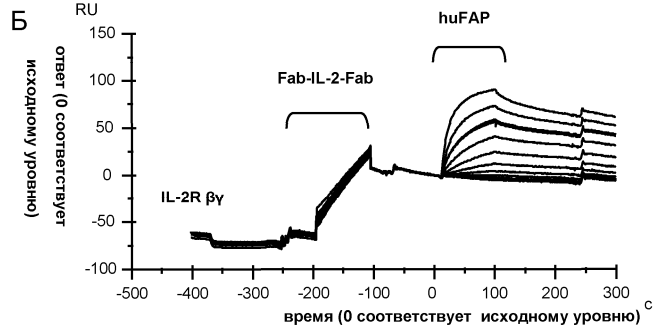
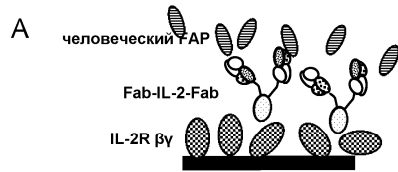
Фиг. 5



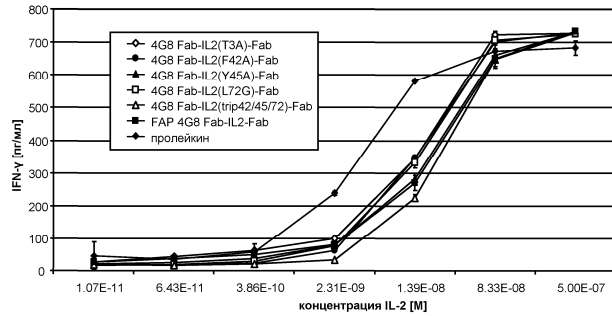
Фиг. 6



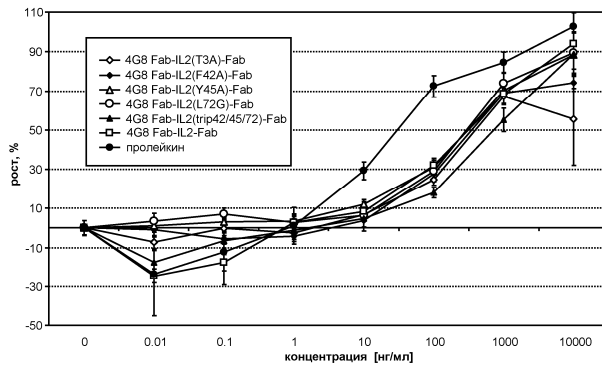
Фиг. 7



Фиг. 8

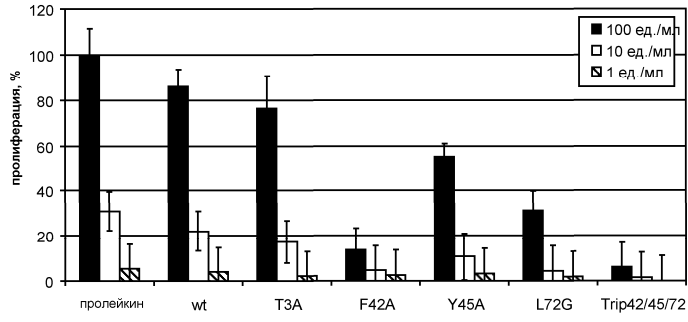


Фиг. 9

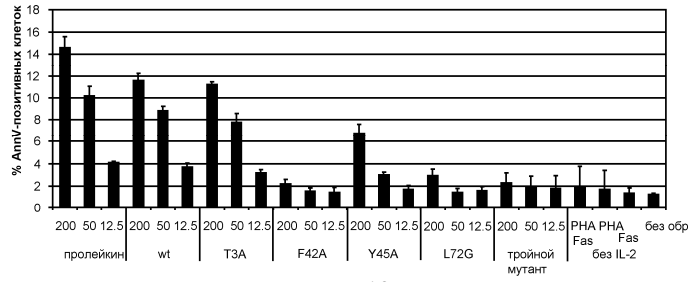


Фиг. 10

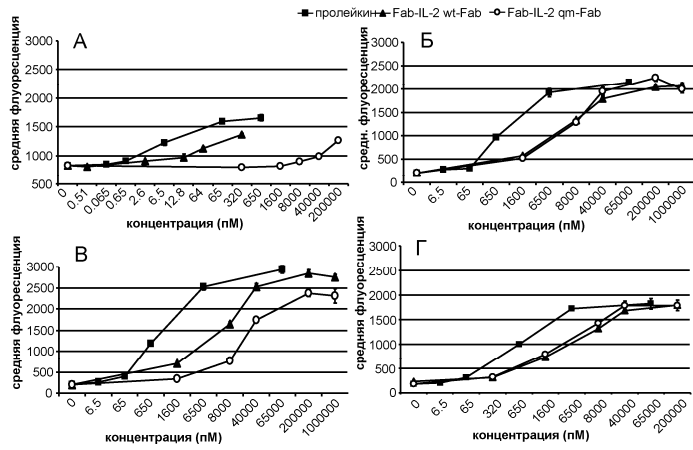




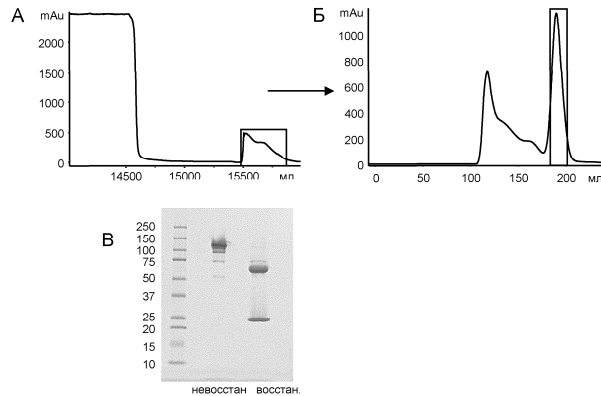
Фиг. 11



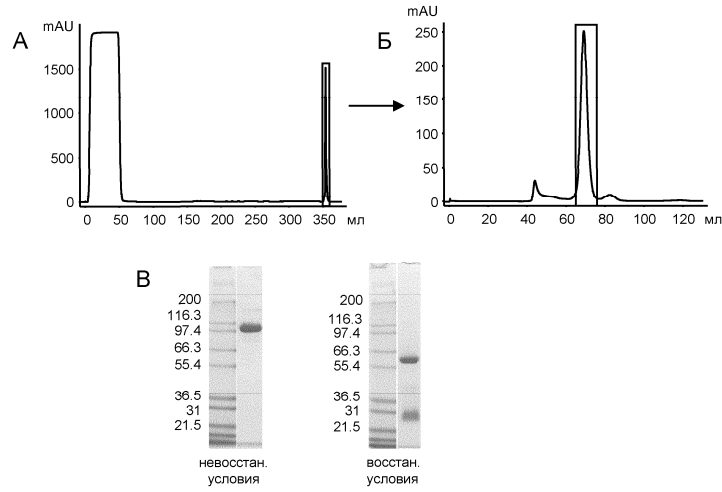
Фиг. 12



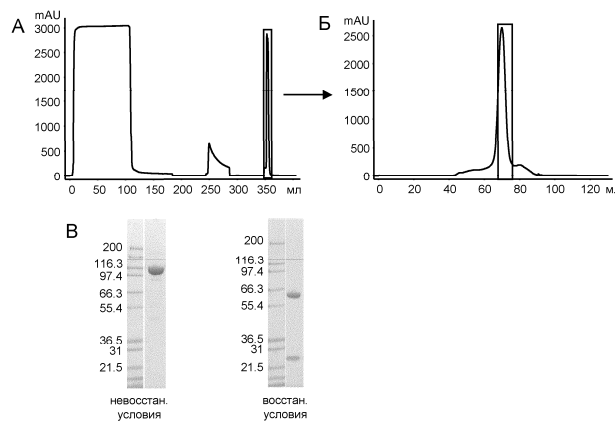
Фиг. 13



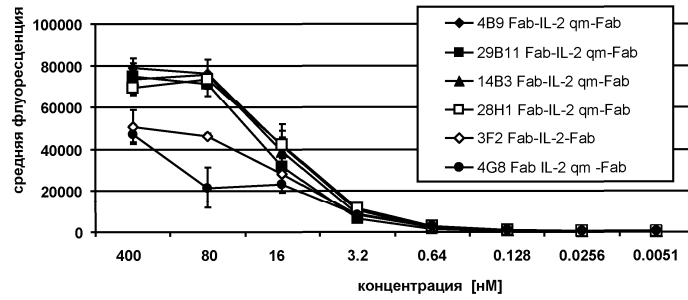
Фиг. 14



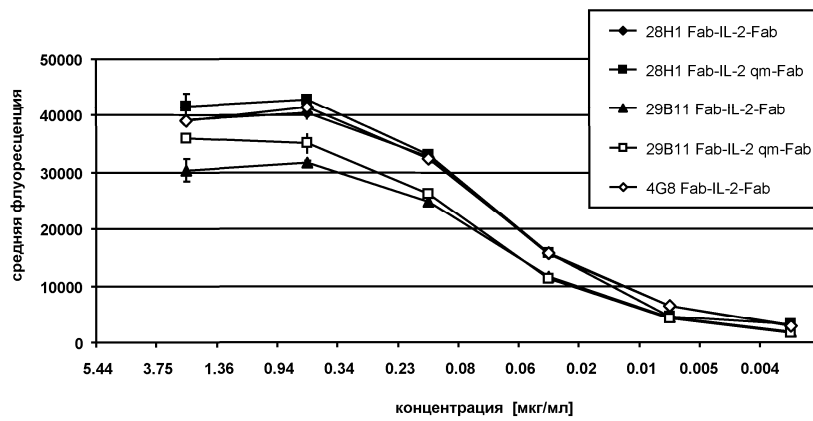
Фиг. 15



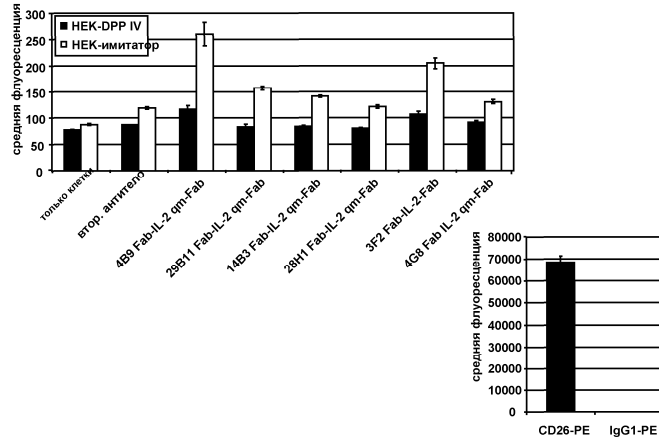
Фиг. 16



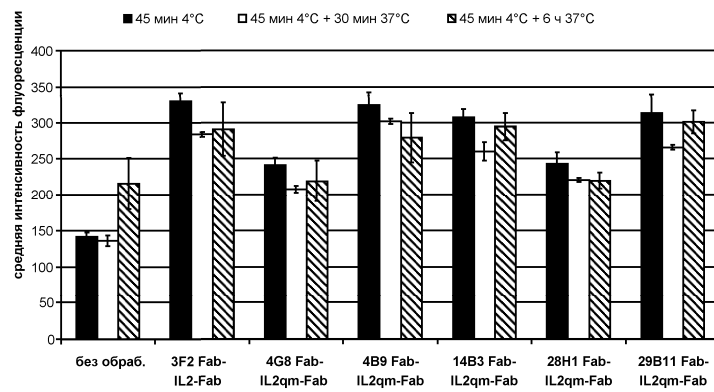
Фиг. 17



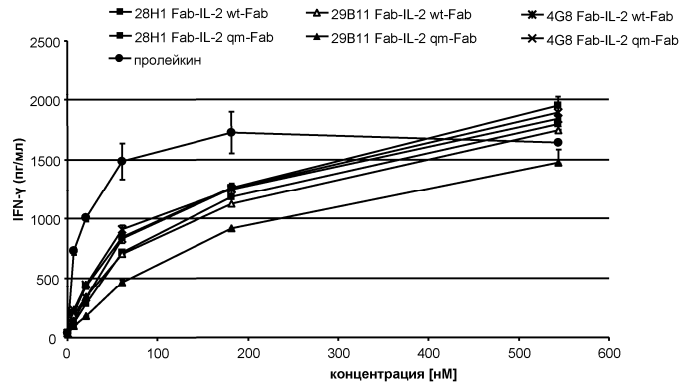
Фиг. 18



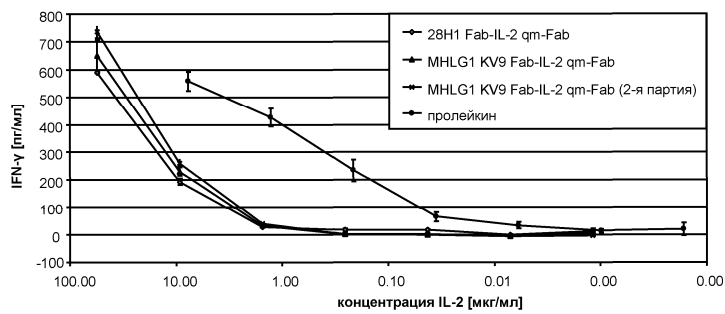
Фиг. 19



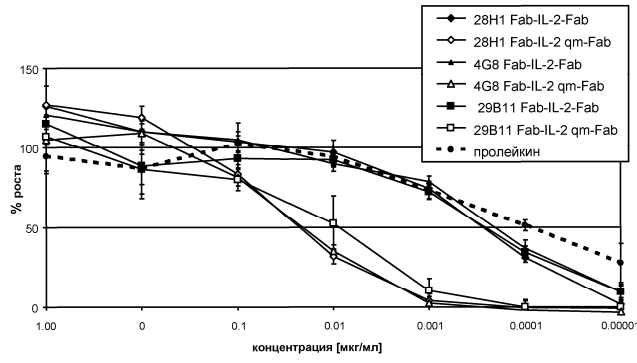
Фиг. 20



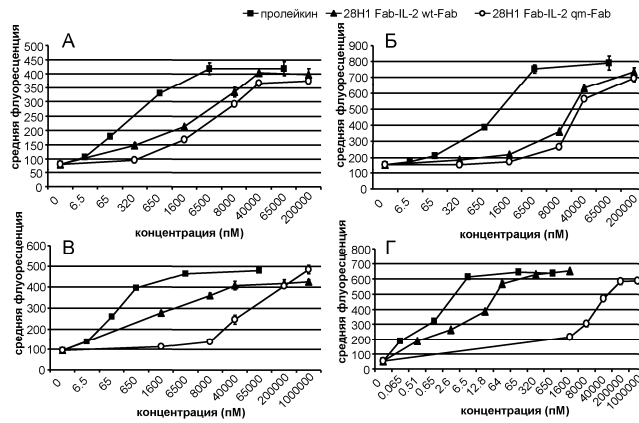
Фиг. 21



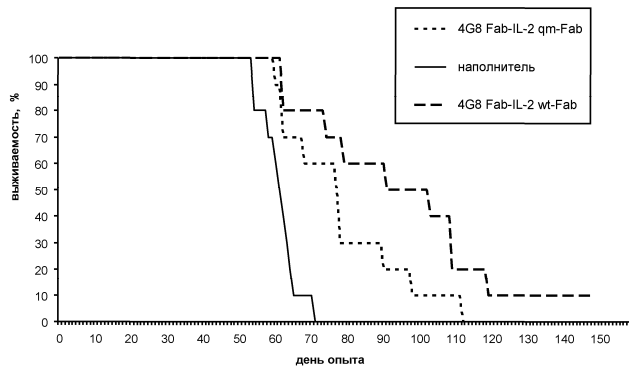
Фиг. 22



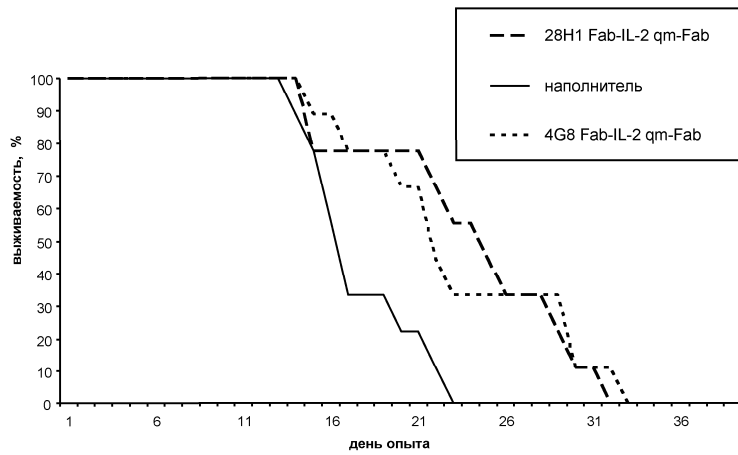
Фиг. 23



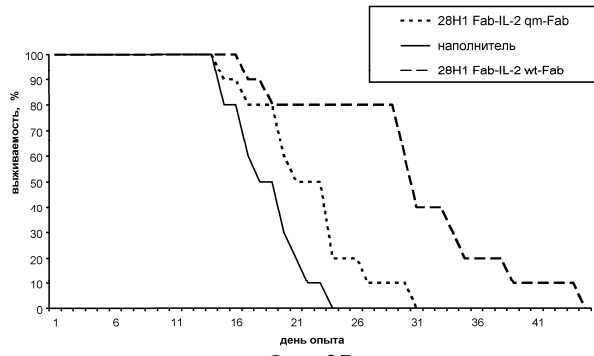
Фиг. 24



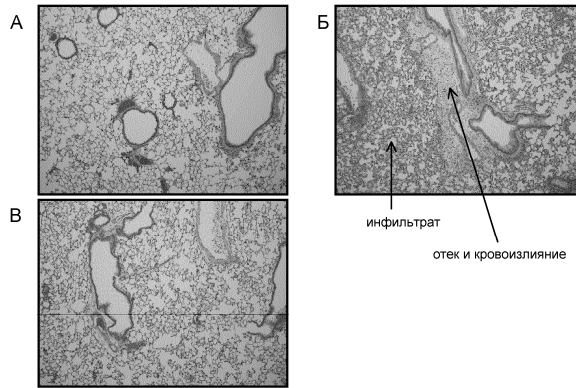
Фиг. 25



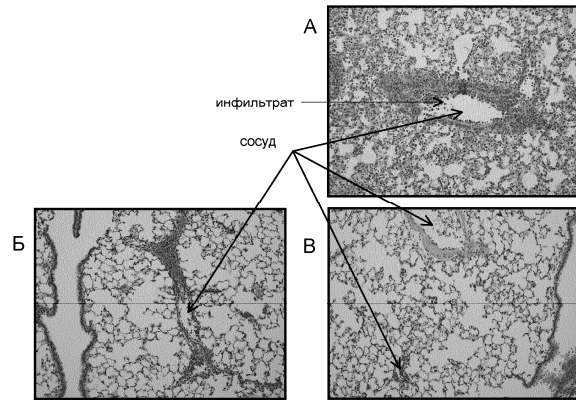
Фиг. 26



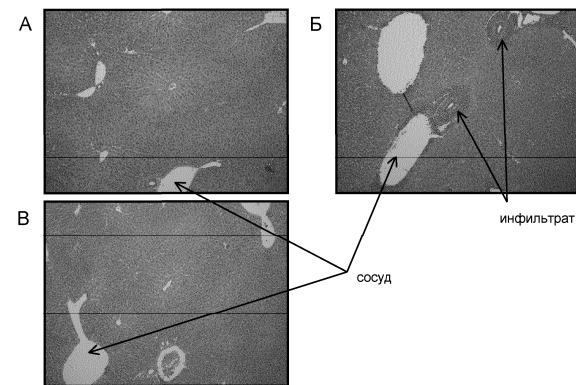
Фиг. 27



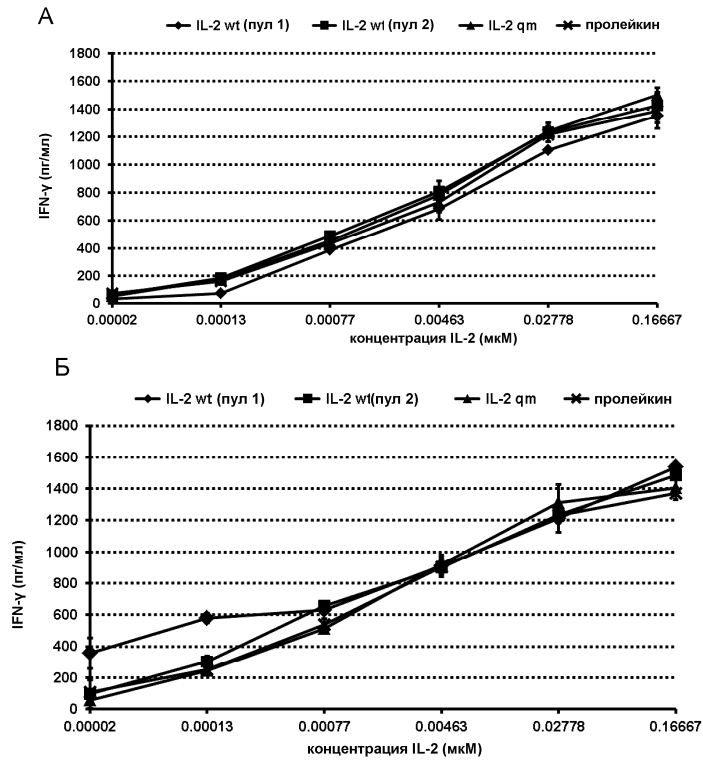
Фиг. 28



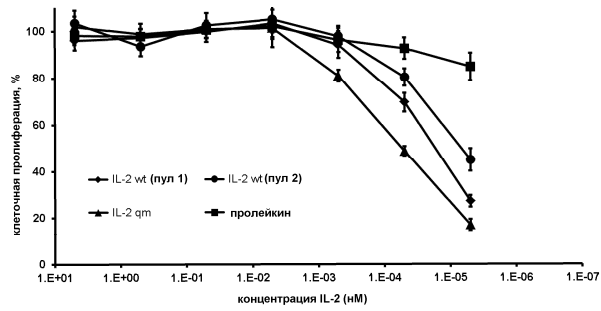
Фиг. 29



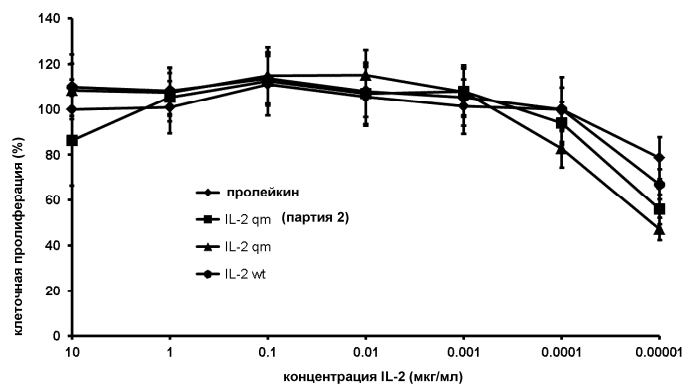
Фиг. 30



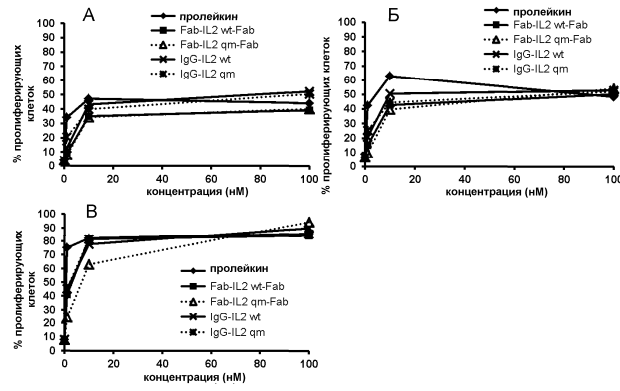
Фиг. 31



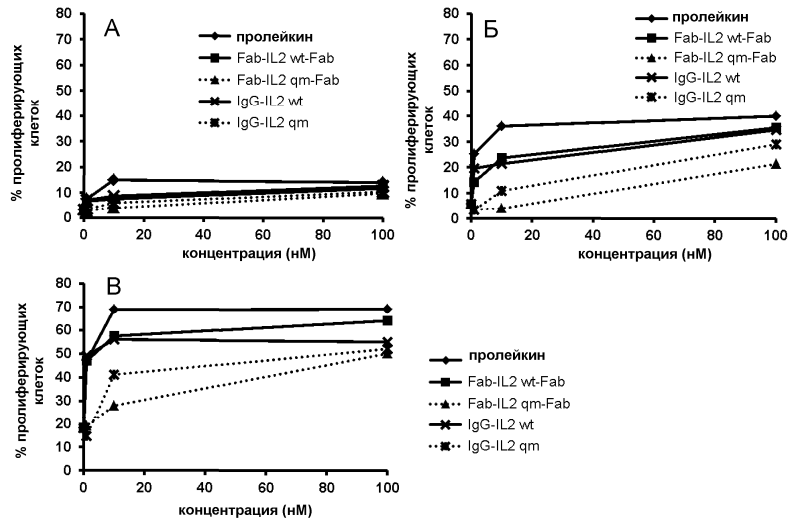
Фиг. 32



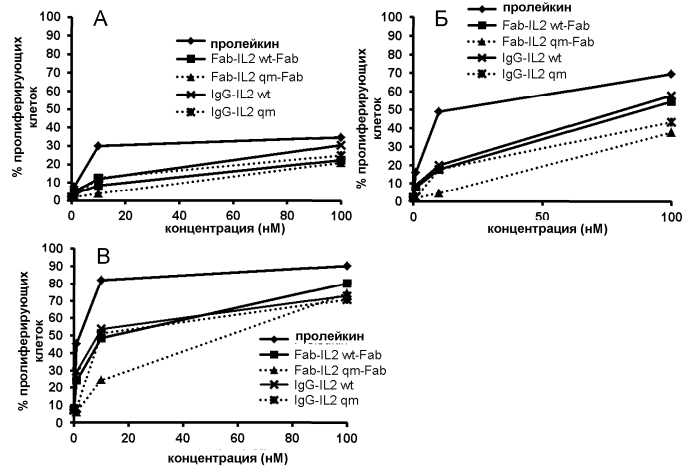
Фиг. 33



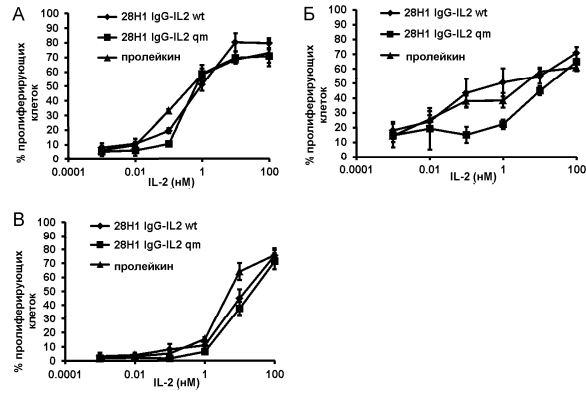
Фиг. 34



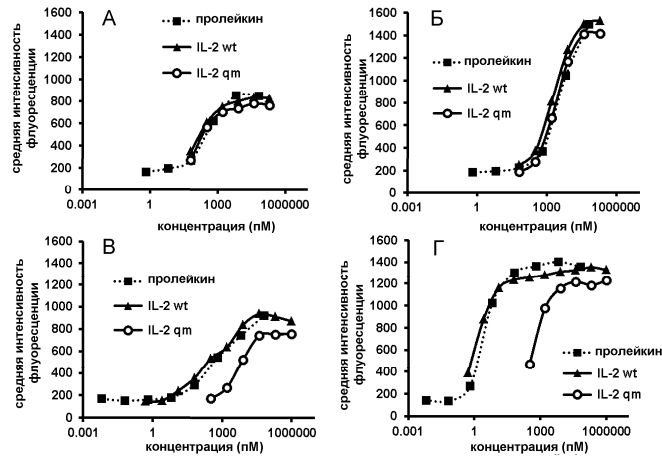
Фиг. 35



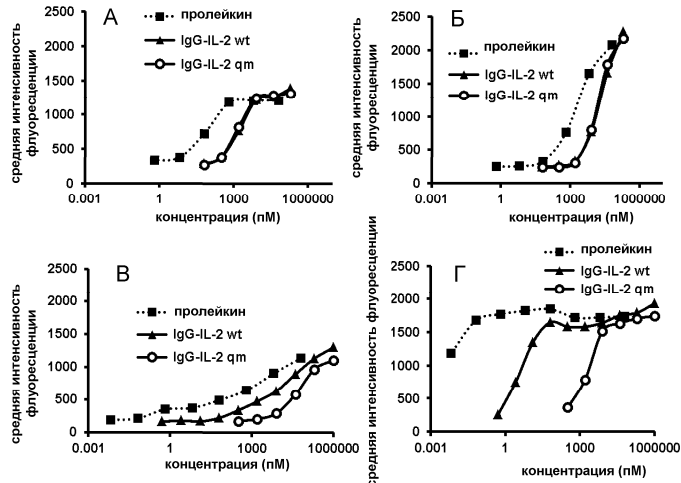
Фиг. 36



Фиг. 37

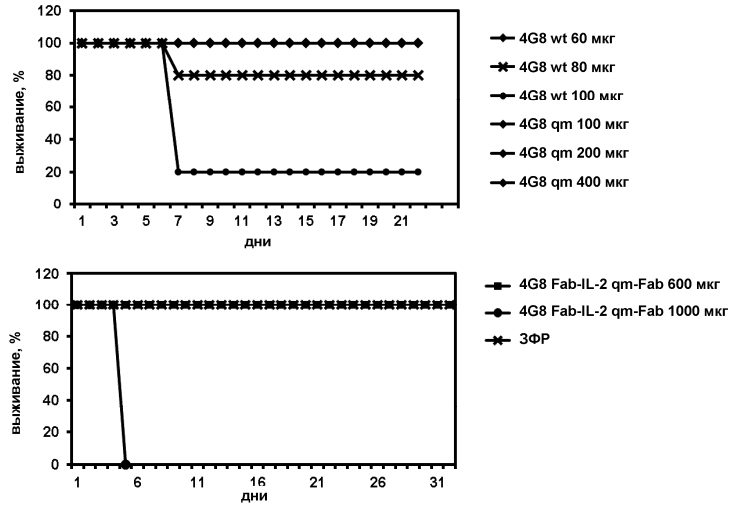


Фиг. 38

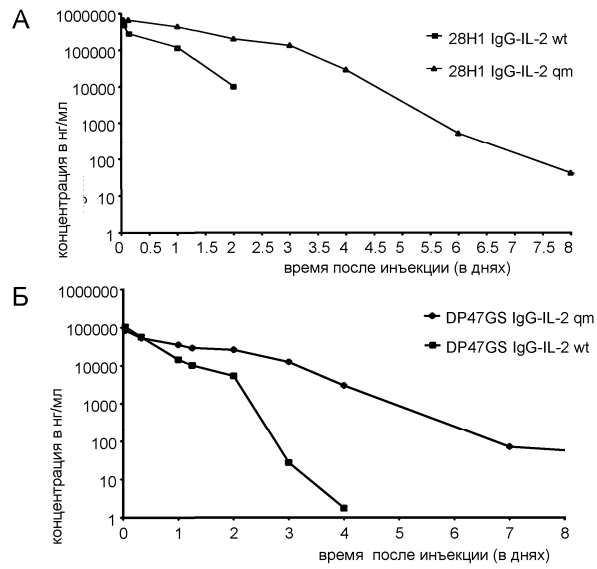


Фиг. 39

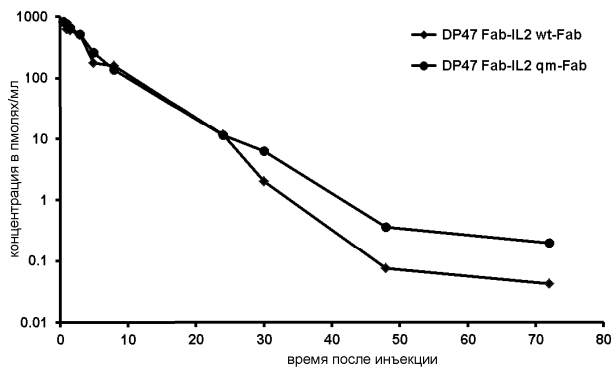




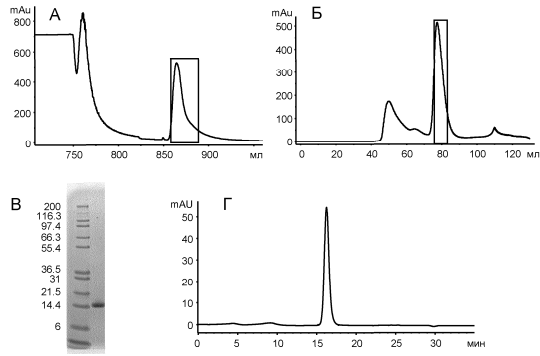
Фиг. 40



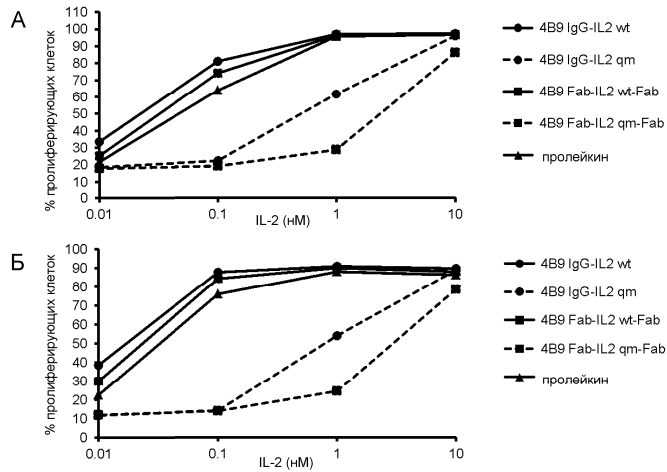
Фиг. 41



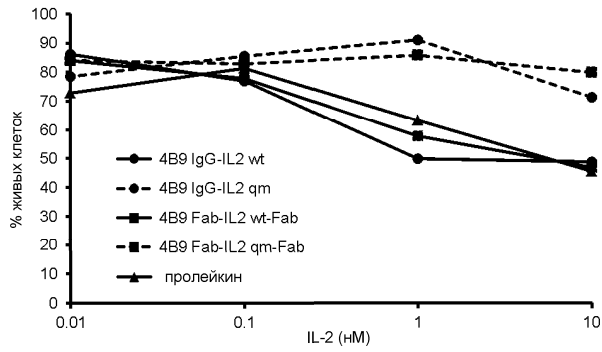
Фиг. 42



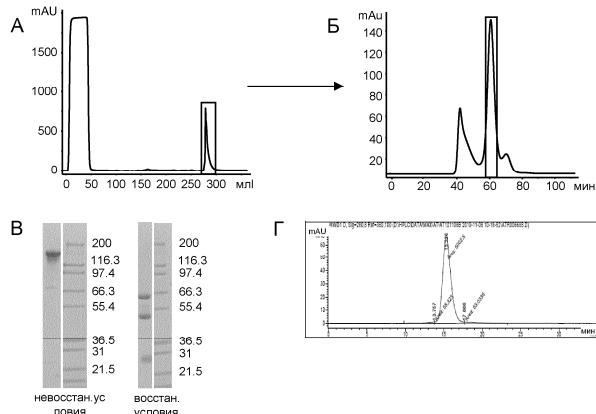
Фиг. 43



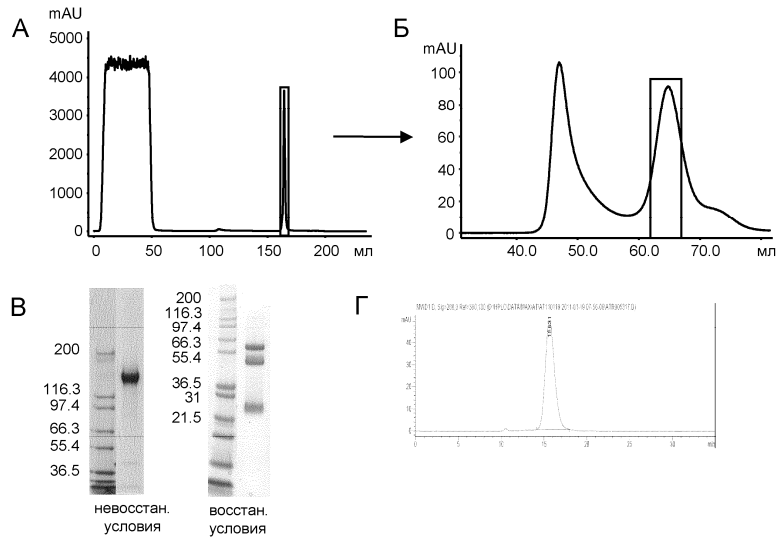
Фиг. 44



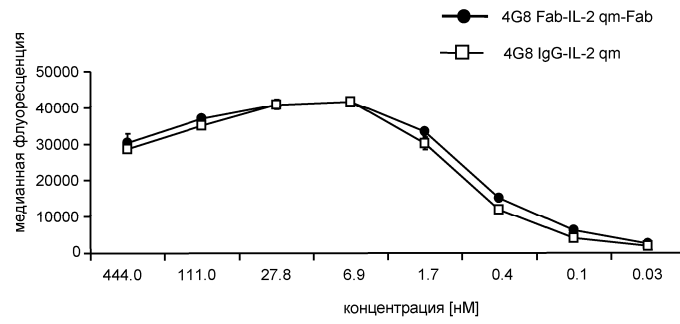
Фиг. 45



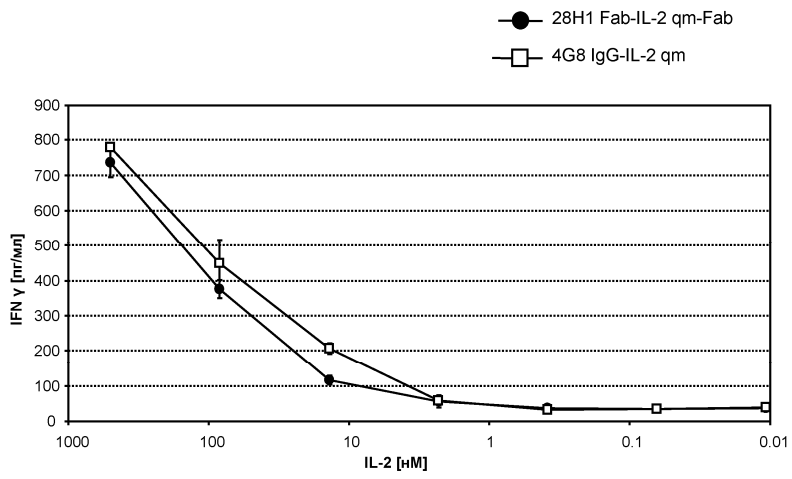
Фиг. 46



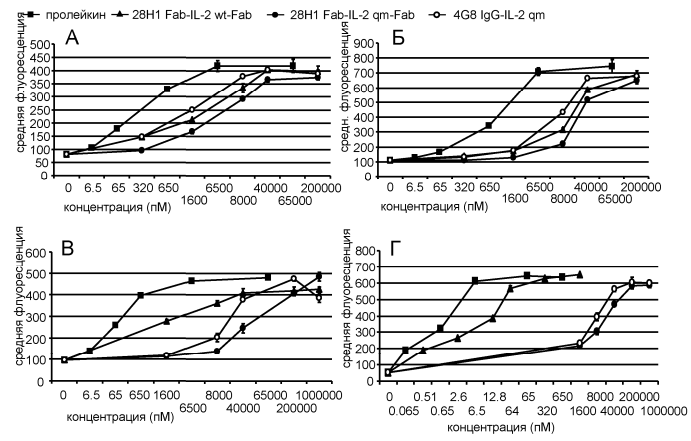
Фиг. 47



Фиг. 48



Фиг. 49



Фиг. 50