



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 14/55 (2021.08); C07K 16/2818 (2021.08); C07K 19/00 (2021.08); A61K 38/2013 (2021.08); A61K 39/00 (2021.08); A61K 47/6813 (2021.08); A61K 47/6849 (2021.08); A61K 47/6891 (2021.08); A61P 35/00 (2021.08); A61K 2039/505 (2021.08); C07K 2317/73 (2021.08); C07K 2319/74 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2019134338, 29.03.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.03.2018

Дата регистрации:
07.12.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
03.04.2017 EP 17164533.6

(43) Дата публикации заявки: 05.05.2021 Бюл. № 13

(45) Опубликовано: 07.12.2021 Бюл. № 34

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 05.11.2019

(86) Заявка РСТ:
EP 2018/058034 (29.03.2018)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2018/184964 (11.10.2018)

Адрес для переписки:
105082, Москва, пер. Спартаковский, 2, стр. 1,
секция 1, этаж 3, ЕВРОМАРКПАТ

(72) Автор(ы):

КОДАРРИ ДЕАК Лаура (CH),
КЛЯЙН Кристиан (CH),
ЛАУЭНЕР Лаура (CH),
НИКОЛИНИ Валерия (CH),
ЗЕБЕР Штефан (DE),
УМАНА Пабло (CH),
ВАЛЬДХАУЭР Инья (CH)

(73) Патентообладатель(и):

Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: EA 201690333 A1, 30.06.2016 HU
C.Y. ET AL., Interleukin-2 reverses CD8+ T cell
exhaustion in clinical malignang pleural effusion
of lung cancer, CLIN. EXP. IMMUNOL., 2016,
v.186, p.106 - 114 KLEBANOFF C.A. ET AL., IL-
15 enhances the in vivo antitumor activity of
tumor-reactive CD8+ cells, PNAS, 2004, v.101,
n.7, p.1969 - 1974 WO 2014023679 A1, (см.
прод.)

(54) ИММУНОКОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛА К PD-1 С МУТАНТОМ IL-2 ИЛИ С IL-15

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к иммуноконъюгатам, и может быть использовано в медицине для стимуляции иммунной системы и лечения рака. Получен иммуноконъюгат для таргетинга к цитотоксическим Т-лимфоцитам, содержащий антитело, которое связывается с PD-1, и мутантный IL-2 полипептид. Мутантный полипептид IL-2 представляет собой молекулу человеческого IL-2, содержащую три или пять аминокислотных замен F42A/Y45A/L72G или T3A/

F42A/Y45A/L72G/C125A. При этом мутантный полипептид IL-2 слит на его аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой одной из субъединиц Fc-домена, в частности с первой субъединицей Fc-домена, через линкерный пептид. Изобретение обеспечивает получение иммуноконъюгата с существенно более высокой противоопухолевой эффективностью in vivo по сравнению с аналогичным иммуноконъюгатом, таргетированным на PD-L1. 6 н. и 15 з.п. ф-лы, 32 ил., 12 табл., 8 пр.

(56) (продолжение):

13.02.2014 WO 2005087797 A1, 22.09.2005 TOKURIKI N. ET AL., Stability effects of mutations and protein evolvability, Curr. Opin. Struct. Biol., 2009, v.19, n.5, p.596-604 FRANKEL A.E. et al., Characterization of diphtheria fusion proteins targeted to the human interleukin-3 receptor, Protein Engineering, 2000, v. 13, n. 8, p. 575-581 EA 005404 B1, 24.02.2005 СКОСЫРЕВ В.С. и др., Зависимость стабильности гибридов зеленого флуоресцентного белка с обелином от природы составляющих их модулей и структуры аминокислотного линкера, Биооргани.химия, 2001, т.27, N 5, с.364-371 РОЙТ А. и др., Иммунология, Москва, "Мир", 2000, с. 110-111 RUDIKOFF S. et al., Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity, Proc Natl Acad Sci USA, 1982, v.79, n.6, p. 1979-1983 DASHIVETS T. et al., Oxidation in the complementarity-determining regions differentially influences the properties of therapeutic antibodies, MAbs, 2016, v. 8, p. 1525-1535 CHEN X. et al., Fusion protein linkers: property, design and functionality, Advanced drug delivery reviews, 2013, V. 65, N. 10, p.1357-1369 MAEDA Y. et al., Engineering of functional chimeric protein G-Vargula Luciferase, Analytical biochemistry, 1997, V. 249, N. 2, p.147-152.

R U 2 7 6 1 3 7 7 C 2

R U 2 7 6 1 3 7 7 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 14/55 (2006.01)*C07K 16/28* (2006.01)*C07K 19/00* (2006.01)*A61K 38/20* (2006.01)*A61K 39/00* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 14/55 (2021.08); *C07K 16/2818* (2021.08); *C07K 19/00* (2021.08); *A61K 38/2013* (2021.08); *A61K 39/00* (2021.08); *A61K 47/6813* (2021.08); *A61K 47/6849* (2021.08); *A61K 47/6891* (2021.08); *A61P 35/00* (2021.08); *A61K 2039/505* (2021.08); *C07K 2317/73* (2021.08); *C07K 2319/74* (2021.08)

(21)(22) Application: **2019134338, 29.03.2018**

(24) Effective date for property rights:
29.03.2018

Registration date:
07.12.2021

Priority:

(30) Convention priority:
03.04.2017 EP 17164533.6

(43) Application published: **05.05.2021 Bull. № 13**(45) Date of publication: **07.12.2021 Bull. № 34**(85) Commencement of national phase: **05.11.2019**

(86) PCT application:
EP 2018/058034 (29.03.2018)

(87) PCT publication:
WO 2018/184964 (11.10.2018)

Mail address:
**105082, Moskva, per. Spartakovskij, 2, str. 1,
sektiya 1, etazh 3, EVROMARKPAT**

(72) Inventor(s):

**KODARRI DEAK Laura (CH),
KLEIN Christian (CH),
LAUENER Laura (CH),
NIKOLINI Valeria (CH),
SEEBER Stefan (DE),
UMANA Pablo (CH),
WALDHAUER Inja (CH)**

(73) Proprietor(s):

F. Hoffmann-La Roche AG (CH)

(54) **IMMUNOCONJUGATES OF ANTIBODY TO PD-1 WITH IL-2 OR IL-15 MUTANT**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, namely to immunoconjugates; it can be used in medicine for the stimulation of the immune system and the treatment of cancer. An immunoconjugate is obtained for targeting cytotoxic T-lymphocytes, containing an antibody that binds to PD-1 and mutant IL-2 polypeptide. Mutant IL-2 polypeptide is a human IL-2 molecule containing three or five amino acid substitutions F42A/Y45A/L72G or

T3A/F42A/Y45A/L72G/C125A. Mutant IL-2 polypeptide is fused at its amino-end amino acid with carboxy-end amino acid with one of Fc-domain subunits, in particular with the first Fc-domain subunit, through linker peptide.

EFFECT: invention provides for obtaining an immunoconjugate with significantly higher anti-tumor efficiency in vivo in comparison with an analogue immunoconjugate targeted to PD-L1.

21 cl, 32 dwg, 12 tbl, 8 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится в целом к иммуноконъюгатам, в частности иммуноконъюгатам, которые содержат мутантный полипептид интерлейкина-2 и антитело, которое связывается с PD-1. Кроме того, изобретение относится к

5 полинуклеотидным молекулам, которые кодируют иммуноконъюгаты, и векторам и клеткам-хозяевам, которые содержат указанные полинуклеотидные молекулы. Изобретение относится также к способам получения мутантных иммуноконъюгатов, фармацевтическим композициям, которые их содержат, и их применениям.

Предпосылки создания изобретения

10 Интерлейкин-2 (IL-2), известный также как фактор роста Т-клеток (TCGF), представляет собой глобулярный гликопротеин с молекулярной массой 15,5 кДа, играющий основную роль в образовании, выживании и гомеостазе лимфоцитов. Он имеет 133 аминокислоты в длину и состоит из четырех антипараллельных амфипатических α -спиралей, которые формируют четвертичную структуру, необходимую для его функции

15 (Smith, Science 240, 1988, сс. 1169-1176; Bazan, Science 257, 1992, сс. 410-413).

Последовательности IL-2 различных видов депонированы под регистрационными номерами NCBI RefSeq NP000577 (человеческая), NP032392 (мышьяная), NP446288 (крысиная) или NP517425 (шимпанзе).

IL-2 проявляет свое действие путем связывания с рецепторами для IL-2 (IL-2R),

20 которые состоят из индивидуальных (числом вплоть до трех) субъединиц, различная ассоциация которых может приводить к образованию форм рецепторов, которые отличаются по их аффинности к IL-2. Ассоциация α -(CD25), β -(CD122) и γ -(γ_c , CD132) субъединиц приводит к образованию тримерного высокоаффинного рецептора для IL-2. Димерный рецептор IL-2 состоит из β - и γ -субъединиц и его называют IL-2R с

25 промежуточной аффинностью, α -субъединица образует мономерный низкоаффинный рецептор для IL-2. Хотя димерный с промежуточной аффинностью рецептор для IL-2 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 сигнал при связывании с IL-2 (Minami

30 и др., Annu Rev Immunol 11, 1993, сс. 245-268). В отличие от этого, α -субъединица, CD25, не имеет решающего значения для передачи сигналов IL-2. Она характеризуется высокоаффинным связыванием с ее рецептором, в то время как β -субъединица, CD122, и γ -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,

35 экспрессируются (покоящимися) регуляторными CD4⁺ forkhead box P3 (FoxP3)⁺ Т-клетками (T_{reg}). Они также кратковременно индуцируются на канонических активированных Т-клетках, в то время как в покоящемся состоянии эти клетки экспрессируют только димерные рецепторы для IL-2. T_{reg}-клетки постоянно

40 экспрессируют наиболее высокий уровень CD25 in vivo (Fontenot и др., Nature Immunol 6, 2005, сс. 1142-1151).

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

45 дифференцировку лимфоцитов периферической крови в цитотоксические клетки и лимфокин-активированные клетки-киллеры (LAK), усиливает экспрессию цитокинов и цитотоксических молекул Т-клетками, облегчает пролиферацию и дифференцировку В-клеток и синтез иммуноглобулинов В-клетками и стимулирует образование,

пролиферацию и активацию естественных клеток-киллеров (NK) (см. обзор, например, у Waldmann, *Nat Rev Immunol* 6, 2009, сс. 595-601; Olejniczak и Kasprzak, *Med Sci Monit* 14, 2008, сс. RA179-89; Malek, *Annu Rev Immunol* 26, 2008, сс. 453-479).

Способность увеличивать популяции лимфоцитов *in vivo* и повышать эффекторные функции этих клеток обуславливают противоопухолевые действия IL-2, что делает иммунотерапию на основе IL-2 привлекательным вариантом лечения некоторых метастатических раков. Так, лечение высокими дозами IL-2 разрешено для применения на пациентах с метастатической почечноклеточной карциномой и злокачественной меланомой.

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

Основным механизмом, лежащим в основе периферической ауто толерантности, является индуцированная активацией, индуцированной IL-2, клеточная гибель (AICD) Т-клеток. AICD представляет собой процесс, с помощью которого полностью активированные Т-клетки подвергаются запрограммированной клеточной гибели путем контакта с экспрессируемыми на клеточной поверхности рецепторами смерти, такими как CD95 (известный также как Fas) или TNF-рецептор. Когда активированные антигеном Т-клетки, экспрессирующие высокоаффинный рецептор IL-2 (после предварительного воздействия IL-2) в процессе пролиферации, повторно стимулируются антигеном через комплекс Т-клеточный рецептор (TCR)/CD3, индуцируется экспрессия лиганда для Fas (FasL) и/или фактора некроза опухоли (TNF), делая клетки чувствительными к опосредуемому Fas апоптозу. Этот процесс зависит от IL-2 (Lenardo, *Nature* 353, 1991, сс. 858-861) и опосредуется через STAT5. С помощью процесса AICD в Т-лимфоцитах может создаваться толерантность не только к аутоантигенам, но также к персистентным антигенам, которые очевидно не являются частью структуры хозяина, таким как опухолевые антигены.

Кроме того, IL-2 участвует также в поддержании периферических CD4⁺ CD25⁺ регуляторных Т-клеток (T_{reg}) (Fontenot и др., *Nature Immunol* 6, 2005, сс. 1142-1151; D'Cruz и Klein, *Nature Immunol* 6, 2005, сс. 1152-1159); Maloy и Powrie, *Nature Immunol* 6, 2005, сс. 1171-1172, которые известны также как супрессорные Т-клетки. Они подавляют разрушение эффекторными Т-клетками их (ауто)мишеней либо посредством контакта клетка-клетка путем ингибирования хелперной функции и активации Т-клеток, либо посредством высвобождения иммуносупрессорных цитокинов, таких как IL-10 или TGF-β. Установлено, что истощение T_{reg} клеток повышает индуцированный 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 созданные CTL могут распознавать опухоль как «свою» и подвергаться AICD, либо иммунный ответ может ингибироваться IL-2-зависимыми T_{reg}-клетками.

Другой проблемой иммунотерапии с использованием IL-2 являются побочные действия, возникающие при обработке рекомбинантным человеческим IL-2. У пациентов, получающих высокодозное лечение IL-2, часто проявлялись серьезные сердечно-сосудистые, легочные, почечные, печеночные, желудочно-кишечные, неврологические, кожные, гематологические и системные нежелательные явления, требующие интенсивного мониторинга и стационарного лечения. Большинство указанных побочных действий можно объяснить развитием, так называемого васкулярного (или

капиллярного) просачивания (VLS), т.е. патологического повышения проницаемости сосудов, приводящего к транссудации жидкости в нескольких органах (что вызывает, например, легочный или кожный отек и повреждение клеток печени) и к истощению внутрисосудистой жидкости (что вызывает снижение кровяного давления и компенсаторное повышение сердечного ритма). Не существует другого подхода к лечению VLS, кроме устранения IL-2. Во избежание VLS на пациентах изучены низкодозные режимы IL-2, однако полученные результаты оказались ниже субоптимальных. Предполагалось, что VLS вызывается высвобождением провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли (TNF)- α из активированных IL-2 NK-клеток, однако в настоящее время установлено, что индуцированный IL-2 отек легких является результатом непосредственного связывания IL-2 с эндотелиальными клетками легких, которые экспрессируют функциональные $\alpha\beta\gamma$ IL-2-рецепторы с уровнями от низких до умеренных (Krieg и др., Proc Nat Acad Sci USA 107, 2010, сс. 11906-11911).

Разработано несколько подходов для решения указанных проблем, связанных с иммунотерапией IL-2. Например, было установлено, что комбинация IL-2 с некоторыми моноклональными антителами к IL-2 повышает эффективность лечения с помощью IL-2 in vivo (Kamimura и др., J Immunol 177, 2006, сс. 306-314; Boymann и др., Science 311, 2006, сс. 1924-1927). В качестве альтернативного подхода IL-2 подвергали различными путями мутациям для снижения его токсичности и/или повышения его эффективности. Ни с соавторами (Blood 101, 2003, сс. 4853-4861, публикация патента США №2003/0124678) осуществляли замену остатка аргинина в положении 38 IL-2 на триптофан для элиминации способности IL-2 проникать в сосуды. Shanafelt с соавторами (Nature Biotechnol 18, 2000, сс. 1197-1202) осуществляли замену путем мутации аспарагина в положении 88 на аргинин для повышения избирательности в отношении Т-клеток по сравнению с NK-клетками. 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) осуществляли замену трех остатков в IL-2 (Asp20Thr, Asn88Arg и Gln126Asp), которая повышала 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, осуществляя аминокислотную замену Arg38Trp и Phe42Lys, для уменьшения взаимодействия с CD25 и активации T_{reg}-клеток с целью повышения эффективности. Для этой же цели Wittrup с соавторами (WO 2009/061853) получали мутантов IL-2, которые обладали повышенной аффинностью к CD25, но не активировали рецептор, действуя тем самым в качестве антагонистов. Интродуцированные мутации способствовали нарушению взаимодействия с β - и/или γ -субъединицей рецептора.

Конкретный мутантный полипептид IL-2, созданный для преодоления вышеуказанных проблем, связанных с иммунотерапией IL-2 (токсичность, вызываемая индукцией VLS, толерантность к опухолям, вызываемая AICD, и иммуносупрессия, вызываемая активацией T_{reg}-клеток) описан в WO 2012/107417. Замена остатка фенилаланина в положении 42 на аланин, остатка тирозина в положении 45 на аланин и остатка лейцина в положении 72 IL-2 на глицин практически устраняла связывание указанного мутантного полипептида IL-2 с α -субъединицей рецептора IL-2 (CD25).

Помимо использования вышеуказанных подходов иммунотерапию IL-2 можно улучшать путем избирательного таргетинга IL-2 к опухолям, например, в форме иммуноконъюгатов, содержащих антитело, которое связывается с антигеном,

экспрессируемым на опухолевых клетках. Несколько таких иммуноконъюгатов описаны (см., например, Ко и др., *J Immunother* 27, 2004, сс. 232-239; Klein и др., *Oncoimmunology* 6(3), 2017, e1277306).

Однако опухоли могут ускользать от указанного таргетинга путем сбрасывания, мутации или понижающей регуляции антигена-мишени для антитела. Кроме того, таргетированный на опухоль IL-2 может не иметь оптимального контакта с эффекторными клетками, такими как цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), в микроокружениях опухолей, которые фактически не включают лимфоциты.

Таким образом, сохраняется необходимость в дополнительном совершенствовании иммунотерапии на основе IL-2. Подходом, который может преодолеть проблемы таргетинга опухолей, заключается в таргетинге IL-2 непосредственно к эффекторным клеткам, в частности CTL.

Ghasemi с соавторами описали слитый белок, включающий IL-2 и NKG2D-связывающий белок (Ghashemi и др., *Nat Comm* 7, 2016, с. 12878), для таргетинга IL-2 к несущим NKG2D клеткам, таким как естественные клетки-киллеры (NK).

Белок запрограммированной смерти клеток 1 (PD1 или CD279) является обладающим ингибирующей способностью членом CD28-семейства рецепторов, которое включает также CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD1 представляет собой рецептор клеточной поверхности, и он экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Okazaki и др., *Curr. Opin. Immunol.* 14, 2002, сс. 391779-391782; Bennett и др., *J Immunol* 170, 2003, сс. 711-718). Структура PD1 соответствует структуре мономерного трансмембранного белка типа 1, состоящей из одного внеклеточного домена, подобного вариабельному домену иммуноглобулина, и цитоплазматического домена, содержащего иммунорецепторный ингибиторный мотив на основе тирозина (ITIM) и иммунорецепторный переключающий мотив на основе тирозина (ITSM).

Идентифицировано два лиганда для PD-1, PD-L1 и PD-L2, которые, как установлено, обеспечивают понижающую регуляцию Т-клеточной активации при связывании с PD-1 (Freeman и др., *J Exp Med* 192, 2000, сс. 1027-1034; Latchman и др., *Nat Immunol* 2, 2001, сс. 261-268; Carter и др., *Eur J Immunol* 32, 2002, сс. 634-643). И PD-L1, и PD-L2 оба являются гомологами B7, которые связываются с PD-1, но не связываются с другими членами семейства CD28. Один лиганд для PD-1, PD-L1, широко распространен при различных видах человеческого рака (Dong и др., *Nat. Med* 8, 2002, сс. 787-789).

Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 приводит к снижению количества инфильтрующих опухоль лимфоцитов, снижению опосредуемой Т-клеточным рецептором пролиферации и ускользанию канцерогенных клеток от иммунологического надзора (Dong и др., *J. Mol. Med.* 81, 2003, сс. 281-287; Blank и др., *Cancer Immunol. Immunother.* 54, 2005, сс. 307-314; Konishi и др., *Clin. Cancer Res.* 10, 2004, сс. 5094-5100). Иммунная супрессия может реверсироваться путем ингибирования местного взаимодействия PD-1 с PD-L1, и этот эффект является аддитивным, когда блокируется также взаимодействие PD-1 с PD-L2 (Iwai и др., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99, 2002, сс. 12293-12297; Brown и др., *J. Immunol.* 170, 2003, сс. 1257-1266).

Антитела, которые связываются с PD-1, описаны, например, в публикации заявки на патент PCT № PCT/EP2016/073248.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложен новый подход таргетинга мутантной формы IL-2 с характеристиками, обеспечивающими преимущества с позиции иммунотерапии, непосредственно к иммунным эффекторным клеткам, таким как цитотоксические Т-лимфоциты, а не к опухолевым клеткам. Таргетинг к иммунным эффекторным клеткам

достигается путем конъюгации мутантной молекулы IL-2 с антителом, которое связывается с PD-1.

Мутант IL-2, применяемый в настоящем изобретении, был создан для преодоления проблем, связанных с иммунотерапией IL-2, в частности, токсичности, вызываемой индукцией VLS, опухолевой толерантности, вызываемой AICD, и иммуносупрессии, вызываемой активацией T_{reg}-клеток. В дополнение к решению вопроса ускользания опухолей от описанного выше таргетинга опухолей, таргетинг мутанта IL-2 к иммунным эффекторным клеткам может повышать также преимущественную активацию CTL по сравнению с иммуносупрессорными T_{reg} клетками. Путем применения антитела, которое связывается с PD-1, подавление Т-клеточной активности, индуцированной взаимодействием PD-1 с его лигандом PD-L1, можно дополнительно реверсировать, дополнительно усиливая тем самым иммунный ответ.

Слитый белок IL-2, содержащий антитело к PD-L1 атезолизумаб, описан у Chen с соавторами (Chen и др., Biochem Biophys Res Comm 480, 2016, сс. 160-165).

Следует отметить, что иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, который содержит антитело, связывающееся с PD-1, характеризуется существенно более высокой противоопухолевой эффективностью *in vivo* по сравнению с аналогичным иммуноконъюгатом, таргетированным на PD-L1 (см. пример 3, ниже).

Основным объектом изобретения является иммуноконъюгат, содержащий антитело, которое связывается с PD-1, и полипептид, который передает сигналы через IL-2Rβγ. Полипептид, передающий сигналы через IL-2Rβγ, представляет собой, в частности, полипептид IL-2 или полипептид IL-15. Первым объектом изобретения является иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид IL-2 и антитело, которое связывается с PD-1, в котором мутантный полипептид IL-2 представляет собой молекулу человеческого IL-2, содержащую аминокислотные замены F42A, Y45A и L72G (нумерация соответствует последовательности SEQ ID NO: 19 человеческого IL-2).

Следующим объектом изобретения является иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид IL-2 и антитело, которое связывается с PD-1, в котором мутантный полипептид IL-2 представляет собой молекулу человеческого IL-2, содержащую аминокислотные замены F42A, Y45A и L72G (нумерация соответствует последовательности SEQ ID NO: 19 человеческого IL-2); и в котором антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую HVR-H1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HVR-H2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HVR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и FR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 в положениях 71-73 согласно нумерации Кэбота, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую HVR-L1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HVR-L2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и HVR-L3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, или в котором антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую HVR-H1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, HVR-H2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и HVR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую HVR-L1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, HVR-L2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и HVR-L3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

Другим объектом изобретения является иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид IL-2 и антитело, которое связывается с PD-1, в котором мутантный полипептид IL-2 представляет собой молекулу человеческого IL-2, содержащую аминокислотные замены F42A, Y45A и L72G (нумерация соответствует последовательности SEQ ID NO: 19 человеческого IL-2); и в котором антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, мутантный полипептид IL-2 дополнительно содержит аминокислотную замену T3A и/или аминокислотную замену C125A. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 содержит последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит не более одного мутантного полипептида IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц. В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG-класса, в частности IgG₁-подкласса, и/или Fc-домен представляет собой человеческий Fc-домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело относится к IgG-классу, в частности к IgG₁-подклассу иммуноглобулинов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых иммуноконъюгат содержит Fc-домен, Fc-домен содержит модификацию, способствующую ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления изобретения в СНЗ-доме первой субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, имеющий больший объем боковой цепи, что приводит к образованию выпуклости в СНЗ-доме первой субъединицы, которая может помещаться в полость в СНЗ-доме второй субъединицы, а в СНЗ-доме второй субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, имеющий меньший объем боковой цепи, что приводит к образованию полости в СНЗ-доме второй субъединицы, в которую может помещаться выпуклость в СНЗ-доме первой субъединицы. В некоторых вариантах осуществления изобретения в первой субъединице Fc-домена остаток треонина в положении 366 заменяют на остаток триптофана (T366W), а во второй субъединице Fc-домена остаток тирозина в положении 407 заменяют на остаток валина (Y407V) и необязательно остаток треонина в положении 366 заменяют на остаток серина (T366S) и остаток лейцина в положении 368 заменяют на остаток аланина (L368A) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения в первой субъединице Fc-домена дополнительно остаток серина в положении 354 заменяют на остаток цистеина (S354C) или остаток глутаминовой кислоты в положении 356 заменяют на остаток цистеина (E356C), а во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток тирозина в положении 349 заменяют на остаток цистеина (Y349C) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 сливают на его аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой одной из субъединиц Fc-домена, в частности первой субъединицы Fc-домена,

необязательно через линкерный пептид. В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения линкерный пептид имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых иммуноконъюгат
5 содержит Fc-домен, Fc-домен содержит одну или несколько аминокислотных замен, которая(ые) снижает(ют) связывание с Fc-рецептором, в частности с Fcγ-рецептором, и/или эффекторную функцию, в частности антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC). В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения указанная(ые) одна или несколько аминокислотная(ых) замена(н) находится(ятся) в
10 одном или нескольких положениях, выбранных из группы L234, L235 и P329 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый
15 в изобретении, содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 22, полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID
20 NO: 23 или SEQ ID NO: 24, и полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат практически состоит из мутантного полипептида IL-2 и молекулы иммуноглобулина IgG₁-подкласса, которые
25 сцеплены линкерной последовательностью.

В изобретении предложен также один или несколько выделенных полинуклеотидов, кодирующих иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, один или несколько векторов (в частности экспрессионных векторов), содержащих указанный(е) полинуклеотиды или указанный(е) вектор(ы).

Предложен также способ получения иммуноконъюгата, содержащего мутантный
30 полипептид IL-2 и антитело, которое связывается с PD-1, который включает (а) культивирование клетки-хозяина, предлагаемой в изобретении, в условиях, пригодных для экспрессии иммуноконъюгата, и необязательно (б) выделение иммуноконъюгата. Кроме того, в изобретении предложен иммуноконъюгат, содержащий мутантный
35 полипептид IL-2 и антитело, которое связывается с PD-1, полученный с помощью указанного способа.

В изобретении предложена также фармацевтическая композиция, которая содержит иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, и фармацевтически приемлемый
40 носитель, и способы применения иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении.

В частности, в изобретении предложен иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, предназначенный для применения в качестве лекарственного средства и для применения для лечения заболевания. В конкретном варианте осуществления изобретения указанное заболевание представляет собой рак.

Кроме того, в изобретении предложено применение иммуноконъюгата, предлагаемого
45 в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения заболевания. В конкретном варианте осуществления изобретения указанное заболевание представляет собой рак.

Кроме того, предложен способ лечения заболевания у индивидуума, включающий

введение указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве композиции, которая содержит иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, в фармацевтически приемлемой форме. В конкретном варианте осуществления изобретения указанное заболевание представляет собой рак.

- 5 Предложен также способ стимуляции иммунной системы индивидуума, включающий введение указанному индивидууму в эффективном количестве композиции, которая содержит иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, в фармацевтически приемлемой форме.

Подробное описание изобретения

- 10 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
15 источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек) и грызуны (например, мыши и крысы). Под понятие подпадает непротессированный IL-2, а также любая форма IL-2, полученная в результате процессинга в клетке. Под понятие подпадают также встречающиеся в естественных условиях варианты IL-2, например, сплайсинговые варианты или аллельные варианты.
20 В качестве примера аминокислотная последовательность человеческого IL-2 представлена в SEQ ID NO: 19. Непротессированный человеческий IL-2 дополнительно содержит расположенный на N-конце состоящий из 20 аминокислот сигнальный пептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 26, который отсутствует в зрелой молекуле IL-2.

- 25 В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие «мутант IL-2» или «мутантный полипептид IL-2» относится к любым мутантным формам различных форм молекулы IL-2, включая полноразмерный IL-2, укороченные формы IL-2 и формы, в которых IL-2 связан с другой молекулой, например, путем слияния или химической конъюгации. Подразумевается, что понятие «полноразмерный», применяемое касательно
30 IL-2, означает зрелую молекулу IL-2, имеющую встречающуюся в естественных условиях длину. Например, полноразмерный человеческий IL-2 означает молекулу, которая имеет 133 аминокислоты (см., например, SEQ ID NO: 19). Различные формы мутантов IL-2 характеризуются наличием по меньшей мере одной аминокислотной мутации, влияющей на взаимодействие IL-2 с CD25. Указанная мутация может включать замену,
35 делецию, укорочение или модификацию аминокислотного остатка дикого типа, локализованного в норме в указанном положении. Предпочтительными являются мутации, полученные путем аминокислотной замены. Если специально не указано иное, то понятие «мутант IL-2» может рассматриваться в настоящем описании как мутант пептидной последовательности IL-2, мутант полипептида IL-2, мутант белка IL-2 или
40 мутант аналога IL-2.

- В настоящем описании обозначение различных форм IL-2 осуществляют относительно последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19. В настоящем контексте для описания одной и той же мутации можно применять различные обозначения. Например, мутацию, приводящую к замене фенилаланина в положении 42 на аланин, можно
45 обозначать как 42A, A42, A₄₂, F42A или Phe42Ala.

В контексте настоящего описания понятие «молекула человеческого IL-2» означает молекулу IL-2, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 91%, по меньшей

мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 93%, по меньшей мере примерно на 94%, по меньшей мере примерно на 95% или по меньшей мере примерно на 96% последовательности человеческого IL-2 SEQ ID NO: 19. В частности, идентичность последовательности составляет по меньшей мере примерно 95%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 96%. В конкретных вариантах осуществления изобретения молекула человеческого IL-2 представляет собой полноразмерную молекулу IL-2.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие «аминокислотная мутация» включает аминокислотные замены, делеции, инсерции и модификации. Можно осуществлять любую комбинацию замены, делеции, инсерции и модификации для получения конечной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками, например, пониженным связыванием с CD25. Делеции и инсерции аминокислотной последовательности включают amino- 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 неконсервативные аминокислотные замены, т.е. замена одной аминокислоты на другую аминокислоту, которая имеет другие структурные и/или химические свойства, являются особенно предпочтительными. Предпочтительные аминокислотные замены включают замену гидрофобной аминокислоты на гидрофильную. Аминокислотные замены включают замену на не встречающиеся в естественных условиях аминокислоты на встречающиеся в естественных условиях аминокислотные производные 20 стандартных аминокислот (например, 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 сайтнаправленный мутагенез, ПЦР, синтез генов и т.п. Подразумевается, что можно применять также методы изменения группы боковой цепи аминокислоты с помощью методов, отличных от генетической инженерии, таких как химическая модификация.

В контексте настоящего описания форма «дикого типа» IL-2 представляет собой форму IL-2, которая в основном является такой же, что и у мутантного полипептида IL-2 за исключением того, что форма дикого типа имеет аминокислоту 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 какой-либо другой молекулой), то дикая форма указанного мутанта представляет собой полноразмерный нативый IL-2. Если мутант IL-2 представляет собой слияние между IL-2 и другим полипептидом, кодируемым в прямом направлении относительно IL-2 (например, цепью антитела), то дикая форма этого мутанта IL-2 представляет собой IL-2 с аминокислотной последовательностью дикого типа, слитой с таким же расположенным в прямом направлении полипептидом. Кроме того, если мутант IL-2 представляет собой укороченную форму IL-2 (мутантную или модифицированную последовательность в неукороченной части IL-2), то форма дикого типа указанного мутанта IL-2 представляет собой аналогично укороченный IL-2, который имеет последовательность дикого типа. Для сравнения аффинности связывания рецептора IL-2 или биологической активности различных форм мутантов IL-2 с соответствующей формой дикого типа IL-2, подразумевается, что под понятие «дикий тип» подпадают формы IL-2, которые содержат одну или несколько аминокислотную (ых) мутацию(й), которая(ые) не влияет(ют) на связывание с рецептором IL-2 по

сравнению со встречающимся в естественных условиях нативным IL-2, такие, например, как замена цистеина в положении, соответствующем остатку 125 человеческого IL-2, на аланин. В некоторых вариантах осуществления изобретения IL-2 дикого типа для целей настоящего изобретения содержит аминокислотную замену C125A (см. SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид IL-2 дикого типа, с которым сравнивают мутантный полипептид IL-2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В других вариантах осуществления изобретения полипептид IL-2 дикого типа, с которым сравнивают мутантный полипептид IL-2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

В контексте настоящего описания понятие «CD25» или « α -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 это понятие подпадает «полноразмерная» непротессированная форма 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. Аминокислотная последовательность человеческой CD25 представлена в UniProt, код доступа № P01589 (версия 185).

В контексте настоящего описания понятие «высокоаффинный рецептор IL-2» относится к гетеротримерной форме рецептора IL-2, состоящей из рецепторной γ -субъединицы (которая известна также как общая γ -субъединица цитокинового рецептора, γ_c , или CD132, см. UniProt, код доступа № P14784 (версия 192)), рецепторной β -субъединицы (известной также как CD122 или p70, см. UniProt, код доступа P31785 (версия 197)) и рецепторной α -субъединицы (известной также как CD25 или p55, см. UniProt, код доступа P01589 (версия 185)). В противоположность этому, понятие «рецептор IL-2 с промежуточной аффинностью» относится к рецептору IL-2, который включает только γ -субъединицу и β -субъединицу, но не содержит α -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 партнером по связыванию (например, лигандом). Если не указано иное, то в контексте настоящего описания понятие «аффинность связывания» относится к присущей компонентам связывающейся пары (например, антигенсвязывающим фрагментом и антителом или рецептором и его лигандом) 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. Конкретным методом измерения аффинности является поверхностный плазмонный резонанс (SPR).

Аффинность мутантного полипептида или полипептида дикого типа IL-2 к различным формам рецептора IL-2 можно определять с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR), изложенного в WO 2012/107417, используя стандартный инструментарий, такой как устройство BIAcore (фирма GE Healthcare) и рецепторных

субъединиц, таких как те, которые можно получать с помощью 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 известно, что они экспрессируют ту или иную указанную форму рецептора. Ниже описаны конкретные иллюстративные и приведенные в качестве примера варианты измерения аффинности связывания.

Под «регуляторной Т-клеткой» или «Treg-клеткой» подразумевается специализированный тип CD4⁺ Т-клетки, которая может подавлять ответы других Т-клеток. Treg-клетки отличаются способностью экспрессировать α -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 аутоотолерантности к антигенам, включая те антигены, которые экспрессируются опухолями. Для T_{reg}-клеток требуется IL-2 для их индукции и развития и индукции их супрессорных характеристик.

В контексте настоящего описания понятие «эффекторные клетки» относится к популяции лимфоцитов, которые опосредуют цитотоксические действия IL-2. Эффекторные клетки включают эффекторные Т-клетки, такие как цитотоксические CD8⁺ Т-клетки, NK-клетки, лимфокин-активированные клетки-киллеры (LAK), и макрофаги/моноциты.

В контексте настоящего описания понятие «PD1», «человеческий PD1», «PD-1» или «человеческий PD-1» (который обозначают также как белок запрограммированной смерти клеток 1 или белок программируемой клеточной смерти 1) относится к человеческому белку PD1 (SEQ ID NO: 27, белок без сигнальной последовательности)/ (SED ID NO: 28, белок с сигнальной последовательностью, см. также UniProt, код доступа № Q15116 (версия 156)). В контексте настоящего описания антитело «связывающееся с PD-1», «специфически связывающееся с PD-1», «которое связывается с PD-1» или «антитело к PD-1» относится к антителу, которое обладает способностью связываться с PD-1, в частности с полипептидом PD-1, который экспрессируется на клеточной поверхности, с аффинностью, достаточной для того, чтобы антитело можно было применять в качестве диагностического и/или терапевтического агента, таргетирующего PD-1. В одном из вариантов осуществления изобретения уровень связывания антитела к PD-1 с неродственным, т.е. не представляющим собой PD-1, белком составляет менее чем примерно 10% от уровня связывания антитела с PD-1, при измерении, например, с помощью радиоиммунного анализа (РИА) или проточной цитометрии (FACS), поверхностного плазмонного резонанса с использованием для анализа биосенсорной системы, такой как система Biacore®. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, которое связывается с PD-1, характеризуется величиной K_D, составляющей ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М). В одном из вариантов осуществления изобретения величину K_D, характеризующую аффинность связывания, определяют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса, используя в качестве антигена внеклеточный домен (ECD) человеческого PD-1 (PD-1-ECD, см. SEQ ID NO: 43).

Понятие «специфически связывается» означает, что связывание является избирательным в отношении антигена и его можно отличать от нежелательных или неспецифических взаимодействий. Способность антигенсвязывающей молекулы

связываться со специфическим антигеном (например, PD-1) можно определять с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или других методик, известных специалисту в данной области, например, с помощью методики на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (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 одном из вариантов осуществления изобретения уровень связывания антигенсвязывающей молекулы с неродственным белком составляет менее чем примерно 10% от уровня связывания антитела с антигеном, при измерении, например, с помощью SPR. Антитело, содержащееся в иммуноконъюгате, представленном в настоящем описании, специфически связывается с PD-1.

В контексте настоящего описания понятие «полипептид» относится к молекуле, которая состоит из мономеров (аминокислот), линейно сцепленных с помощью амидных связей (которые обозначают также как пептидные связи). Понятие «полипептид» относится к любой цепи из двух или большего количества аминокислот и не относится к конкретной длине продукта. Так, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, «белок», «аминокислотная цепь» и любое другое понятие, применяемое для обозначения цепи из двух или большего количества аминокислот, подпадает под понятие «полипептид», и понятие «полипептид» можно применять вместо или взаимозаменяемое с любым из указанных понятий. Предполагается также, что понятие «полипептид» относится к продуктам пост-экспрессионных модификаций полипептида, включая (но, не ограничиваясь только ими) гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитическое расщепление или модификацию с использованием не встречающихся в естественных условиях аминокислот. Полипептид может иметь происхождение из естественного биологического источника или его можно получать с помощью технологии рекомбинации, но он не обязательно транслируется с созданной нуклеотидной последовательности. Его можно создавать любым методом, включая химический синтез. Полипептиды могут иметь определенную трехмерную структуру, хотя не является обязательным наличие у них указанной структуры. Полипептиды с определенной трехмерной структурой рассматриваются как уложенные (имеющие укладку), а полипептиды, не имеющие определенной трехмерной структуры, но для которых в большей степени характерно большое количество различных конформаций, рассматриваются как не уложенные.

Под «выделенным» полипептидом или его вариантом, или производным подразумевается полипептид, который не находится в его естественной среде. Не требуется какая-либо конкретная степень очистки. Например, выделенный полипептид может быть отделен от его нативного или естественного окружения. Рекомбинантно полученные полипептиды и белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, рассматриваются в качестве выделенных для целей изобретения, поскольку 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, Clustal W, Megalign (DNASTAR) или пакет программ FASTA. 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 программы ggsearch из пакета программ FASTA, версия 36.3.8с или более поздняя версия, с использованием матрицы для сравнения BLOSUM50. Пакет программ FASTA был разработан W.R. Pearson и D.J. Lipman, "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85, 1988, сс. 2444-2448; W.R. Pearson "Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol. 266, 1996, сс. 227-258; и Pearson и др. Genomics 46, 1997, сс. 24-36, и публично доступен на сайте http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml. Альтернативно этому, для сравнения последовательностей можно использовать публичный сервер, доступный на сайте http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi, с использованием программы ggsearch (global protein:protein) и задаваемых по умолчанию опций (BLOSUM50; open: -10; ext: -2; Ktup = 2) для обеспечения осуществления глобального, а не локального выравнивания. Процент идентичности аминокислот выдается в виде заголовка в качестве выходного результата выравнивания.

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 нетрадиционную 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» молекулой нуклеиновой кислоты или полинуклеотидом подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, т.е. ДНК или РНК, которая отделена от ее нативного окружения. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий входящий в вектор 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 полинуклеотидную молекулу, входящую в клетки, которые в норме содержат полинуклеотидную молекулу, но полинуклеотидная молекула 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.

Понятие «выделенный полинуклеотид (или нуклеиновая кислота), кодирующий [например, иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении]» относится к одной или нескольким полинуклеотидным молекулам, которые кодируют тяжелые и легкие цепи антитела и/или полипептиды IL-2 (или их фрагменты), включая такую(ие) полинуклеотидную(ые) молекулу(ы) в одном и том же векторе или в различных векторах, и такая(ие) нуклеотидная(ые) молекула(ы) присутствует(ют) в одном или нескольких локализациях в клетке-хозяине.

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 содержит полинуклеотидные последовательности, которые кодируют иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, или их фрагменты.

Понятие «вектор» или «экспрессионный вектор» относится к молекуле ДНК, которую применяют для интродукции и обеспечения экспрессии конкретного гена, с которой он функционально связан в клетке. 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 стабильной мРНК в больших количествах. 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 иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, или их фрагменты.

В контексте настоящего описания понятия «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые интродуцирована экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство указанных клеток. К клеткам-хозяевам относятся «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первичные трансформированные клетки, а также потомство, выведенное 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.

Клетка-хозяин представляет собой любой тип клеточной системы, которую можно применять для создания иммуноконъюгатов, предлагаемых в настоящем изобретении. Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, такие как (но, не ограничиваясь только ими) НЕК-клетки, СНО-клетки, ВНК-клетки, NS0-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы линии YO, клетки мышинной

миеломы линии Р3Х63, PER-клетки, PER.C6-клетки или клетки гибридомы, клетки дрожжей, клетки насекомых и клетки растений, но также клетки, находящиеся в трансгенном животном, трансгенном растении или в культивируемой растительной или животной ткани.

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

Понятие «моноклональное антитело» в контексте настоящего описания относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, входящие в популяцию, идентичны и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов антител, например,
15 содержащих мутации, встречающиеся в естественных условиях или возникающие в процессе производства препарата моноклонального антитела, указанные варианты, как правило, присутствуют в минорных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела к различным детерминантам (эпитопам), каждое моноклональное антитело из препарата
20 моноклонального антитела направлено против одной детерминанты на антигене. Таким образом, прилагательное «моноклональный» относится к характеристике антитела, указывающей на получение из практически гомогенной популяции антител, и его не следует рассматривать как требование, ограничивающее получение антитела с помощью какого-либо конкретного метода. Например, моноклональные антитела,
25 предназначенные для применения согласно настоящему изобретению, можно получать различными методиками, включая (но, не ограничиваясь только ими) метод гибридом, методы рекомбинантной ДНК, методы фагового дисплея и методы, включающие применение трансгенных животных, содержащих весь локус человеческого иммуноглобулина или его часть, указанные методы и другие приведенные в качестве
30 примера методы создания моноклональных антител представлены в настоящем описании.

«Выделенное» антитело представляет собой антитело, отделенное от компонента его естественного окружения, т.е. которое не находится в естественной для него среде. Не требуется какая-либо конкретная степень очистки. Например, выделенное антитело
35 может быть отделено от его нативного или естественного окружения. Рекомбинантно полученные антитела, экспрессируемые в клетках-хозяевах, рассматриваются в качестве выделенных для целей изобретения, поскольку представляют собой нативные или рекомбинантные антитела, которые отделены, фракционированы или частично или полностью очищены с помощью любого приемлемого метода. Так, иммуноконъюгаты,
40 предлагаемые в настоящем изобретении, являются выделенными. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело очищают до чистоты, превышающей 95% или 99% по данным, например, электрофоретических анализов (таких, например, как ДСН-ПААГ, изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ), капиллярный электрофорез) или хроматографических анализов (таких, например, как ионообменная хроматография или ЖХВР с обращенной фазой). Обзор методов оценки чистоты см., например, у
45 Flatman S. и др., J. Chrom. B 848, 2007, сс. 79-87.

Понятия «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «цельное антитело» в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо для обозначения

антитела, имеющего структуру, практически сходную со структурой нативного антитела.

Понятие «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, обладающую способностью связываться с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примерами фрагментов антител являются (но, не ограничиваясь только ими) Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, димерные антитела (диабоды), линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител (например, scFv); и однодоменные антитела. 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')₂-фрагментов, содержащих остатки эпитопа, связывающегося с рецептором спасения, и обладающих удлинённым временем полужизни *in vivo*, см. в US №5869046. Димерные антитела 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 и тетрамерные антитела описаны также у Hudson и др., Nat Med 9, 2003, сс. 129-134. Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь переменный домен тяжелой цепи или его часть или весь переменный домен легкой цепи антитела или его часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело (фирма Domantis, Inc., Валтам, шт. Массачусетс; см., например, US №6248516 B1). 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, который имеет структуру встречающегося в естественных условиях антитела. Например, иммуноглобулины IgG-класса представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, связанных дисульфидными мостиками. Начиная с N-конца к C-концу, каждая тяжелая цепь имеет переменную область (VH), которую называют также переменным тяжелым доменом или переменным доменом тяжелой цепи, за которой следует три константных домена (CH1, CH2 и CH3), которые называют также константной областью тяжелой цепи. Аналогично этому, начиная с N-конца к C-концу, каждая легкая цепь имеет переменную область (VL), которую называют также переменным легким доменом или переменным доменом легкой цепи, за которой следует константный домен легкой цепи (CL), который называют также константной областью легкой цепи. Тяжелая цепь антитела может относиться к одному из пяти типов, которые обозначают как α (IgA), δ (IgD), ε (IgE), γ (IgG) или μ (IgM), некоторые из которых можно дополнительно подразделять на подтипы, например, γ1 (IgG1), γ2 (IgG2), γ3 (IgG3), γ4 (IgG4), α1 (IgA1) и α2 (IgA2). Легкая цепь антитела может принадлежать к одному из двух типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), в зависимости от аминокислотной последовательности ее константного домена. Иммуноглобулин практически состоит из двух Fab-молекул 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 вариабельных доменов антитела (которые называют также вариабельными областями). Предпочтительно антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи (VL) антитела и вариабельную область

тяжелой цепи антитела (VH).
 Понятие «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные 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 гипервариабельных 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. В контексте настоящего описания касательно последовательностей вариабельных областей «нумерация по Кэботу» относится к системе нумерации, описанной у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

В контексте настоящего описания аминокислотные положения всех константных областей и доменов тяжелой и легкой цепей нумеруют согласно системе нумерации по Кэботу, которая описана у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 и которую обозначают в контексте настоящего описания как «нумерация по Кэботу». В частности, систему нумерации по Кэботу (см. сс. 647-660), описанную у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, применяют для константного домена CL легкой цепи каппа- и лямбда-изотипа, а систему нумерации согласно EU-индексу Кэбота (см. сс. 661-723) применяют для константных доменов тяжелой цепи (CH1, шарнир, CH2 и CH3, что в этом случае в контексте настоящего описания дополнительно разъяснено ссылкой на «нумерацию согласно EU-индексу Кэбота»).

Понятие «гипервариабельный участок» или «HVR» в контексте настоящего описания относится к каждому из участков вариабельного домена антитела, фрагменты аминокислотных остатков которых являются гипервариабельными по их последовательности («определяющие комплементарность участки» или «CDR») и/или формируют петли определенной структуры («гипервариабельные петли»), и/или содержат контактирующие с антигеном остатки («контакты с антигеном»). Как правило, антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3).

HVR включают:

(а) гипервариабельные петли, включающие аминокислотные остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia C. и Lesk A.M., *J. Mol. Biol.* 196, 1987, сс. 901-917);

(б) CDR, включающие аминокислотные остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat E.A. и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, публикация NIH 91-3242);

(в) области контакта с антигеном, включающие аминокислотные остатки 27 с-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum и др., *J. Mol. Biol.* 262, 1996, сс. 732-745); и

(г) комбинации остатков, указанных в подпунктах (а), (б) и/или (в), включающие

аминокислотные остатки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) и 94-102 (H3).

Если не указано иное, то HVR-остатки и другие остатки в вариабельном домене (например, FR-остатки) нумеруют в настоящем описании согласно Kabat и др., выше.

«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 «гуманизированное» антитело относится к химерному антителу, которое содержит аминокислотные остатки из нечеловеческих HVR и аминокислотные остатки из человеческих FR. В некоторых вариантах осуществления изобретения

гуманизированное антитело может содержать практически все из по меньшей мере одного и, как правило, двух вариабельных доменов, в которых все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют участкам нечеловеческого антитела, а все или практически все FR соответствуют участкам человеческого антитела. Указанные вариабельные домены обозначают как «гуманизированная вариабельная область».

Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящей из человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения некоторые FR-остатки в гуманизированном антителе заменены соответствующими остатками из нечеловеческого (например, антитела, из которого получены HVR-остатки), например, для сохранения или повышения специфичности или аффинности антитела. Понятие «гуманизированная форма» антитела, например, нечеловеческого антитела, относится к антителу, которое подвергали гуманизации. Другие формы «гуманизированных антител», подпадающие под объем настоящего изобретения, представляют собой антитела, в которых константная область дополнительно модифицирована или изменена по сравнению с исходным антителом для создания свойств, которые требуются согласно изобретению, в частности касательно связывания C1q и/или связывания с Fc-рецептора (FcR).

«Человеческое антитело» представляет собой антитело, которое имеет аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемого в организме человека или человеческой клеткой, или полученного из нечеловеческого источника, который использует спектры человеческих антител, или другим кодирующим человеческое антитело последовательностям. Из указанного определения человеческого антитела специально исключено гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки. В некоторых вариантах осуществления изобретения человеческое антитело получают из трансгенного млекопитающего кроме человека, например, мыши, крысы или кролика. В некоторых вариантах осуществления изобретения человеческое антитело получено из линии клеток гибридомы. Антитела или фрагменты антител, выделенные из библиотек человеческих антител, в настоящем описании также рассматриваются как человеческие антитела или фрагменты человеческих антител.

Понятие «класс» антитела относится к типу константного домена или константной области, входящего/входящей в тяжелую цепь. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них можно дополнительно подразделять на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелых цепей, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, обозначают как α , δ , ϵ , γ и μ соответственно.

В контексте настоящего описания понятие «Fc-домен» или «Fc-область» применяют для определения С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Под понятие подпадают имеющие нативную последовательность Fc-области и варианты Fc-областей. Хотя пограничные последовательности Fc-области тяжелой цепи IgG могут слегка варьироваться, как правило, считается, что Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако антитела, продуцируемые клеткой-хозяином, могут подвергаться пост-трансляционному отщеплению одной или нескольких, в частности одной или двух, аминокислот из С-конца тяжелой цепи. Поэтому антитело, продуцируемое клеткой-хозяином в результате экспрессии специфической молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует полноразмерную тяжелую цепь, может включать полноразмерную тяжелую цепь или может включать расщепленный вариант полноразмерной тяжелой цепи (который обозначают также как «расщепленный вариант тяжелой цепи»). Это может приводить к ситуации, когда последние две С-концевые аминокислоты тяжелой цепи представляют собой глицин (G446) и лизин (K447, нумерация согласно EU-индексу Кэбота). Таким образом, С-концевой лизин (Lys447) или С-концевые глицин (Gly446) и лизин (K447) Fc-области могут присутствовать или отсутствовать. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей, включающих Fc-домены (или субъединицу Fc-домена, указанную в настоящем описании), если не указано иное, в контексте настоящего описания рассматривают без С-концевого дипептида глицин-лизин. В одном из вариантов осуществления изобретения тяжелая цепь, которая включает субъединицу Fc-домена, указанную в настоящем описании, которая содержится в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, содержит дополнительно С-концевой дипептид глицин-лизин (G446 и K447, нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В одном из вариантов осуществления изобретения тяжелая цепь, которая включает субъединицу Fc-домена, указанную в настоящем описании, которая содержится в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, содержит дополнительно С-концевой остаток глицина (G446, нумерация согласно EU-индексу Кэбота). Композиции, предлагаемые в изобретении, такие как фармацевтические композиции, указанные в настоящем описании, содержат популяцию иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении. Популяция иммуноконъюгатов может содержать молекулы, имеющие полноразмерную тяжелую цепь, и молекулы, имеющие расщепленный вариант тяжелой цепи. Популяция иммуноконъюгатов может состоять из смеси молекул, имеющих полноразмерную тяжелую цепь, и молекул, имеющих расщепленный вариант тяжелой цепи, в которой по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% иммуноконъюгатов имеют расщепленный вариант тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления изобретения композиция, которая состоит из популяции иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, содержит иммуноконъюгат, который содержит тяжелую цепь, включающую субъединицу Fc-домена, указанную в настоящем описании, с дополнительным С-концевым дипептидом глицин-лизин (G446 и K447, нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В одном из вариантов осуществления изобретения композиция, которая состоит из популяции иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, содержит иммуноконъюгат, который содержит тяжелую цепь, включающую субъединицу Fc-домена, указанную в настоящем описании, с дополнительным С-концевым остатком глицина (G446, нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная композиция содержит популяцию иммуноконъюгатов, состоящую из молекул, которые содержат

тяжелую цепь, включающую субъединицу Fc-домена, указанную в настоящем описании; молекул, которые содержат тяжелую цепь, включающую субъединицу Fc-домена с дополнительным С-концевым остатком глицина (G446, нумерация согласно EU-индексу Кэбота); и молекул, которые содержат тяжелую цепь, включающую субъединицу Fc-домена с дополнительным С-концевым дипептидом глицин-лизин (G446 и K447, нумерация согласно EU-индексу Кэбота). Если в настоящем описании специально не указано иное, то нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константном участке соответствует системе EU-нумерации, которую называют также EU-индексом, описанной у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 (см. выше). В контексте настоящего описания понятие «субъединица» Fc-домена относится к одному из двух полипептидов, образующих димерный Fc-домен, т.е. полипептиду, который содержит С-концевые константные области тяжелой цепи иммуноглобулина, обладающему способностью к стабильной самоассоциации. Например, субъединица Fc-домена IgG содержит константные домены CH2 IgG и CH3 IgG.

«Модификация, способствующая ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена» означает манипуляцию с пептидным каркасом или посттрансляционные модификации субъединицы Fc-домена, которая снижает или препятствует ассоциации полипептида, содержащего субъединицу Fc-домена, с идентичным полипептидом с образованием гомодимера. В контексте настоящего описания модификация, способствующая ассоциации, в частности включает отдельные модификации, затрагивающие каждую из двух субъединиц Fc-домена, требуемых для ассоциации (т.е. и первую и вторую субъединицы Fc-домена), при этом модификации дополняют друг друга так, чтобы способствовать ассоциации двух субъединиц Fc-домена. Например, модификация, способствующая ассоциации, может изменять структуру или заряд одной или обеих субъединиц Fc-домена, так, чтобы сделать ассоциацию стерически или электростатически выгодной соответственно. Таким образом, (гетеро)димеризация имеет место между полипептидом, который содержит первую субъединицу Fc-домена, и полипептидом, который содержит вторую субъединицу Fc-домена, которые могут быть неидентичными в том плане, что дополнительные компоненты, слитые с каждой из субъединиц (например, антигенсвязывающие фрагменты), не являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, способствующая ассоциации, включает аминокислотную мутацию в Fc-домене, в частности, аминокислотную замену. В конкретном варианте осуществления изобретения модификация, способствующая ассоциации, включает отдельную аминокислотную мутацию, в частности, аминокислотную замену, в каждой из двух субъединиц Fc-домена.

В контексте настоящего описания понятие «эффекторные функции» 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, антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC), антитело-обусловленный клеточнозависимый фагоцитоз (ADCP), секреция цитокинов, опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора) и активация В-клеток.

Антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC) представляет собой иммунный механизм, приводящий в лизису сенсibilизированных антителом

являющихся мишенями ADCC клеток с помощью иммунных эффекторных клеток.

Клетки-мишени представляют собой клетки, с которыми антитела или их производные, содержащие Fc-область, специфически связываются, как правило, через белковую часть, которая является N-концевой относительно Fc-области. В контексте настоящего

описания понятие «пониженная ADCC» относится или к снижению количества клеток-мишеней, подвергнутых лизису в данное время, при данной концентрации антитела в среде, окружающей клетки-мишени, с помощью описанного выше механизма ADCC, и/или к повышению концентрации антитела в среде, окружающей клетки-мишени, требуемой для достижения лизиса данного количества клеток-мишеней в данное время с помощью механизма ADCC. Снижение ADCC определяют относительно ADCC, опосредуемой тем же самым антителом, которое продуцируется тем же самым типом клеток-хозяев, с использованием тех же самым стандартных методов получения, очистки, приготовления форм и хранения (которые известны специалистам в данной области), но не сконструированным антителом. Например, снижение ADCC, опосредуемое антителом, содержащим в его Fc-домене аминокислотную замену, которая снижает ADCC, определяют относительно ADCC, опосредуемой тем же самым антителом без аминокислотной замены в Fc-домене. Приемлемые анализы измерения ADCC хорошо известны в данной области (см., например, публикацию PCT WO 2006/082515 или публикацию PCT WO 2012/130831).

«Активирующий Fc-рецептор» представляет собой Fc-рецептор, который после взаимодействия с Fc-областью антитела осуществляет процесс передачи сигналов, которые стимулируют осуществление несущей рецептор клеткой эффекторных функций. Человеческие активирующие Fc-рецепторы включают FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) и FcαRI (CD89).

В контексте настоящего описания предполагается, что понятия «создание, конструирование, инженерия» включают любую манипуляцию с пептидным каркасом или пост-трансляционные модификации встречающего в естественных условиях или рекомбинантного полипептида или его фрагмента. Инженерия включает модификации аминокислотной последовательности, схемы гликозилирования или группы боковой цепи индивидуальных аминокислот, а также комбинации указанных подходов.

Понятие «пониженное связывание», например, пониженное связывание с Fc-рецептором или CD25, относится к снижению аффинности соответствующего взаимодействия, по данным, полученным, например, с помощью SPR. С целью дополнительного пояснения, понятие включает также снижения аффинности до нуля (или ниже предела определения аналитического метода), т.е. полное элиминирование взаимодействия. И, наоборот, «повышенное связывание» относится к повышению аффинности связывания соответствующего взаимодействия.

В контексте настоящего описания понятие «иммуноконъюгат» относится к полипептидной молекуле, которая включает по меньшей мере одну молекулу IL-2 и по меньшей мере одно антитело. Молекула IL-2 может быть сцеплена с антителом путем различных взаимодействий и в различных конфигурациях, которые указаны в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления изобретения молекула IL-2 слита с антителом через пептидный линкер. Конкретные иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, практически состоят из одной молекулы IL-2 и антитела, которые сцеплены с помощью одной или нескольких линкерных последовательностей.

Под «слитым» подразумевается, что компоненты (например, антитело и молекула IL-2) соединены с помощью пептидных связей, либо непосредственно, либо через один или несколько пептидных линкеров.

В контексте настоящего описания понятия «первая» и «вторая» касательно субъединиц Fc-домена и т.д. применяют для удобства отличия их друг от друга, когда присутствует более одного каждого типа фрагмента. Не предусматривается, что применение указанных понятий относится к конкретному порядку или ориентации в иммуноконъюгате, 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 обезьяны), 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, либо 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 иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, применяют для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания.

40 Подробное описание вариантов осуществления изобретения

Мутантный полипептид IL-2

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат мутантный полипептид IL-2, обладающий улучшенными свойствами для иммунотерапии. В частности, у мутантного полипептида IL-2 элиминированы фармакологические свойства IL-2, которые участвуют в проявлении его токсичности, но не имеют решающего значения для эффективности IL-2. Указанные мутантные полипептиды IL-2 описаны подробно в WO 2012/107417, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Как указано выше, различные формы рецептора IL-2 состоят из

различных субъединиц и характеризуются различной аффинностью к IL-2. Рецептор IL-2 с промежуточной аффинностью, состоящий из β - и γ -субъединиц рецептора, экспрессируется на покоевых эффекторных клетках и его присутствия достаточно для обеспечения передачи сигналов IL-2. Высокоаффинный рецептор IL-2, который дополнительно содержит α -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 смерть клеток (AICD) соответственно. Таким образом, не ограничиваясь какой-либо теорией, можно предположить, что снижение или аннулирование аффинности IL-2 к α -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 должно поддерживать индукцию пролиферации и активацию эффекторных клеток типа НК и Т-клеток с помощью IL-2.

Мутантный полипептид интерлейкина-2 (IL-2), который содержится в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, содержит по меньшей мере одну аминокислотную мутацию, которая аннулирует или снижает аффинность мутантного полипептида IL-2 к α -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 (нумерация относительно последовательности человеческого IL-2 SEQ ID NO: 19). Примеры аминокислотных замен включают 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, которые можно применять в иммуноконъюгатах, предлагаемых в изобретении, содержат аминокислотную мутацию в аминокислотном положении, соответствующем остатку 42, 45 или 72 человеческого IL-2, или их комбинацию. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену, выбранную из группы 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 F42A, Y45A и L72G. Эти мутанты характеризуются практически одинаковой аффинностью к рецептору IL-2 с промежуточной аффинностью и обладают пониженной в значительной степени аффинностью к α -субъединице рецептора IL-2 и высокоаффинному рецептору IL-2 по сравнению с формой дикого типа мутанта IL-2.

Другие характеристики перспективных мутантов могут 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)- γ в качестве вторичного цитокина НК-клетками, пониженную способность индуцировать выработку вторичных цитокинов, в частности IL-10 и TNF- α , мононуклеарными клетками периферической крови (РВМС), пониженную способность активировать регуляторные Т-клетки, пониженную способность индуцировать апоптоз

Т-клеток и пониженный профиль токсичности *in vivo*.

Конкретные мутантные полипептиды IL-2, которые можно применять согласно изобретению, содержат три аминокислотные мутации, которые аннулируют или снижают аффинность мутантного полипептида IL-2 к α -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 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 (нумерация относительно последовательности человеческого IL-2 SEQ ID NO: 19).

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная аминокислотная мутация снижает аффинность мутантного полипептида IL-2 к α -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 несколько аминокислотных мутаций, которые снижают аффинность мутантного полипептида IL-2 к α -субъединице рецептора IL-2, комбинация указанных аминокислотных мутаций может снижать аффинность мутантного полипептида IL-2 к α -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 α -субъединице рецептора IL-2, в результате чего никакое связывание не удастся обнаружить с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса.

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.

Снижение аффинности IL-2 к α -субъединице рецептора IL-2 в сочетании с элиминацией О-гликозилирования IL-2 позволяет получать белок IL-2 с улучшенными свойствами. Например, элиминация сайта О-гликозилирования позволяет получать более гомогенный продукт при экспрессии мутантного полипептида IL-2 в клетках млекопитающих, таких как СНО- или НЕК-клетки.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 содержит дополнительную аминокислотную мутацию, которая элиминирует сайт О-гликозилирования IL-2 в положении, соответствующем остатку 3 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная дополнительная аминокислотная мутация, которая элиминирует сайт О-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: 19 по меньшей мере с одной аминокислотной мутацией, которая аннулирует или снижает аффинность мутантного полипептида IL-2 к α -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: 19 без указанной мутации. В другом варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 содержит последовательность SEQ ID NO: 29 по меньшей мере с одной аминокислотной мутацией, которая аннулирует или снижает аффинность мутантного полипептида IL-2 к α -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: 29 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 цитокина активированной Т-клеткой или NK-клеткой 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 кровотоке по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа.

В частности, мутантный полипептид IL-2, который можно применять согласно изобретению, 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 WO 2012/107417, 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_{reg} -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- γ 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 WO 2012/107417. 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, которые можно применять согласно изобретению, 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 US №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. US №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 US №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 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 очевидны пути определения дополнительных мутаций, которые 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, US 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 содержит не более чем 12, не более чем 11, не более чем 10, не более чем 9, не более чем 8, не более чем 7, не более чем 6 или не более чем 5 аминокислотных мутаций по сравнению с соответствующей последовательностью IL-2 дикого типа, например, последовательностью SEQ ID NO: 19 человеческого IL-2. В конкретном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 содержит не более чем 5 аминокислотных мутаций по сравнению с соответствующей последовательностью IL-2 дикого типа, например, последовательностью SEQ ID NO: 19 человеческого IL-2.

В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 содержит последовательность SEQ ID NO: 20. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 20.

Иммуноконъюгаты

Иммуноконъюгаты, указанные в настоящем описании, содержат молекулу IL и антитело. Указанные иммуноконъюгаты значительно повышают эффективность терапии на основе IL-2 в результате непосредственного таргетинга IL-2, например, в микроокружение опухоли. Согласно изобретению антитело, содержащееся в

5 иммуноконъюгате, может представлять собой цельное антитело или иммуноглобулин или его фрагмент или вариант, который обладает биологической функцией, такой как аффинность антигенспецифического связывания.

В целом, преимущества иммуноконъюгата являются очевидными. Например, антитело, содержащееся в иммуноконъюгате, распознает опухольспецифический эпитоп

10 и обеспечивает таргетинг молекулы иммуноконъюгата к месту опухоли. В результате высокие концентрации IL-2 могут доставляться в микроокружение опухоли, что приводит к активации и пролиферации различных упомянутых в настоящем описании иммунных эффекторных клеток с использованием существенно более низкой дозы иммуноконъюгата по сравнению с дозой, требуемой для неконъюгированного IL-2.

15 Кроме того, поскольку применение IL-2 в форме иммуноконъюгата снижает дозы самого цитокина, то потенциальная возможность проявления нежелательных побочных действий IL-2 ограничивается, и таргетинг IL-2 к конкретной области организма с помощью иммуноконъюгата может приводить также к снижению системной экспозиции и, как следствие, к снижению побочных действий, которые имеют место при применении

20 неконъюгированного IL-2. Кроме того, увеличенное время полужизни в кровотоке иммуноконъюгата по сравнению с неконъюгированным IL-2 вносит вклад в эффективность иммуноконъюгата. Однако эта характерная особенность иммуноконъюгатов IL-2 может вновь усугублять потенциальные побочные действия молекулы IL-2: поскольку из-за в значительной степени повышенного времени

25 полужизни иммуноконъюгата IL-2 в кровотоке по сравнению с неконъюгированным IL-2, вероятность того, что IL-2 или другие составляющие молекулы слитого белка могут активировать компоненты, обычно присутствующие в сосудистой сети, повышается. Эти же соображения применимы и к другим слитым белкам, которые содержат IL-2, слитый с другим фрагментом, таким как Fc или альбумин, что приводит

30 к удлинению времени полужизни IL-2 в кровотоке. В связи с этим, иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид IL-2, представленный в настоящем описании и описанный в WO 2012/107417, с пониженной токсичностью по сравнению с формами IL-2 дикого типа, является наиболее предпочтительным.

Как указано выше, таргетинг IL-2 непосредственно к иммунным эффекторным

35 клеткам, а не к опухолевым клеткам может обладать преимуществом для иммунотерапии с использованием IL-2.

Таким образом, в изобретении предложены мутантный полипептид IL-2, указанный выше, и антитело, которое связывается с PD-1. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 и антитело образуют слитый белок, т.е.

40 мутантный полипептид IL-2 объединен пептидной связью с антителом. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц. В конкретном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 слит на его аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой одной из субъединиц Fc-домена, необязательно через

45 линкерный пептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой молекулу иммуноглобулина, в частности молекулу иммуноглобулина IgG-класса, более предпочтительно молекулу

иммуноглобулина IgG₁-подкласса. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 объединен аминоконцевой пептидной связью с одной из тяжелых цепей иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой молекулу Fab или молекулу scFv. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой молекулу Fab. В другом варианте осуществления изобретения антитело представляет собой молекулу scFv. Иммуноконъюгат может содержать также более одного антитела. Если иммуноконъюгат содержит более одного антитела, например, первое и второе антитело, то каждое антитело можно независимо друг от друга выбирать из различных форм антител и фрагментов антител. Например, первое антитело может представлять собой молекулу Fab, а второе антитело может представлять собой молекулу scFv. В конкретном варианте осуществления изобретения каждое из указанного первого и указанного второго антитела представляет собой молекулу scFv или каждое из указанного первого и указанного второго антитела представляет собой молекулу Fab. В конкретном варианте осуществления изобретения каждое из указанного первого и указанного второго антитела представляет собой молекулу Fab. В одном из вариантов осуществления изобретения каждое из указанного первого и указанного второго антитела связывается с PD-1.

Форматы иммуноконъюгатов

Примеры форматов иммуноконъюгатов описаны в публикации РСТ WO 2011/020783, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Такие иммуноконъюгаты содержат по меньшей мере два антитела. Таким образом, согласно одному из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит мутантный полипептид IL-2, представленный в настоящем описании, и по меньшей мере первое и второе антитело. В конкретном варианте осуществления изобретения указанные первое и второе антитела независимо выбраны из группы, включающей молекулу Fv, в частности, молекулу scFv, и молекулу Fab. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный мутантный полипептид IL-2 объединен амино- или карбоксиконцевой пептидной связью с указанным первым антителом, а второе антитело объединено амино- или карбоксиконцевой пептидной связью либо I) с мутантным полипептидом IL-2, либо II) с первым антителом. В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат практически состоит из мутантного полипептида IL-2 и первого и второго антитела, в частности молекул Fab, соединенных друг с другом с помощью одной или нескольких линкерных последовательностей. Указанные форматы имеют преимущество, заключающееся в том, что они связываются с высокой аффинностью с антигеном-мишенью (PD-1), но характеризуются лишь мономерным связыванием с рецептором IL-2, что позволяет избегать таргетинга иммуноконъюгата к несущим рецептор IL-2 иммунным клеткам, расположенным в областях, отличных от сайта-мишени. В конкретном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 соединен карбоксиконцевой пептидной связью с первым антителом, в частности, первой молекулой Fab, и дополнительно соединена аминоконцевой пептидной связью со вторым антителом, в частности второй молекулой Fab. В другом варианте осуществления изобретения первое антитело, в частности первая молекула Fab, соединена карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2, и дополнительно соединена аминоконцевой пептидной связью со вторым антителом, в частности второй молекулой Fab. В другом варианте осуществления изобретения первое антитело, в частности первая молекула

Fab, соединена аминоконцевой пептидной связью с первым мутантным полипептидом IL-2 и дополнительно соединена карбоксиконцевой пептидной связью со вторым антителом, в частности второй молекулой Fab. В конкретном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 соединен карбоксиконцевой пептидной связью с 5 с вариабельной областью первой тяжелой цепи и дополнительно соединен аминоконцевой пептидной связью с вариабельной областью второй тяжелой цепи. В другом варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 соединен карбоксиконцевой пептидной связью с вариабельной областью первой легкой цепи и дополнительно соединен аминоконцевой пептидной связью с вариабельной областью 10 второй легкой цепи. В другом варианте осуществления изобретения вариабельная область первой тяжелой или легкой цепи соединена карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2 и дополнительно соединена аминоконцевой пептидной связью с вариабельной областью второй тяжелой или легкой цепи. В другом варианте осуществления изобретения вариабельная область первой тяжелой или легкой цепи 15 соединена аминоконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2 и дополнительно соединена карбоксиконцевой пептидной связью с вариабельной областью второй тяжелой или легкой цепи. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 соединен карбоксиконцевой пептидной связью с тяжелой или легкой цепью первого Fab и дополнительно соединен аминоконцевой пептидной 20 связью с тяжелой или легкой цепью второго Fab. В другом варианте осуществления изобретения тяжелая или легкая цепь первого Fab соединена карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2 и дополнительно соединена аминоконцевой пептидной связью с тяжелой или легкой цепью второго Fab. В другом варианте осуществления изобретения тяжелая или легкая цепь первого Fab соединена 25 аминоконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом IL-2 и дополнительно соединена карбоксиконцевой пептидной связью с тяжелой или легкой цепью второго Fab. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит мутантный полипептид IL-2, который соединен аминоконцевой пептидной связью с одной или несколькими молекулами scFv и дополнительно соединен карбоксиконцевой 30 пептидной связью с одной или несколькими молекулами scFv.

Однако, наиболее приемлемые форматы иммуноконъюгатов, предлагаемых в настоящем изобретении, содержат молекулу иммуноглобулина в качестве антитела. Указанные форматы иммуноконъюгатов описаны в WO 2012/146628, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Таким образом, в конкретных вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит мутантный полипептид IL-2, представленный в настоящем описании, и молекулу иммуноглобулина, которая связывается с PD-1, в частности молекулу IgG, более предпочтительно молекулу IgG₁. В одном из вариантов 35 осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит не более одного мутантного полипептида IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения молекула иммуноглобулина представляет собой молекулу человеческого иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления изобретения молекула иммуноглобулина содержит человеческую константную область, например, человеческий домен CH1, CH2, CH3 и/или CL. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноглобулин содержит 40 человеческий Fc-домен, в частности Fc-домен человеческого IgG₁. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 объединен amino- или карбоксиконцевой пептидной связью с молекулой иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат практически состоит из 45

мутантного полипептида IL-2 и молекулы иммуноглобулина, в частности, молекулы IgG, более предпочтительно молекулы IgG₁, которые соединены с помощью одной или нескольких линкерных последовательностей. В конкретном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 слит на его аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, необязательно через линкерный пептид.

Мутантный полипептид IL-2 может быть слит с антителом непосредственно или через линкерный пептид, содержащий одну или несколько аминокислот, как правило, примерно 2-20 аминокислот. Линкерные пептиды известны в данной области и указаны в настоящем описании. Приемлемыми неиммуногенными линкерными пептидами являются, например, (G₄S)_n, (SG₄)_n, (G₄S)_n или G₄(SG₄)_n, в которых «n», как правило, обозначает целое число от 1 до 10, как правило, от 2 до 4. В одном из вариантов осуществления изобретения линкерный пептид состоит по меньшей мере из 5 аминокислот, в одном из вариантов осуществления изобретения из 5-100, в следующем варианте осуществления изобретения из 10-50 аминокислот. В конкретном варианте осуществления изобретения линкерный пептид состоит из 15 аминокислот. В одном варианте осуществления изобретения линкерный пептид представляет собой (GxS)_n или (GxS)_nG_m, в котором G обозначает глицин, S обозначает серин и (x=3, n=3, 4, 5 или 6 и m=0, 1, 2 или 3) или (x=4, n=2, 3, 4 или 5 и m=0, 1, 2 или 3), в одном варианте осуществления изобретения x=4 и n=2 или 3, в другом варианте осуществления изобретения x=4 и n=3. В конкретном варианте осуществления изобретения линкерный пептид представляет собой (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 21). В одном варианте осуществления изобретения линкерный пептид имеет (или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит молекулу IL-2 и молекулу иммуноглобулина, в частности молекулу иммуноглобулина IgG₁-подкласса, которая связывается с PD-1, в котором мутантная молекула IL-2 слита на аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина через линкерный пептид, имеющий SEQ ID NO: 21.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит молекулу IL-2 и антитело, которое связывается PD-1, в котором антитело содержит Fc-домен, в частности Fc-домен человеческого IgG₁, состоящий из первой и второй субъединиц, и мутантная молекула IL-2 слита на ее аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой одной из субъединиц Fc-домена через линкерный пептид, имеющий SEQ ID NO: 21.

Антитела к PD-1

Антитело, содержащееся в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, связывается с PD-1, в частности с человеческим PD-1, и обладает способностью направлять мутантный полипептид IL-2 к сайту-мишени, в котором экспрессируется PD-1, в частности к Т-клетке, которая экспрессирует PD-1, например, к ассоциированной с опухолью Т-клетке.

Приемлемые антитела к PD-1, которые можно применять в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, описаны в заявке на патент PCT PCT/EP 2016/073248, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, может содержать два или большее количество антител, которые могут связываться с одним и тем же или разными антигенами. Однако в конкретных вариантах осуществления изобретения каждое из

указанных антител связывается с PD-1. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, содержащееся в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, является моноспецифическим. В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит одно моноспецифическое антитело, в частности

5 моноспецифическую молекулу иммуноглобулина.

Антитело может представлять собой антитело любого типа или его фрагмент, который сохраняет способность специфически связываться с PD-1, в частности человеческим PD-1. Фрагменты антител включают (но, не ограничиваясь только ими) Fv-молекулы, scFv-молекулы, Fab-молекулы и F(ab')₂-молекулы. Однако в конкретных

10 вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой иммуноглобулин, в частности иммуноглобулин IgG-класса, более конкретно IgG₁-подкласса.

15 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит HVR-H1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HVR-H2, который

20 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HVR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, FR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 в положениях 71-73 согласно нумерации Кэбота, HVR-L1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HVR-L2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и HVR-L3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID

25 NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую HVR-H1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HVR-H2, который содержит

30 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HVR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, FR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 в положениях 71-73 согласно нумерации Кэбота, HVR-L1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HVR-L2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и HVR-L3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID

35 NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения вариабельная область тяжелой и/или легкой цепи представляет собой гуманизованную вариабельную область. В некоторых вариантах осуществления изобретения вариабельная область тяжелой и/или легкой цепи содержит человеческие каркасные участки (FR).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит HVR-H1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, HVR-H2, который

40 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, HVR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, HVR-L1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, HVR-L2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и HVR-L3, который

45 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую HVR-H1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, HVR-H2, который содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, HVR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и (б) переменную область легкой цепи (VL), содержащую HVR-L1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, HVR-L2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и HVR-L3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления изобретения переменная область тяжелой и/или легкой цепи представляет собой гуманизованную переменную область. В некоторых вариантах осуществления изобретения переменная область тяжелой и/или легкой цепи содержит человеческие каркасные участки (FR).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область легкой цепи (VL), которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит (а) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, и (б) переменную область легкой цепи (VL), которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

В конкретном варианте осуществления изобретения антитело содержит (а) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и (б) переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой гуманизованное антитело. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой молекулу иммуноглобулина, которая содержит человеческую константную область, в частности молекулу иммуноглобулина IgG-класса, которая содержит человеческие CH1-, CH2-, CH3- и/или CL-домены. Примеры последовательностей человеческих константных доменов представлены в SEQ ID NO: 31 и 32 (CL-домены человеческой каппа- и лямбда цепи соответственно) и в SEQ ID NO: 33 (константные домены CH1-CH2-CH3 тяжелой цепи человеческого IgG₁). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 32, в частности аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33. В частности, константная область тяжелой цепи может содержать аминокислотные мутации в Fc-домене, указанные в настоящем описании.

Fc-домен

В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело, содержащееся в иммуноконъюгатах, предлагаемых в изобретении, содержит Fc-домен, который состоит из первой и второй субъединиц. Fc-домен антитела состоит из пары полипептидных цепей, содержащих домены тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина. Например, Fc-домен молекулы иммуноглобулина G (IgG) представляет собой димер, каждая субъединица которого содержит константные домены CH2 и CH3 тяжелой цепи IgG. Две субъединицы Fc-домена обладают способностью к стабильной ассоциации друг с другом. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит не более одного Fc-домена.

В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен антитела, содержащегося в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, представляет собой Fc-домен IgG. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG₁. В другом варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG₄. В более конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG₄, содержащий аминокислотную замену в положении S228 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота), в частности аминокислотную замену S228P. Указанная аминокислотная замена снижает *in vivo* обмен в Fab-плече антител IgG₄-подкласса (см. Stubenrauch и др., Drug Metabolism and Disposition 38, 2010, сс. 84-91). В другом конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой человеческий Fc-домен. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен человеческого IgG₁. Примером последовательности Fc-области человеческого IgG₁ является SEQ ID NO: 30.

Модификации Fc-домена, способствующие гетеродимеризации

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, содержат мутантный полипептид IL-2, в частности единичный (не более одного) мутантный полипептид IL-2, слитый с одной или с другой из двух субъединиц Fc-домена, таким образом, две субъединицы Fc-домена, как правило, содержатся в двух неидентичных полипептидных цепях.

Рекомбинантная совместная экспрессия этих полипептидов и последующая димеризация приводят к нескольким возможным комбинациям двух полипептидов. Для повышения выхода и чистоты иммуноконъюгата при рекомбинантном получении целесообразно интродуцировать в Fc-домен антитела модификацию, способствующую ассоциации требуемых полипептидов.

Таким образом, в конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-домен антитела, содержащегося в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, содержит модификацию, которая способствует ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена. Сайт наиболее сильного белок-белкового взаимодействия двух субъединиц Fc-домена человеческого IgG находится в CH3-домене Fc-домена. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация находится в CH3-домене Fc-домена.

Существует несколько подходов к модификациям в CH3-домене Fc-домена для усиления гетеродимеризации, которые подробно описаны, например, в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012058768, WO 2013157954, WO 2013096291. Как правило, во всех указанных подходах CH3-домен первой субъединицы Fc-домена и CH3-домен второй субъединицы Fc-домена оба конструируют комплементарным образом, в результате чего каждый CH3-домен (или тяжелая цепь, содержащая его),

не может более образовывать гомодимер сам с собой, но у него усилена способность к гетеродимеризации со сконструированным комплементарным образом другим СНЗ-доменом (в результате имеет место гетеродимеризация первого и второго СНЗ-доменов и не образуются гомодимеры между двумя первыми или двумя вторыми СНЗ-доменами).

5 В конкретном варианте осуществления изобретения указанная модификация, способствующая ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена, представляет собой так называемую модификацию типа «knob-in-hole» (типа «выступ-во впадину»), которая включает модификацию, приводящую к образованию «выступа» на одной из двух субъединиц Fc-домена и модификацию, приводящую к образованию «впадины»
10 в другой одной из двух субъединиц Fc-домена.

Технология «knob-into-hole» описана, например, в US №5731168; US №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») в поверхности раздела
15 второго полипептида, в результате выпуклость может помещаться в полость, способствуя тем самым образованию гетеродимера и препятствуя образованию гомодимера. Выпуклости конструируют путем замены аминокислот с небольшими боковыми цепями на поверхности раздела первого полипептида на аминокислоты с более крупными боковыми цепями (например, на тирозин или триптофан).

20 Компенсирующие полости идентичного или сходного с выпуклостями размера создают в поверхности раздела второго полипептида путем замены аминокислот с крупными боковыми цепями на аминокислоты с менее крупными боковыми цепями (например, аланин или треонин).

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретения в СНЗ-домене
25 первой субъединицы Fc-домена антитела, содержащегося в иммуноконъюгате, аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, который имеет больший объем боковой цепи, что приводит к образованию выпуклости на СНЗ-домене первой субъединицы, которая может помещаться в полость в СНЗ-домене второй субъединицы, и в СНЗ-домене второй субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток заменен
30 аминокислотным остатком, который имеет меньший объем боковой цепи, что приводит к образованию полости в СНЗ-домене второй субъединицы, в которую может помещаться выпуклость на СНЗ-домене первой субъединицы.

Предпочтительно указанный аминокислотный остаток, который имеет больший объем боковой цепи, выбирают из группы, состоящей из аргинина (R), фенилаланина
35 (F), тирозина (Y) и триптофана (W).

Предпочтительно указанный аминокислотный остаток, который имеет меньший объем боковой цепи, выбирают из группы, состоящей из аланина (A), серина (S), треонина (T) и валина (V).

Выпуклость и полость можно создавать путем изменения нуклеиновых кислот,
40 кодирующих полипептиды, например, с помощью сайтнаправленного мутагенеза или путем пептидного синтеза.

В конкретном варианте осуществления изобретения в СНЗ-домене первой субъединицы Fc-домена (субъединица с «выступом») остаток треонина в положении 366 заменен остатком триптофана (T366W), а в СНЗ-домене второй субъединицы Fc-
45 домена (субъединица с «впадиной») остаток тирозина в положении 407 заменен на остаток валина (Y407V). В одном из вариантов осуществления изобретения во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток треонина в положении 366 заменен на остаток серина (T366S) и остаток лейцина в положении 368 заменен на остаток аланина

(L368A) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В следующем варианте осуществления изобретения в первой субъединице Fc-домена дополнительно остаток серина в положении 354 заменен на остаток цистеина (S354C) или остаток глутаминовой кислоты в положении 356 заменен на остаток цистеина (E356C) (в частности остаток серина в положении 354 заменен на остаток цистеина), а во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток тирозина в положении 349 заменен на остаток цистеина (Y349C) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Интродукция указанных двух остатков цистеина приводит к образованию дисульфидного мостика между двумя субъединицами Fc-домена, тем самым дополнительно стабилизируя димер (Carter, J Immunol Methods 248, 2001, сс. 7-15).

В конкретном варианте осуществления изобретения первая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены S354C и T366 W, а вторая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены Y349C, T366S, L368A и Y407V (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая субъединица Fc-домена дополнительно содержит аминокислотные замены H435R и Y436F (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В конкретном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 слит (необязательно через линкерный пептид) с первой субъединицей Fc-домена (содержащей модификацию, приводящую к образованию «выступа»). Не вдаваясь в теорию, слияние мутантного полипептида IL-2 с содержащей «выступ» субъединицей Fc-домена может (дополнительно) минимизировать образование иммуноконъюгатов, которые содержат два мутантных полипептида IL-2 (стерический «конфликт» двух содержащих «выступ» полипептидов).

Другие методики СНЗ-модификации для усиления гетеродимеризации рассматриваются в качестве альтернатив согласно изобретению и описаны, например, в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291.

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы применяют подход к гетеродимеризации, описанный в EP 1870459. Этот подход основан на интродукции заряженных аминокислот с противоположными зарядами в конкретные аминокислотные положения в поверхности раздела СНЗ/СНЗ между двумя субъединицами Fc-домена. Одним из предпочтительных вариантов антитела, содержащегося в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, являются аминокислотные мутации R409D; K370E в одном из двух СНЗ-доменов (Fc-домена) и аминокислотные мутации D399K; E357K в другом одном из СНЗ-доменов Fc-домена (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В другом варианте осуществления изобретения антитело, содержащееся в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, содержит аминокислотную мутацию T366W в СНЗ-доме первой субъединицы Fc-домена и аминокислотные мутации T366S, L368A, Y407V в СНЗ-доме второй субъединицы Fc-домена, и дополнительно аминокислотные мутации R409D; K370E в СНЗ-доме первой субъединицы Fc-домена и аминокислотные мутации D399K; E357K в СНЗ-доме второй субъединицы Fc-домена (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В другом варианте осуществления изобретения антитело, содержащееся в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, содержит аминокислотные мутации S354C, T366W в СНЗ-доме первой субъединицы Fc-домена и аминокислотные мутации

Y349C, T366S, L368A, Y407V в СНЗ-доме второй субъединицы Fc-домена, или указанное антитело содержит аминокислотные мутации Y349C, T366W в СНЗ-доме первой субъединицы Fc-домена и аминокислотные мутации S354C, T366S, L368A, Y407V в СНЗ-доме второй субъединицы Fc-домена и дополнительно аминокислотные мутации R409D; K370E в СНЗ-доме первой субъединицы Fc-домена и аминокислотные мутации D399K; E357K в СНЗ-доме второй субъединицы Fc-домена (во всех случаях нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы применяют подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2013/157953. В одном из вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию T366K, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию L351D (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В другом варианте осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит дополнительно аминокислотную мутацию L351K. В другом варианте осуществления изобретения второй СНЗ-домен содержит дополнительно аминокислотную мутацию, выбранную из Y349E, Y349D и L368E (предпочтительно L368E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы применяют подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2012/058768. В одном из вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации L351Y, Y407A, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации T366A, K409F. В другом варианте осуществления изобретения второй СНЗ-домен содержит дополнительную аминокислотную мутацию в положении T411, D399, S400, F405, N390 или K392, например, выбранную из а) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E или T411W, б) D399R, D399W, D399Y или D399K, в) S400E, S400D, S400R или S400K, г) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V или F405W, д) N390R, N390K или N390D, е) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F или K392E (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В другом варианте осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации L351Y, Y407A, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации T366V, K409F. В следующем варианте осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию Y407A, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации T366A, K409F. В следующем варианте осуществления изобретения второй СНЗ-домен содержит дополнительно аминокислотные мутации K392E, T411E, D399R и S400R (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы применяют подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2011/143545, например, с использованием аминокислотной модификации в положении, выбранном из группы, состоящей из 368 и 409 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы применяют подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2011/090762, в котором также используется описанная выше технология «knobs-into-holes». В одном из вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию T366W, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию Y407A. В одном из вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию T366Y, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию Y407T (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы применяют антитело, содержащееся в иммуноконъюгате, которое относится к IgG₂-подклассу, или его Fc-домен, и подход к гетеродимеризации, описанный в WO

2010/129304.

В альтернативном варианте осуществления изобретения модификация, способствующая ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена, содержит модификацию, обуславливающую явления электростатического корректора, например, описанные в публикации РСТ WO 2009/089004. Как правило, этот метод включает замену одного или нескольких аминокислотных остатков на поверхности раздела двух субъединиц Fc-домена на заряженные аминокислотные остатки, что приводит к тому, что образованием гомодимера становится электростатически невыгодным, а гетеродимеризация становится электростатически выгодной. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотную замену K392 или N392 на отрицательно заряженную аминокислоту (например, глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), предпочтительно K392D или N392D), а второй СНЗ-домен содержит аминокислотную замену D399, E356, D356 или E357 на положительно заряженную аминокислоту (например, лизин (K) или аргинин (R), предпочтительно D399K, E356K, D356K или E357K, и более предпочтительно D399K и E356K). В следующем варианте осуществления изобретения первый СНЗ-домен дополнительно содержит аминокислотную замену K409 или R409 на отрицательно заряженную аминокислоту (например, глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), предпочтительно K409D или R409D). В другом варианте осуществления изобретения первый СНЗ-домен в дополнительном или альтернативном варианте содержит аминокислотную замену K439 и/или K370 на отрицательно заряженную аминокислоту (например, глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D)) (во всех случаях нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Еще в одном варианте осуществления изобретения, в качестве альтернативы применяют подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2007/147901. В одном из вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации K253E, D282K и K322D, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации D239K, E240K и K292D (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Еще в одном варианте осуществления изобретения в качестве альтернативы можно применять подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2007/110205.

В одном из вариантов осуществления изобретения первая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены K392D и K409D, а вторая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены D356K и D399K (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Модификации Fc-домена, приводящие к снижению связывания с Fc-рецептором и/или эффекторной функции

Fc-домен придает иммуноконъюгату предпочтительные фармакокинетические свойства, включая продолжительное время полужизни в сыворотке, что обеспечивает хорошее накопление в ткани-мишени и предпочтительное соотношение распределения в ткани-крови. Однако в то же время он может приводить к нежелательной направленности иммуноконъюгата к клеткам, которые экспрессируют Fc-рецепторы, а не к предпочтительным несущим антиген клеткам. Кроме того, совместная активация путей передачи сигналов Fc-рецептора может приводить к высвобождению цитокинов, что в сочетании с полипептидом IL-2 и продолжительным временем полужизни иммуноконъюгата, приводит к избыточной активации цитокиновых рецепторов и серьезным побочным действиям при системном введении. В соответствии с этим для общепринятых иммуноконъюгатов IgG-IL-2 описано наличие ассоциированных с ними инфузионных реакций (см., например, King и др., J Clin Oncol 22, 2004, сс. 4463-4473).

Таким образом, в конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-домен антитела, содержащегося в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, обладает пониженной аффинностью связывания с Fc-рецептором и/или пониженной эффекторной функцией по сравнению с нативным Fc-доменом IgG₁. В одном указанном варианте осуществления изобретения Fc-домен (или антитело, содержащее указанный Fc-домен) характеризуется аффинностью связывания, составляющей менее чем 50%, предпочтительно менее чем 20%, более предпочтительно менее чем 10% и наиболее предпочтительно менее чем 5% от аффинности связывания с Fc-рецептором нативного Fc-домена IgG₁ (или антитела, содержащего нативный Fc-домен IgG₁), и/или эффекторной функцией, составляющей менее чем 50%, предпочтительно менее чем 20%, более предпочтительно менее чем 10% и наиболее предпочтительно менее чем 5% от эффекторной функции нативного Fc-домена IgG₁ (или антитела, содержащего нативный Fc-домен IgG₁). В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен (или антитело, содержащее указанный Fc-домен) практически не связывается с Fc-рецептором и/или не индуцирует эффекторную функцию. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой Fc γ -рецептор. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой человеческий Fc-рецептор. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий человеческий Fc γ -рецептор, более конкретно человеческий Fc γ RIIIa, Fc γ RI или Fc γ RIIa, наиболее предпочтительно человеческий Fc γ RIIIa. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторная функция представляет собой одну или несколько функций, выбранных из группы, включающей CDC, ADCC, ADCP и секрецию цитокинов. В конкретном варианте осуществления изобретения эффекторная функция представляет собой ADCC. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен характеризуется практической такой же аффинностью связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), что и нативный Fc-домен IgG₁. Практически такое же связывание с FcRn достигается в том случае, когда Fc-домен (или антитело, содержащее указанный Fc-домен), характеризуется аффинностью связывания, составляющей более чем примерно 70%, предпочтительно более чем примерно 80%, более предпочтительно более чем примерно 90%, от аффинности связывания нативного Fc-домена IgG₁ (или антитела, содержащего нативный Fc-домен IgG₁) с FcRn.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения Fc-домен конструируют так, чтобы он обладал пониженной аффинностью связывания с Fc-рецептором и/или пониженной эффекторной функцией по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-домен антитела, содержащегося в иммуноконъюгате, содержит одну или несколько аминокислотных мутаций, которые снижают аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию. Как правило, в каждой из двух субъединиц Fc-домена присутствует(ют) одна или несколько одинаковых аминокислотных мутаций. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация снижает аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация снижает аффинность связывания Fc-домена 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 более одной аминокислотной мутации, которые снижают аффинность связывания Fc-домена

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 антитело, содержащее сконструированный Fc-домен, характеризуется аффинностью связывания, составляющей менее чем 20%, в частности, менее чем 10%, более предпочтительно менее чем 5% от аффинности связывания с Fc-рецептором, характерной для антитела, содержащего не подвергнутый инженерии Fc-домен. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой Fc γ -рецептор. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой человеческий Fc-рецептор. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий человеческий Fc-рецептор, более конкретно человеческий Fc γ RIIIa, Fc γ RI или Fc γ RIIa, наиболее предпочтительно человеческий Fc γ RIIIa. 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 Fc-домена с указанным рецептором, достигается, когда Fc-домен (или антитело, содержащее указанный Fc-домен) характеризуется аффинностью связывания с FcRn, составляющей более чем примерно 70% от аффинности связывания с FcRn не подвергнутой инженерии формы Fc-домена (или антитела, содержащего не подвергнутую инженерии форму Fc-домена). Fc-домен или антитело, содержащееся в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, которое содержит указанный Fc-домен, может характеризоваться аффинностью, составляющей более чем примерно 80% и даже более чем примерно 90% от указанной выше аффинности. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен антитела, содержащегося в иммуноконъюгате, создают так, чтобы он обладал пониженной эффекторной функцией по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. Пониженная эффекторная функция может представлять собой (но, не ограничиваясь только ими) пониженную (ые) одну или несколько из следующих функций: пониженная комплементзависимая цитотоксичность (CDC), пониженная антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC), пониженный антитело-обусловленный клеточнозависимый фагоцитоз (ADCP), пониженная секреция цитокинов, пониженное опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, пониженное связывание с NK-клетками, пониженное связывание с макрофагами, пониженное связывание с моноцитами, пониженное связывание с полиморфоядерными клетками, пониженная непосредственная передача сигнала, индуцирующего апоптоз, пониженное перекрестное сшивание связанных с мишенью антител, пониженное созревание дендритных клеток или пониженное Т-клеточное примирование. В одном из вариантов осуществления изобретения пониженная эффекторная функция представляет собой одну или несколько функций, выбранных из группы, включающей пониженную CDC, пониженную ADCC, пониженный ADCP и пониженную секрецию цитокинов. В конкретном варианте осуществления изобретения пониженная эффекторная функция представляет собой пониженную ADCC. В одном из вариантов осуществления изобретения пониженная ADCC составляет меньше 20% от ADCC, индуцируемой не подвергнутым инженерии Fc-доменом (или антителом, содержащим

не подвергнутый инженерии Fc-домен).

В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация, которая снижает аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, представляет собой аминокислотную замену. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из E233, L234, L235, N297, P331 и P329 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В более конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из L234, L235 и P329 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные замены L234A и L235A (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В одном из указанных вариантов осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG₁, в частности, Fc-домен человеческого IgG₁. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении P329. В более конкретном варианте осуществления изобретения аминокислотная замена представляет собой P329A или P329G, в частности P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении P329 и, кроме того, аминокислотную замену в положении, выбранном из E233, L234, L235, N297 и P331 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В более конкретных вариантах осуществления изобретения дополнительная аминокислотная замена представляет собой E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D или P331S. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные замены в положениях P329, L234 и L235 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В более конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные мутации L234A, L235A и P329G («P329G LALA», «PGLALA» или «LALAPG»). В частности, в конкретном варианте осуществления изобретения каждая из субъединиц Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота), т.е. в каждой из первой и второй субъединиц Fc-домена остаток лейцина в положении 234 заменен на остаток аланина (L234A), остаток лейцина в положении 235 заменен на остаток аланина (L235A) и остаток пролина в положении 329 заменен на остаток глицина (P329G) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В одном из указанных вариантов осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG₁, в частности Fc-домен человеческого IgG₁. Комбинация аминокислотных замен «P329G LALA» практически полностью элиминирует связывание с Fcγ-рецептором Fc-домена человеческого IgG₁ (а также комплементом), что описано в публикации РСТ WO 2012/130831, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. В WO 2012/130831 описаны также методы получения указанных мутантных Fc-доменов, методы изучения их свойств, таких как связывание с Fc-рецептором или эффекторные функции.

Антитела IgG₄-подкласса обладают пониженной аффинностью к связыванию с Fc-рецепторами и пониженными эффекторными функциями по сравнению с антителами IgG₁-подкласса. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен антитела, содержащегося в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, представляет собой Fc-домен IgG₄, в частности Fc-домен человеческого IgG₄. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен IgG₄ содержит аминокислотные замены в положении S228, конкретно аминокислотную замену S228P (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). Для дополнительного снижения аффинности связывания

с Fc-рецептором и/или его эффекторной функции в одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен IgG₄ содержит аминокислотную замену в положении L235, в частности, аминокислотную замену L235E (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В другом варианте осуществления изобретения Fc-домен IgG₄ содержит аминокислотную замену в положении P329, в частности, аминокислотную замену P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен IgG₄ содержит аминокислотные замены в положениях S228, L235 и P329, в частности, аминокислотные замены S228P, L235E и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). Указанные мутанты Fc-домена IgG₄ и их особенности связывания с Fcγ-рецептором описаны в публикации PCT WO 2012/130831, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен, характеризующийся пониженной аффинностью связывания с Fc-рецептором и/или пониженной эффекторной функцией по сравнению с нативным Fc-доменом IgG₁, представляет собой Fc-домен человеческого IgG₁, содержащий аминокислотные замены L234A, L235A и необязательно P329G, или Fc-домен человеческого IgG₄, содержащий аминокислотные замены S228P, L235E и необязательно P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В некоторых вариантах осуществления изобретения элиминировали N-гликозилирование Fc-домена. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную мутацию в положении N297, в частности, аминокислотную замену аспарагина на аланин (N297A) или аспарагиновую кислоту (N297D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Помимо Fc-доменов, описанных выше и в публикации PCT WO 2012/130831, Fc-домены с пониженной способностью связываться с Fc-рецептором и/или эффекторной функцией включают также Fc-домены с заменой одного или нескольких остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (US №637056) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). К указанным мутантам Fc относятся мутанты Fc с заменами в двух или большем количестве из аминокислотных положений 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый мутант Fc-домена «DANA» с заменой остатков 265 и 297 на аланин (US №7332581).

Мутантные Fc-домены можно получать путем аминокислотной делеции, замены, инсерции или модификации с использованием генетических или химических методов, хорошо известных в данной области. Генетические методы могут включать сайтнаправленный мутагенез кодирующей ДНК последовательности, ПЦР, синтез генов и т.п. Правильность нуклеотидных замен можно подтверждать, например, секвенированием.

Связывание с Fc-рецепторами можно легко определять, например, с помощью ELISA или поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием стандартного оборудования, такого как устройство BIAcore (фирма GE Healthcare), и с применением таких Fc-рецепторов, которые можно получать методом рекомбинантной экспрессии. Альтернативно этому, аффинность связывания Fc-доменов или антител, содержащих Fc-домен, с Fc-рецепторами можно оценивать с использованием клеточных линий, для которых известно, что они экспрессируют конкретные Fc-рецепторы, такие как человеческие NK-клетки, экспрессирующие FcγIIIa-рецептор.

Эффекторную функцию Fc-домена или антитела, содержащего Fc-домен, можно оценивать методами, известными в данной области. Примеры анализов *in vitro*, предназначенных для оценки ADCC-активности представляющей интерес молекулы,

описаны в US №5500362; у Hellstrom и др., Proc Natl Acad Sci USA 83, 1986, сс. 7059-7063 и Hellstrom и др., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1985, сс. 1499-1502; US №5821337; у Bruggemann и др., J Exp Med 166, 1987, сс. 1351-1361. Альтернативно этому, можно применять методы, основанные на нерадиоактивном анализе (см., например, АСТІ™ - нерадиоактивный анализ цитотоксичности с помощью проточной цитометрии (фирма CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, шт. Калифорния); и CytoTox 96® - нерадиоактивный анализ цитотоксичности (фирма Promega, Мэдисон, шт. Висконсин)). Приемлемыми эффекторными клетками для таких анализов являются моноклеарные клетки периферической крови (РВМС) и естественные клетки-киллеры (NK). В альтернативном или дополнительном варианте ADCC-активность представляющей интерес молекулы можно оценивать *in vivo*, например, с использованием созданных на животных моделей, описанных у Clynes и др., Proc Natl Acad Sci USA 95, 1998, сс. 652-656.

В некоторых вариантах осуществления изобретения снижают связывание Fc-домена с компонентом системы комплемента, в частности с C1q. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых Fc-домен конструируют так, чтобы он обладал пониженной эффекторной функцией, указанная пониженная эффекторная функция включает пониженную CDC. Можно осуществлять анализы связывания C1q для решения вопроса о том, может ли Fc-домен или антитело, содержащее Fc-домен, связываться с C1q и, как следствие, обладает ли он CDC-активностью (см., например, анализы связывания с C1q и C3с с помощью ELISA, описанные в WO 2006/029879 и WO 2005/100402). Для оценки активации комплемента можно осуществлять анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro и др., J Immunol Methods 202, 1996, с. 163; Cragg и др., Blood 101, 2003, сс. 1045-1052 и Cragg и Glennie, Blood 103, 2004, сс. 2738-2743).

Анализ FcRn-связывания и определение клиренса/времени полужизни *in vivo* можно осуществлять также с использованием методов, известных в данной области (см., например, Petkova S.B. и др., Int'l. Immunol. 18(12), 2006, сс. 1759-1769; WO 2013/120929).

Конкретные объекты изобретения

Одним из объектов изобретения является иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид IL-2 и антитело, которое связывается с PD-1,

в котором мутантный полипептид IL-2 представляет собой молекулу человеческого IL-2, которая содержит аминокислотные замены F42A, Y45A и L72G (нумерация относительно последовательности человеческого IL-2 SEQ ID NO: 19); и

в котором антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

Одним из объектов изобретения является иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид IL-2 и антитело, которое связывается с PD-1,

в котором мутантный полипептид IL-2 представляет собой молекулу человеческого IL-2, которая содержит аминокислотные замены T3A, F42A, Y45A, L72G и C125A (нумерация относительно последовательности человеческого IL-2 SEQ ID NO: 19); и

в котором антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

Одним из объектов изобретения является иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид IL-2 и антитело, которое связывается с PD-1,

в котором мутантный полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 20; и

в котором антитело содержит (а) (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

В одном из вариантов осуществления любого из указанных выше объектов изобретения антитело представляет собой иммуноглобулин IgG-класса, содержащий Fc-домен человеческого IgG₁, который состоит из первой и второй субъединиц,

в котором в первой субъединице Fc-домена остаток треонина в положении 366 заменен на остаток триптофана (T366W), а во второй субъединице Fc-домена остаток тирозина в положении 407 заменен на остаток валина (Y407V) и необязательно остаток треонина в положении 366 заменен на остаток серина (T366S) и остаток лейцина в положении 368 заменен на остаток аланина (L368A) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота),

и в котором также каждая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В указанном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид IL-2 может быть слит на его аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой первой субъединицы Fc-домена через линкерный пептид, имеющий SEQ ID NO: 21.

Одним из объектов изобретения является иммуноконъюгат, содержащий полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 22, полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24, и полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 25.

Полинуклеотиды

Изобретение относится также к выделенным полинуклеотидам, которые кодируют иммуноконъюгат, указанный в настоящем описании, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент.

Полинуклеотиды, кодирующие иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно экспрессировать в виде индивидуального полинуклеотида, который кодирует полный иммуноконъюгат, или в виде нескольких (например, двух или большего количества) совместно экспрессируемых полинуклеотидов. Полипептиды, кодируемые совместно экспрессируемыми полинуклеотидами, можно объединять путем ассоциации, например, через дисульфидные связи или другими путями с получением функционального иммуноконъюгата. Например, часть антитела, представляющая собой легкую цепь, может кодироваться полинуклеотидом, отличным от полинуклеотида, который кодирует часть иммуноконъюгата, представляющую собой тяжелую цепь антитела и мутантный полипептид IL-2. При совместной экспрессии полипептиды тяжелой цепи должны связываться с полипептидами легкой цепи с образованием иммуноконъюгата. В другом примере часть иммуноконъюгата, содержащую одну из двух субъединиц Fc-домена и мутантный полипептид IL-2, может кодироваться полинуклеотидом, отличным от того, который кодирует часть иммуноконъюгата, содержащую вторую из двух субъединиц Fc-домена. При совместной экспрессии субъединицы Fc-домена должны в результате

ассоциации образовывать Fc-домен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный полинуклеотид кодирует полный иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, который указан в настоящем описании. В других вариантах осуществления изобретения выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, содержащийся в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, который указан в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует тяжелую цепь антитела, содержащегося в иммуноконъюгате (например, тяжелую цепь иммуноглобулина), и мутантный полипептид IL-2. В другом варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует легкую цепь антитела, содержащегося в иммуноконъюгате.

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, применяемые в изобретении, можно получать с помощью делеции, замены, инсерции или модификации, используя генетические или химические методы, известные в данной области. Генетические методы могут включать сайтнаправленный мутагенез кодирующей ДНК последовательности, ПЦР, синтез генов и т.п. Правильность нуклеотидных замен можно подтверждать, например, секвенированием. Следует отметить, что нуклеотидная последовательность нативного IL-2 описана у Taniguchi с соавторами (Nature 302, 1983, сс. 305-310), а нуклеиновая кислота, кодирующая человеческий IL-2, доступна из публичных депозитариев, таких как Американская коллекция типовых культур (Роквилл, шт. Мэриленд).

Последовательность нативного человеческого IL-2 представлена в SEQ ID NO: 19.

Замена или инсерция может включать встречающиеся в естественных условиях или не встречающиеся в естественных условиях аминокислотные остатки. Аминокислотная модификация включает хорошо известные методы химической модификации, такие как добавление сайтов гликозилирования или присоединения углеводов и т.п.

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно получать с помощью твердофазного пептидного синтеза (например, твердофазный синтез Меррифилда) или методом рекомбинации. Для рекомбинантного получения один или несколько полинуклеотидов, кодирующих иммуноконъюгат (фрагмент), например, описанный выше, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Указанный полинуклеотид можно легко выделять и секвенировать с помощью общепринятых процедур. Одним из объектов 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 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 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 полипептидов, 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 полинуклеотидом, который кодирует иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, или его 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 оказывает 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, происходящие из генов позвоночных животных, таких как ген актина, белка теплового шока, бычьего гормона роста и кроличьего β -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 тетрациклинами). 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, происходящие из вирусных систем (в частности внутренний сайт посадки рибосом или IRES, который обозначают также как CITE-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, направляющие секрецию полипептида, который кодируется полинуклеотидом, предлагаемым в настоящем изобретении. Согласно гипотезе, касающейся сигналов, белки, секретируемые 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, секретируемые клетками позвоночных животных, как правило, имеют сигнальный пептид, слитый с N-концом полипептида, который отщепляется от транслируемого полипептида с образованием секретируемой 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 применяют 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 направлять секрецию полипептида, функционального 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 мышинной β -глюкуронидазы.

ДНК, кодирующую короткую белковую последовательность, которую можно применять для облегчения дальнейшей очистки (например, гистидиновую метку), или предназначенную для мечения слитого белка, можно включать внутрь или на концы полинуклеотида, кодирующего иммуноконъюгат (фрагмент).

Другим объектом изобретения является клетка-хозяин, содержащая один или несколько полинуклеотидов, предлагаемых в изобретении. Некоторыми объектами 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 объектов изобретения клетка-хозяин содержит вектор (например, трансформирована или трансфектирована вектором), содержащий полинуклеотид, который кодирует иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении. В контексте настоящего описания понятие «клетка-хозяин» относится к любому типу клеточной системы, которую можно конструировать для получения иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, или их фрагментов. Клетки-хозяева, пригодные для репликации и для поддержания экспрессии 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 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 (СНО), 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 растворимую фракцию 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, в частности для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. В качестве хозяев можно применять также культуры растительных клеток (см., например, US №№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 (ВНК); клетки Сертоли мыши (ТМ4-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 (ММТ 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

5 dhfr⁻-CHO-клетки (Urlaub и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1980, с. 4216); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0, P3X63 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
10 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,
15 предпочтительно клетку млекопитающего, такую как клетка яичника китайского хомячка (CHO), клетка почки человеческого эмбриона (НЕК) или лимфоидная клетка (например, клетка Y0, NS0, Sp20).

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

Одним из объектов изобретения является способ получения иммуноконъюгата,
25 предлагаемого в изобретении, где способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей один или несколько полинуклеотидов, кодирующих иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, и необязательно выделение иммуноконъюгата из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

В иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, мутантный полипептид IL-2
30 можно генетически сливать с антителом или можно химически конъюгировать с антителом. Генетическое слияние полипептида IL-2 с антителом можно создавать так, чтобы сливать последовательность IL-2 с полипептидом непосредственно или опосредованного через линкерную последовательность. Состав и длину линкера можно определять с помощью методов, хорошо известных в данной области и можно оценивать
35 их эффективность. Конкретные линкерные пептиды представлены в настоящем описании. При необходимости можно включать также дополнительные последовательности в сайт расщепления для разделения индивидуальных компонентов слияния, например, распознаваемую эндопептидазой последовательность. Кроме того, слитый белок IL-2 можно синтезировать химически, используя методы синтеза
40 полипептидов, хорошо известные в данной области (например, твердофазный синтез Меррифилда). Мутантные полипептиды IL-2 можно химически конъюгировать с другими молекулами, например антителами, используя хорошо известные методы химической конъюгации. Для этой цели можно применять бифункциональные
45 перекрестносшивающие реагенты, такие как гомофункциональные или гетерофункциональные перекрестносшивающие реагенты, хорошо известные в данной области. Тип предназначенного для применения перекрестносшивающего реагента зависит от природы молекулы, подлежащей слиянию с IL-2, его легко могут определять специалисты в данной области. В альтернативном или дополнительном варианте мутант

IL-2 и/или молекулу, предназначенную для конъюгации с ним, можно химически дериватизировать так, чтобы их обоим можно было конъюгироваться с использованием отдельной реакции, что также хорошо известно в данной области.

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, содержат антитело. Методы получения 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 US №4186567) или можно получать, например, путем скрининга комбинаторных библиотек, содержащих переменные области тяжелых цепей и переменные области легких цепей (см., например, US №5969108 на имя McCafferty). Иммуноконъюгаты, антитела и методы их получения подробно описаны также в публикациях PCT WO 2011/020783, WO 2012/107417 и WO 2012/146628, каждая из которых полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

В иммуноконъюгатах, предлагаемых в изобретении можно применять антитело любых видов животных. Примерами антител, которые можно применять согласно настоящему изобретению, являются (но не ограничиваясь только ими) конструкции, полученные из организма мышей, приматов или человека. Если иммуноконъюгат предназначен для применения на человеке, то можно использовать химерную форму антитела, в которой константные области антитела получают из человеческого антитела. Гуманизированную или полностью человеческую форму антитела можно получать также с помощью методов, хорошо известных в данной области (см., например, US №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 функций антитела), (б) трансплантация только нечеловеческих определяющих специфичность участков (SDR или a-CDR; остатки имеют решающее значение для взаимодействия антитело-антиген) в человеческие каркасные и константные области, или (в) трансплантация полных нечеловеческих переменных доменов, но 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; US, №№5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri и др., Methods 36, 2005, сс. 25-34) (описание трансплантации SDR (a-CDR)); Padlan, Mol Immunol 28, 1991, сс. 489-498 (описание метода изменения поверхности («повторное покрытие»)); 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 каркасные участки, которые можно применять для гуманизации, включают (но не ограничиваясь только ими): каркасные участки, выбранные на основе метода «наилучшего подбора» (см., например, Sims и др., J. Immunol. 151, 1993, с. 2296); каркасные участки, выведенные из консенсусной последовательности человеческих антител конкретной подгруппы переменных областей легких или тяжелых цепей (см., например, Carter и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1992, с. 4285; и Presta и др., J. Immunol., 151, 1993, с. 2623); человеческие

зрелые (подвергнутые соматической мутации) каркасные участки или каркасные участки человеческой зародышевой линии (см., например, Almagro и Fransson, *Front. Biosci.* 13, 2008, сс. 1619-1633); и каркасные участки, полученные в результате скрининга FR-библиотек (см., например, Vasa и др., *J. Biol. Chem.* 272, 1997, сс. 10678-10684) и Rosok и др., *J. Biol. Chem.* 271, 1996, сс. 22611-22618).

Человеческие антитела можно получать различными методами, известными в данной области. Человечески 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 антитела можно получать путем введения иммуногена трансгенному животному, которое модифицировано таким образом, что продуцирует интактные человеческие антитела или интактные антитела с человеческими вариабельными областями в ответ на контрольное заражение антигеном. Указанные животные, как правило, содержат все или часть локусов человеческого иммуноглобулина, которыми заменены эндогенные локусы иммуноглобулина, или которые присутствуют вне хромосом или интегрированы произвольно в хромосомы животного. У таких трансгенных мышей эндогенные локусы иммуноглобулина, как правило, инактивированы. Обзор методов получения человеческих антител в трансгенных животных см. у Lonberg, *Nat. Biotech.* 23, 2005, сс. 1117-1125. Они описаны также, например, в US №№6075181 и 6150584 в которых описана технология XENOMOUSE™; US №5770429, в котором описана технология HUMAB®; US 7041870, в котором описана технология K-M MOUSE® и в публикации заявки на патент США №2007/0061900, в котором описана технология VELOCIMOUSE®. Человеческие вариабельные области интактных антител, полученные в таких животных, можно дополнительно модифицировать, например, объединяя с человеческой константной областью из другого антитела.

Человеческие антитела можно получать также с помощью методов, основанных на применении гибридом. Описаны клеточные линии человеческой миеломы и мышино-человеческой гетеромиеломы, предназначенные для получения человеческих моноклональных антител (см., например, Kozbor, *J. Immunol.*, 133, 1984, с. 3001; Brodeur и др., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 1987, сс. 51-63 (изд-во Marcel Dekker, Inc., New York); и Boerner и др., *J. Immunol.*, 147, 1991, с. 86). Человеческие антитела, созданные с помощью технологии, основанной на применении человеческих В-клеточных гибридом, описаны также у Li и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 2006, сс. 3557-3562. Дополнительные методы представляют методы, описанные, например, в US №7189826 (описание получения моноклональных человеческих антител типа IgM из клеточных линий гибридом) и у Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4), 2006, сс. 265-268 (описание человеческих-человеческих гибридом). Технология, основанная на применении человеческих гибридом (Trioma-технология), описана также у Vollmers и Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3), 2005, сс. 927-937 и Vollmers и Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3), 2005, сс. 185-191.

Человеческие антитела можно создавать также путем выделения из библиотек человеческих антител, представленных в настоящем описании.

Антитела, применяемые согласно изобретению, можно выделять путем скрининга комбинаторных библиотек в отношении антител с требуемой(ыми) активностью или видами активности. Обзор методов скрининга комбинаторных библиотек представлен, например, у Lerner и др. в *Nature Reviews* 16, 2016, сс. 498-508. Например, в данной области известны различные методы создания фаговых дисплейных библиотек и скрининга указанных библиотек в отношении антител, обладающих требуемыми

характеристиками связывания. Обзор таких методов представлен, например, у Frenzel и др. в *mAbs* 8, 2016, сс. 1177-1194; Bazan и др. в *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 8, 2012, сс. 1817-1828 и Zhao и др., в *Critical Reviews in Biotechnology* 36, 2016, сс. 276-289, а также у Hoogenboom и др. в *Methods in Molecular Biology* 178, 2001, сс. 1-37 (под ред.

- 5 О'Brien и др., изд-во Human Press, Totowa) и у Marks и Bradbury в *Methods in Molecular Biology* 248, 2003, сс. 161-175, (под ред. Lo, изд-во Human Press). При осуществлении некоторых методов фагового дисплея популяции VH- и VL-генов клонируют по отдельности с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рекомбинируют произвольно в фаговых библиотеках, которые затем подвергают скринингу в отношении
- 10 антигенсвязывающего фага согласно методу, описанному у Winter и др., *Ann. Rev. Immunol.*, 12, 1994, сс. 433-455. Фаг, как правило, экспонирует фрагменты антител либо в виде одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv), либо в виде Fab-фрагментов. Библиотеки, полученные из иммунизированных источников, включают антитела, обладающие высокой аффинностью к иммуногену, при этом отсутствует необходимость в создании
- 15 гибридом. Альтернативно этому, можно клонировать необработанную («наивную») популяцию (например, из организма человека), получая один источник антител к широкому спектру чужих, а также своих антигенов без какой-либо иммунизации, что описано у Griffiths и др., *EMBO J*, 12, 1993, сс. 725-734. И, наконец, «наивные» библиотеки можно получать также методами синтеза путем клонирования неперегруппированных
- 20 сегментов V-гена из стволовых клеток и с помощью ПЦР-праймеров, содержащих случайную последовательность, для кодирования гипервариабельных CDR3-участков и для осуществления перегруппировки *in vitro* согласно методу, описанному у Hoogenboom и Winter, *J. Mol. Biol.*, 227, 1992, сс. 381-388. Фаговые библиотеки человеческих антител описаны, например, в следующих патентных публикациях: US
- 25 №№5750373; 7985840; 7785903 и 8679490, а также в публикациях патентов США №№.2005/0079574, 2007/0117126, 2007/0237764 и 2007/0292936. Кроме того, примеры известных в данной области методов скрининга комбинаторных библиотек в отношении антител с требуемой(ыми) активностью или видами активности включают рибосомный и мРНК-дисплей, а также методы дисплея и селекции антител на бактериях, клетках
- 30 млекопитающих, клетках насекомых или клетках дрожжей. Обзор методов дисплея на поверхности дрожжей представлен, например, у Scholler и др. в *Methods in Molecular Biology* 503, 2012, сс. 135-156 и у Cherf и др. в *Methods in Molecular biology* 1319, 2015, сс. 155-175, а также у Zhao и др., в *Methods in Molecular Biology* 889, 2012, сс. 73-84. Методы рибосомного дисплея описаны, например, у He и др., в *Nucleic Acids Research* 25, 1997, сс. 5132-5134 и у Hanes и др., в *PNAS* 94, 1997, сс. 4937-4942.

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

Иммуноконъюгаты, полученные согласно настоящему описанию, 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.

- 45 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 иммуноконъюгат. Например, можно применять 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 геле-фильтрации можно использовать для выделения иммуноконъюгата, практически согласно методу, описанному в разделе «Примеры». Чистоту иммуноконъюгата можно определять с помощью любого из широкого разнообразия хорошо известных аналитических методов, включая гель-электрофорез, жидкостную хроматографию высокого давления и т.п.

Композиции, препаративные формы и пути введения

Следующим объектом изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие иммуноконъюгат, представленный в настоящем описании, например, предназначенные для применения в любом из указанных ниже терапевтических способов.

В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любой из иммуноконъюгатов, представленных в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любой из иммуноконъюгатов, представленных в настоящем описании, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, указанное ниже.

Кроме того, предложен способ получения иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, в форме, пригодной для введения *in vivo*, где способ включает (а) получение иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, и (б) приготовление препаративной формы иммуноконъюгата в сочетании по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем, с получением иммуноконъюгата в форме, предназначенной для введения *in vivo*.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат в терапевтически эффективном количестве иммуноконъюгат, который растворен или диспергирован в фармацевтически приемлемом носителе. Понятия «фармацевтически или фармакологически приемлемый» относятся 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 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, как должно быть очевидно, для введения животному (например, человеку) препараты должны удовлетворять стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты в соответствии с требованиями отдела биологических стандартов FDA или соответствующих руководящих органов в других странах. Предпочтительные композиции представляют собой лиофилизированные препаративные формы или водные растворы. В контексте настоящего описания «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, буферы, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты), агенты для придания изотоничности, замедляющие абсорбцию агенты, соли, консерванты, антиоксиданты,

белки, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственных средств, полимеры, гели, связывающие вещества, эксципиенты, разрыхлители, замасливатели, подслащивающие вещества, корригенты, красители, материалы, подобные указанным, 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). Предполагается, что в терапевтических или фармацевтических композициях можно применять любой из общепринятых носителей, за исключением тех случаев, когда он является несовместимым с действующим веществом.

Иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении (и любое дополнительное терапевтическое средство), можно вводить любыми приемлемыми путями, включая парентеральную, внутрилегочную и внутриназальную и при необходимости местную обработку, введение в повреждение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Введение доз можно осуществлять с помощью любого приемлемого пути, например, с помощью инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, в зависимости, в том числе от того, является ли введение кратковременным или хроническим.

Парентеральные композиции включают композиции, созданные для введения путем инъекции, например, подкожной, внутрикожной, внутрь повреждения, внутривенной, внутриартериальной, внутримышечной, подбололочечной или внутрибрюшинной инъекции. Для инъекции 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, 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 иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, в требуемом количестве в соответствующий растворитель при необходимости в сочетании с различными другими ингредиентами, перечисленными ниже. Стерильность можно легко обеспечивать, 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 из предварительно стерилизованной фильтрацией жидкой среды. При необходимости жидкая среда перед осуществлением инъекции может 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 ЭДТА; 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 этилолеаты 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 (18-ое изд., изд-во Mack Printing Company, 1990). 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 конкретных вариантах осуществления изобретения для достижения пролонгированной абсорбции инъектируемой композиции можно применять в композиции агенты, замедляющие абсорбцию, такие, например, как моностеарат алюминия, желатин или их комбинации.

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, иммуноконъюгат 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 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 обработку белков, с получением препаратов, которые можно
5 применять в фармацевтических целях. Соответствующая форма зависит от выбранного пути введения.

Иммуноконъюгаты можно включать в композицию в виде свободной кислоты или свободного основания, в нейтральной форме или в форме соли. Фармацевтически приемлемые соли представляют собой соли, которые практически сохраняют
10 биологическую активность свободной кислоты или свободного основания. Они включают кислотно-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,
15 образованные со свободными карбоксильными группами, 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 высокой растворимости в водных и других протонных растворителях по
20 сравнению с соответствующими формами в виде свободных оснований.

Способы и композиции для терапевтического применения

Любой из иммуноконъюгатов, представленных в настоящем описании, можно применять в терапевтических способах. Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно применять в качестве иммунотерапевтических агентов, например,
25 при лечении раков.

Для применения в терапевтических способах 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 нарушение, подлежащее лечению, конкретное
30 млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, причину заболевания, область введения агента, метод введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим медикам.

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, наиболее целесообразно применять для лечения болезненных состояний, при которых благоприятное действие оказывает стимуляция иммунной системы хозяина, в частности состояний, при которых требуется
35 повышенный клеточный иммунный ответ. Они могут включать болезненные состояния, при которых иммунный ответ хозяина является недостаточным или несовершенным. Болезненные состояния, при которых можно применять иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, включают, например, опухоль или инфекцию, при которой
40 клеточный иммунный ответ является имеющим решающее значение механизмом специфического иммунитета. Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно вводить per se или в любой приемлемой фармацевтической композиции.

Одним из объектов изобретения являются иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения в качестве лекарственного средства.
45 Другими объектами изобретения являются иммуноконъюгаты, предназначенные для лечения заболевания. В некоторых объектах изобретения иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, предназначены для применения в способе лечения. Одним из вариантов осуществления изобретения является иммуноконъюгат, представленный

в настоящем описании, предназначенный для применения для лечения заболевания у индивидуума, который нуждается в этом. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является иммуноконъюгат, предназначенный для применения в способе лечения индивидуума, имеющего заболевание, который включает введение индивидууму иммуноконъюгата в терапевтически эффективном количестве. 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 включает также введение индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, например, противоракового средства, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. Другими вариантами осуществления изобретения является иммуноконъюгат, предназначенный для применения для стимуляции иммунной системы. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является иммуноконъюгат, предназначенный для применения в способе стимуляции иммунной системы у индивидуума, включающем введение индивидууму в эффективном количестве иммуноконъюгата 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 применение иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, для производства или приготовления лекарственного средства. В одном из вариантов осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для лечения заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом. В одном из вариантов осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения заболевания, включающем введение индивидууму, который имеет заболевание, в терапевтически эффективном количестве лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления 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 включает также введение индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, например, противоракового средства, 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, включающем введение индивидууму в эффективном количестве лекарственного средства 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 (ЛАК) и т.п.

5 Следующим объектом изобретения является способ лечения заболевания у индивидуума. В одном из вариантов осуществления изобретения способ включает введение индивидууму, имеющему такое заболевание, в терапевтически эффективном количестве иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении. В одном из вариантов осуществления изобретения указанному индивидууму вводят композицию, которая
10 содержит 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 включает также
15 введение индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, например, противоракового средства, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. Следующим объектом изобретения является способ стимуляции иммунной системы у индивидуума, включающий введение индивидууму в эффективном количестве мутантного полипептида
20 IL-2 или иммуноконъюгата 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
25 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 (ЛАК) и т.п.

В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее
30 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,
35 рак предстательной железы, рак крови, рак кожи, плоскоклеточная карцинома, рак кости и рак почки. Другие нарушения клеточной пролиферации, которые можно лечить с использованием иммуноконъюгата, предлагаемого в настоящем изобретении, включают (но не ограничиваясь только ими) неоплазмы, локализованные в: животе, кости, молочной железе, пищеварительной системе, печени, поджелудочной железе,
40 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
45 вариантах осуществления изобретения рак выбирают из группы, включающей рак почки, рак кожи, рак легкого, колоректальный рак, рак молочной железы, рак головного мозга, рак головы и шеи, рак предстательной железы и рак мочевого пузыря. Специалисту в данной области должно быть очевидно, что во многих случаях

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 иммуноконъюгата, которое обеспечивает физиологическое изменение, рассматривается как «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество». Субъект, пациент или индивидиум, нуждающийся в лечении, представляет собой, как правило, млекопитающее, более конкретно человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, в эффективном количестве вводят в клетку. В других вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, вводят в терапевтически эффективном количестве индивидиуму для лечения заболевания.

Для предупреждения или лечения заболевания соответствующая доза

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 молекулы (например, от наличия или отсутствия Fc-домена), серьезности и течения заболевания, от того, вводят ли иммуноконъюгат в превентивных или терапевтических целях, предшествующих или осуществляемых одновременно терапевтических вмешательств, истории болезни пациента и ответа на 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.

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.

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, как правило, следует применять в количестве, эффективном для достижения поставленной цели. При применении для лечения или предупреждения болезненного состояния 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, в частности 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 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 иммуноконъюгатов, представленных в настоящем описании, должно, как правило, обеспечивать терапевтическую пользу, не вызывая существенной токсичности. Токсичность и терапевтическую эффективность иммуноконъюгата можно определять с помощью стандартных фармацевтических процедур на культурах клеток или экспериментальных животных. 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} . Иммуноконъюгаты, имеющие высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными. В одном из вариантов осуществления изобретения 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 ED₅₀, 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 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 должно 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 должны также варьироваться в зависимости от возраста, веса тела и ответа индивидуального пациента.

Максимальную терапевтическую дозу иммуноконъюгата, содержащего мутантный полипептид IL-2, можно повышать по сравнению с дозами, в которых применяют иммуноконъюгат, содержащий IL-2 дикого типа

Другие агенты и варианты лечения

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, при лечении можно вводить в сочетании с одним или несколькими другими агентами. Например, 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 или 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, антиметаболит, 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 иммуноконъюгата, типа нарушения, подлежащего

лечению, и других указанных выше факторов. 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 иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, можно осуществлять до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адъюванта. 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 иммуноконъюгат, 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 иммуноконъюгат, 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.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 схематическое изображение формата иммуноконъюгата IgG-IL-2, содержащего мутантный полипептид IL-2;

на фиг. 2 данные, демонстрирующие связывание PD1-IL2v с CD4 Т-клетками (А) и CD8 Т-клетками (Б) в активированных ФГА РВМС в сравнении с PD1 IgG и CEA-IL2v;

на фиг. 3 - данные о пролиферации NK-клеток (А), CD8 Т-клеток (Б) и CD4 Т-клеток

(В) в PBMC при использовании PD1-IL2v, CEA-IL2v и комбинации PD1 IgG плюс CEA-IL2v. PD1 IgG включали в качестве контроля;

на фиг. 4 данные об активации NK-клеток (А), CD8 Т-клеток (Б) и CD4 Т-клеток (В) в PBMC при использовании PD1-IL2v, CEA-IL2v и комбинации PD1 IgG плюс CEA-IL2v. PD1 IgG включали в качестве контроля. Уровень экспрессии CD25 на NK-клетках, CD4 Т-клетках и CD8 Т-клетках применяли в качестве маркера активации;

на фиг. 5 - данные о пролиферации предварительно активированных ФГА CD8 Т-клеток (А) и CD4 Т-клеток (Б) в PBMC при использовании PD1-IL2v, CEA-IL2v и комбинации PD1 IgG плюс CEA-IL2. PD1 IgG PD1 IgG включали в качестве контроля;

на фиг. 6 - данные об активации предварительно активированных ФГА CD8 Т-клеток (А) и CD4 Т-клеток (Б) в PBMC при использовании PD1-IL2v, CEA-IL2v и комбинации PD1 IgG плюс CEA-IL2. PD1 IgG PD1 IgG включали в качестве контроля. Уровень экспрессии CD25 на NK-клетках, CD4 Т-клетках и CD8 Т-клетках применяли в качестве маркера активации;

на фиг. 7 - данные о пролиферации линии человеческих NK-клеток NK92, индуцированной PD-L1-IL2v, в сравнении с CEA-IL2v (А) или индуцированной PD-L1-IL2v в сравнении с PD1-IL2v (Б), полученные через 2 дня;

на фиг. 8 данные о связывании PD-L1-muIL2v и PD-L1 muIgG1 с позитивной по PD-L1 мышью линии Т-клеток CTLL2;

на фиг. 9 - данные о пролиферации позитивной по PD-L1 мышью линии Т-клеток CTLL2, индуцированной PD1-muIL2v в сравнении с CEA-muIL2v (А), или индуцированной PD1-muIL2v в сравнении с PD-L1-muIL2v (Б), полученные через 3 дня;

на фиг. 10 - результаты эксперимента по оценке эффективности с использованием конъюгатов PD1-IL2v, PD-L1-IL2v или антител к PD1 и PD-L1 в качестве индивидуальных агентов. Применяемую для трансфекции линию клеток карциномы поджелудочной железы Panc02-H7-Fluc инъецировали в поджелудочные железы мышей линии Black 6 для оценки выживаемости с использованием ортотопической сингенной модели опухоли поджелудочной железы;

на фиг. 11 - результаты эксперимента по оценке эффективности с использованием конъюгатов PD1-IL2v, PD-L1-IL2v или антител к PD1 и PD-L1 в качестве индивидуальных агентов. Применяемую для трансфекции линию клеток карциномы поджелудочной железы Panc02-H7-Fluc инъецировали в поджелудочные железы мышей линии Black 6 для оценки выживаемости с использованием ортотопической сингенной модели опухоли поджелудочной железы с помощью биолюминесценции;

на фиг. 12 - данные о способности CD4 Т-клеток секретировать IL-2 (А), IL-2 и IFN- γ (Б) или IFN- γ (В) после 48 ч бустер-обработки иммуногенным белком pp65 CMV в присутствии либо только антитела к PD-1 или к PD-L1 в комбинации с IL-2v, либо в виде слитых белков;

на фиг. 13 данные о статусе дифференцировки вирусоспецифических CD4 Т-клеток, секретирующих только IL-2 (А), и IL-2, и IFN- γ (Б) или только IFN- γ (В и Г) после 48 ч бустер-обработки иммуногенным белком pp65 CMV в присутствии либо только антитела к PD-1 или к PD-L1, либо в комбинации с IL-2v, либо в виде слитых белков;

на фиг. 14 - результаты конкурентного анализа связывания антител к PD1 и PD1-IL2v с активированными каноническими и регуляторными Т-клетками. Представлены данные об изменении частоты связывания на T_{conv}-клетках в сравнении с T_{reg}-клетками (фиг. 14А) и связывания с T_{conv}- и T_{reg}-клетками (фиг. 14Б);

на фиг. 15 данные о реверсии подавления T_{reg}-клетками T_{conv}-клеток с помощью

PD1-IL2v. Представлены данные о проценте подавления T_{reg} -клетками гранзима В (фиг. 15А) и интерферона- γ (фиг. 15Б), секретируемых T_{conv} , после совместного культивирования в течение 5 дней;

на фиг. 16 - результаты эксперимента по оценке эффективности, позволяющие сравнивать действие антител muPD1-IL2v с muFAP-IL2v и muPD-1 при их применении в качестве индивидуальных агентов и в комбинации;

на фиг. 17 - результаты эксперимента по оценке эффективности, позволяющие сравнивать действие muPD1-IL2v с FAP-IL2v, muPD1 и их комбинаций;

на фиг. 18А и 18Б - иммуногистохимические изображения опухолей поджелудочных желез, окрашенных антителом к мышиному CD3 (фиг. 18А), и результаты количественного анализа Т-клеток (фиг. 18Б);

на фиг. 19 - иммуногистохимические изображения опухолей поджелудочных желез, окрашенных антителом к мышиному PD1;

на фиг. 20 - иммуногистохимические изображения опухолей поджелудочных желез, окрашенных антителом к мышиному ICOS;

на фиг. 21 - результаты эксперимента по оценке эффективности, позволяющие сравнивать действие muPD1-IL2v с FAP-IL2v и muPD1 в качестве индивидуальных агентов и их комбинаций;

на фиг. 22 - результаты эксперимента по оценке эффективности, позволяющие сравнивать действие muPD1-IL2v с FAP-IL2v, muPD1 и их комбинаций с использованием двух различных доз;

на фиг. 23 - иммуногистохимические изображения опухолей поджелудочных желез, окрашенных антителом к мышиному CD3;

на фиг. 24А и 24Б - иммуногистохимические изображения опухолей поджелудочных желез, окрашенных антителом к мышиному CD8 (фиг. 24А), и результаты количественного анализа Т-клеток (фиг. 24Б);

на фиг. 25А и 25Б - иммуногистохимические изображения опухолей поджелудочных желез, окрашенных антителом к гранзиму В (фиг. 25А), и результаты количественного анализа площади маркера гранзима В (фиг. 25Б);

на фиг. 26А и 26Б - иммуногистохимические изображения опухолей поджелудочных желез, окрашенных антителом к мышиному PD1 (фиг. 26А), и результаты количественного анализа PD1-позитивных клеток (фиг. 26Б);

на фиг. 27 А-Г данные о способности CD4 Т-клеток секретировать IL-2 (А), IL-2 и IFN- γ (Б) или IFN- γ (В) и способности к пролиферации (Г) после 48 ч бустер-обработки иммуногенным белком pp65 CMV в присутствии либо только антитела к PD-1, либо в комбинации с IL-2v, либо в виде слитого белка;

на фиг. 28 данные о статусе дифференцировки на основе экспрессии CD45RO и CD62L вирусспецифических CD4 Т-клеток, секретирующих IFN- γ , после 48 ч бустер-обработки иммуногенным белком pp65 CMV в присутствии либо только антитела к PD-1, либо в комбинации с IL-2v, либо в виде слитого белка;

на фиг. 29А-Г - результаты 8TAT5-анализа на покоеющихся РВМС первого донора (CD8 Т-клетки (А), NK-клетки (Б), CD4 Т-клетки (В) и регуляторные Т-клетки (Г));

на фиг. 30А-Г результаты анализа STAT5 на покоеющихся РВМС второго донора (CD4 Т-клетки (А), CD8 Т-клетки (Б), регуляторные Т-клетки (В) и NK-клетки (Г));

на фиг. 31А-Г - результаты анализа STAT5 на покоеющихся РВМС третьего донора (CD8 Т-клетки (А), NK-клетки (Б), CD4 Т-клетки (В) и регуляторные Т-клетки (Г));

на фиг. 32А-Г результаты анализа STAT5 на покоеющихся РВМС четвертого донора (CD8 Т-клетки (А), NK-клетки (Б), CD4 Т-клетки (В) и регуляторные Т-клетки (Г)).

Аминокислотные последовательности

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
5	PD-1, минимальный HVR-H1	1
	PD-1, минимальный HVR-H2	2
10	PD-1, минимальный HVR-H3	3
	PD-1, минимальный HVR-L1	4
15	PD-1, минимальный HVR-L2	5
	PD-1, минимальный HVR-L3	6

20

25

30

35

40

45

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
фрагмент FR-НЗ (RDN в положениях 71-73 по Кэботу)	RDN	7
PD-1, HVR-H1	GFSFSSY	8
PD-1, HVR-H2	GGR	9
PD-1, HVR-H3	TGRVYFALD	10
PD-1, HVR-L1	SESVDTSDNSF	11
PD-1, HVR-L2	RSS	12
PD-1, HVR-L3	NYDVPW	13
PD-1, VH (1, 2, 3, 4)	EVQLLESgggLVQPGGSLRLScaasGFSfssytmswvrQAPGKglewVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNskNTLYLQMNSLraEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGTLVTVSS	14
PD-1, VL (1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIHWYQKPGQSPKLLIYRSSTLESgVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	15
PD-1, VL (2)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASESVDTSDNSFIHWYQQRPGQSPRLIYRSSTLESgVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	16
PD-1, VL (3)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDNSFIHWYQKPGQSPRLIYRSSTLESgIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	17
PD-1, VL (4)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDNSFIHWYQKPGQSPRLIYRSSTLESgIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	18
человеческий IL-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	19
человеческий IL-2 (T3A, F42A, Y45Y, L72G, C125A)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	20
линкер	GGGGSGGGSGGGGS	21
PD-1 IL2v – HC с IL2v (Fc-цепь с «выступом», LALAPG)	evqllesgggLVQPGGSLRLScaasGFSfssytmswvrQAPGKglewVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNskNTLYLQMNSLraEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGTLVTVSSastkgpsvflapsskstsggtaalgclvkdyfepvvtswngaltsgvhtfpavLqssgLYslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalgapiektiskakgqprepvytlppcrdeltknqvsLwclvkgfypsdiavewesngqpennyktpvpLdsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsLspggggsgggsggggsapassstktqlqlehlldlqmilnginnyknpkltrmltakfampkkatelkhlqcleelkpleevlngaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfaqsiistlt	22
PD-1 IL2v – HC без IL2v (Fc-цепь с «впадиной», LALAPG)	evqllesgggLVQPGGSLRLScaasGFSfssytmswvrQAPGKglewVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNskNTLYLQMNSLraEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGTLVTVSSastkgpsvflapsskstsggtaalgclvkdyfepvvtswngaltsgvhtfpavLqssgLYslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalgapiektiskakgqprepvytlppsrdeLtknqvslscavkgfypsdiavewesngqpennyktpvpLdsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsLsp	23

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
5	PD-1 IL2v – HC без IL2v (Fc-цепь с «впадиной», LALAPG, HYRF)	24
10	PD-1 IL2v – LC	25
	hIL-2 сигнальный пептид	26
15	hPD-1 (без сигнальной последовательности)	27
20	hPD-1 (с сигнальной последовательностью)	28
25	человеческий IL-2 (C125A)	29
30	человеческий IgG1, Fc-домен	30
35	человеческая каппа-цепь, CL домен	31
	человеческая лямбда-цепь, CL-домен	32
40	человеческий IgG1, константная область тяжелой цепи (CH1-CH2-CH3)	33

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
5	мышинный аналог PD-1 IL2v – HC с IL2v	34
10	мышинный аналог PD-1 IL2v – HC без IL2v	35
15	мышинный аналог PD-1 IL2v – LC	36
20	PD-L1 IL2v – HC с IL2v (Fc-цепь с «выступом», LALAPG)	37
25	PD-L1 IL2v – HC без IL2v (Fc-цепь с «впадиной», LALAPG)	38
30	PD-L1 IL2v – LC	39
35		
40		
45		

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
5 10	мышинный аналог PD-L1 IL2v – HC с IL2v EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKG LEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARRHWPGGFDYWGGTGLVTVSAAKTTPPSVYPLAP GSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVL QSDLYTLSSSVTPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC GCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTTPKVT CVVVAISKDDPE VQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNG KEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD KVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYF VYSDLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGGG GGSGGGGGSGGGGSAPASSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQQHLLEQL LMDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTAKFALPKQATELKDLQCLE DELGPLRHVLDGTQSKSFQLEDAENFISNIRVT VVKLKGSDNTFE CQFDDESATVVDFLRRWIAFAQSIISTSPQ	40
15 20	мышинный аналог PD-L1 IL2v – HC без IL2v EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKG LEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARRHWPGGFDYWGGTGLVTVSAAKTTPPSVYPLAP GSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVL QSDLYTLSSSVTPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC GCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTTPKVT CVVVAISKDDPE VQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNG KEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKQMAKD KVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKT DGSYF VYKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSP	41
25	мышинный аналог PD-L1 IL2v – LC DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YLYHPATFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFL NNFYPKDINVKWKIDGSEKNGVLSWTDQDSKSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCETHKTSTSPIVKSFNRECE	42
30	hPD-1, внеклеточный домен (ECD) PGWFLDSPDRPWNPPFTSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESVL NWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRTVQLPNGRDFHM SVVRARRNDSGT YLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPT AHPSPSPRPAGQFQTLV	43
35 40	muCEA HC-Fc (DD)-muIL2v QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQ GLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRLSLR SDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVSSAKTTPPSV YPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSQT VTCNVAHPASSTKVDKKI VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTTPKVT CVVVAIS KDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQINSTFRSVSELPIMHQD WLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQ MAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDT DGSYFVYSDLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHS PGGGGGSGGGGGSGGGGSAPASSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQQ HLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTAKFALPKQATELKDL QCLEDELGPLRHVLDGTQSKSFQLEDAENFISNIRVT VVKLKGSD NTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFAQSIISTSPQ	44

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
5	muCEA HC-Fc (KK)-muIL2v	45
10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTEFGMNWVRQAPGQ GLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLR SDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSAKTTPPSV YPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSQVTCNVAHPASSTKVDKKI VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVT CVVVAIS KDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQD WLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQ MAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKT DGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHS PGK	
15	muCEA LC	46
	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASAAVGTYYVAWYQQKPGKAP KLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQ YYTYPLFTFGQGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFL LNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCETHKTSTSPIVKSFNRECE	
20	muFAP HC-Fc (DD)-muIL2v	47
25	EVQLLESGLGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVT VSSAKTTPPSVYPLAPGS AAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD LYTLSSSVTPSSTWPSQVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGC KPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVT CVVVAISKDDPEVQ FSWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKE FKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKV SLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYFVY SDLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGGGGGS GGGGSGGGGSAPASSSTSSSTAEAAQQQQQQQQQQQHLEQLLM DLQELLSRMENYRNKLPRMLTAKFALPKQATELKDLQCLEDEL GPLRHVLDGTQSKSFQLEDAENFISNIRVT VVKLKGSDNTFECQF DDESATVVDLRRWIAFAQSIISTSPQ	
30	muFAP HC-Fc (KK)	48
	EVQLLESGLGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVT VSSAKTTPPSVYPLAPGS AAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD LYTLSSSVTPSSTWPSQVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGC KPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVT CVVVAISKDDPEVQ FSWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKE FKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKV SLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK	
35	muFAP LC	49
	EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAP RLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ GIMLPPTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFL NNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCETHKTSTSPIVKSFNRECE	
40	анти-muPD1- HC_mIgG2a- LALAPG	50
45	EVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITSSYRWNVIRKFPNGR LEWMGYINSAGISNYPNPSLKRISITRDT SKNQFFLQVNSVTTEDA ATYYCARSDNMGTTPFTYWGQGLVT VSSASTTAPSVYPLAPVC GDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD LYTLSSSVTPSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKP CPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSED DPDVQISWVFNNEVHTAQTKTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDW MSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEM TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSD GSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFRT GK	

	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
анти-muPD1-LC	DIVMTQGTLPNPVPSGESVSITCRSSKSLLYSDGKTYLNWYLQRP GQSPQLLIYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGI YYCQQGLEFPTFGGGTKLELKRITDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV VCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKSTYSMS STLTTLTKDEYERHNSYTCETHKTSTSPIVKSFNREK	51

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

Пример 1А. Получение слитых белков PD1-IL2v

Кассету экспрессии для слитого белка тяжелая цепь антитела - интерлейкин-2 (IL-2) [вариабельная область тяжелой цепи антитела к человеческому PD-1, тяжелая цепь человеческого IgG₁ (несущая мутации L234A, L235A и P329G (EU-нумерация) для элиминации эффекторных функций и мутации S354C и T366W (EU-нумерация) для гетеродимеризации («выступ»)), линкер (G₄S)₃ и человеческий IL-2v (несущий мутации T3A, F42A, Y45A, L72G и C125A)], кассету экспрессии для тяжелой цепи антитела [вариабельная область тяжелой цепи антитела к человеческому PD-1 и тяжелая цепь человеческого IgG₁ (несущая мутации L234A, L235A и P329G (EU-нумерация) для элиминации эффекторных функций, мутации Y349C, T366S, L368A и Y410V (EU-нумерация) для гетеродимеризации («впадина») и необязательно мутации H435R и Y436F (EU-нумерация)] и кассету экспрессии для легкой цепи антитела [вариабельная область легкой цепи антитела к человеческому PD-1 и константная область человеческой C_{каппа}] получали с помощью синтеза генов.

Каждую из них клонировали путем расщепления HindIII и NheI в экспрессионном векторе под контролем CMV-промотора, за которым располагался интронА, и, в завершении, поли(А)-сигнал BGH. Вектор дополнительно содержал ген, обуславливающий устойчивость бактерий к ампициллину, и сайт инициации репликации из E. coli.

Слитый белок человеческий PD1-IL-2v (SEQ ID NO: 22, 24 и 25) создавали путем совместной трансфекции HEK293E-клеток (фирма Invitrogen) описанными выше векторами в соотношении 1:1:1 во встряхиваемых колбах. Через 1 неделю супернатант собирали и фильтровали через стерильные фильтры.

Слитый белок очищали из супернатанта путем объединения аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Полученный продукт характеризовали в отношении идентичности с помощью масс-спектрометрии и в отношении свойств, таких как чистота, с помощью капиллярного электрофореза (КЭ-ДСН), содержание мономера и стабильность.

Аналогичным образом получали слитый белок мышинный аналог PD1-IL2v (SEQ ID NO: 34-36). Молекула-аналог содержала антитело к мышинному PD-1 в виде мышинного IgG1 (несущего мутации Fc для элиминации эффекторной функции и гетеродимеризации) и мышинный интерлейкин-2 с мутациями, аналогичными человеческой молекуле.

Оба слитых белка удалось получать с высокими выходами, и они были стабильными.

Пример 1Б. Получение слитых белков PD-L1-IL2v

Кассету экспрессии для слитого белка: тяжелая цепь антитела - интерлейкин-2 (IL-2)

[вариабельная область тяжелой цепи антитела к человеческому PD-1, тяжелая цепь человеческого IgG₁ (несущая мутации L234A, L235A и P329G (EU-нумерация) для элиминации эффекторных функций и мутации S354C и T366W (EU-нумерация) для гетеродимеризации («выступ»)), линкер (G₄S)₃ и человеческий IL-2v (несущий мутации T3A, F42A, Y45A, L72G и C125A)], кассету экспрессии для тяжелой цепи антитела [вариабельная область тяжелой цепи антитела к человеческому PD-L1 и тяжелая цепь человеческого IgG₁ (несущая мутации L234A, L235A и P329G (EU-нумерация) для элиминации эффекторных функций, мутации Y349C, T366S, L368A и Y410V (EU-нумерация) для гетеродимеризации («впадина») и необязательно мутации H435R и Y436F (EU-нумерация)] и кассету экспрессии для легкой цепи антитела [вариабельная область легкой цепи антитела к человеческому PD-L1 и константная область человеческой C_{каппа}] получали с помощью синтеза генов. Экспрессия антитела находилась под контролем химерного промотора MPSV и синтетическая сигнальная поли(A)-последовательность была локализована на 3'-конце CDS. Кроме того, каждый вектор включал OriP-последовательность EBV.

Молекулы получали путем совместной трансфекции клеток HEK293-EBNA, растущих в суспензии, с экспрессионными векторами для клеток млекопитающих с использованием полиэтиленimina. Клетки трансфектировали соответствующими экспрессионными векторами в соотношении 1:1:2 («вектор тяжелой цепи (VH-CH1-CH2-CH3-IL2v)»: «вектор тяжелой цепи (VH-CH1-CH2-CH3)»: «вектор легкой цепи (VL-CL)»).

Для трансфекции клетки HEK293 EBNA культивировали в суспензии в бессывороточной культуральной среде Excell, содержащей 6 мМ L-глутамин, и в культуральной среде, содержащей 250 мг/л G418. Для получения в 600-миллилитровые колбы TubeSpin (максимальный рабочий объем 400 мл) засевали 600 млн клеток HEK293-EBNA за 24 ч до трансфекции. Для трансфекции клетки центрифугировали в течение 5 мин при 210 × g и супернатант заменяли 20 мл предварительно нагретой среды CD CHO. Экспрессионные векторы смешивали в 20 мл среды CD CHO до достижения конечного количества ДНК 400 мкг. После добавления 1080 мкл раствора ПЭИ (2,7 мкг/мл) смесь интенсивно перемешивали в течение 15 с и затем инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки смешивали с раствором ДНК/ПЭИ, переносили в 600-миллилитровую колбу TubeSpin и инкубировали в течение 3 ч при 37°C в инкубаторе в атмосфере с 5% CO₂. После инкубации добавляли 360 мл среды Excell, дополненной 6 мМ L-глутамином, 5 г/л соевого пептида (PEPSOY) и 1,0 мМ VPA (вальпроевая кислота), и клетки культивировали в течение 24 ч. Через 1 день после трансфекции добавляли 7% Feed 7. После культивирования в течение 7 дней супернатант собирали для очистки центрифугированием в течение 20-30 мин при 3600 × g (центрифуга Sigma 8K), раствор стерилизовали фильтрацией (0,22 мкм-фильтр) и добавляли и азид натрия в конечной концентрации 0,01% (мас./об.). Раствор выдерживали при 4°C.

Конструкцию человеческого PD-L1-IL2v (SEQ ID NO: 37-39) очищали с помощью одной стадии аффинной хроматографии с использованием белка A (MabSelectSure, фирма GE Healthcare) с последующей геле-фильтрацией (HiLoad 16/60 Супердекс 200, фирма GE Healthcare). Для осуществления аффинной хроматографии супернатант вносили в колонку HiTrap ProteinA HP (CV = 5 мл, фирма GE Healthcare), уравновешенную 25 мл буфера, содержащего 20 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, pH 7,5. Несвязанный белок удаляли путем промывки буфером, содержащим 20 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, pH 7,5, используя его в объеме, кратном по меньшей 10 объемам колонки, а требуемый белок элюировали с использованием буфера,

содержащего 20 мМ цитрат натрия, 100 мМ хлорид натрия, 100 мМ глицин, 0,01% Твин20, pH 3, используя его в объеме, кратном 6 объемам колонки. Белковый раствор нейтрализовали путем добавления 1/10 0,5М раствора фосфата натрия, pH 8,0.

Требуемый белок концентрировали и фильтровали перед внесением в колонку HiLoad Супердекс 200 (фирма GE Healthcare), уравновешенную буфером, содержащим 20 мМ гистидин, 140 мМ хлорид натрия, pH 6,0, 0,01% Твин20.

Конструкцию мышинный PD-L1-IL2v (SEQ ID NO: 40-42) очищали аналогичным образом с помощью одной стадии аффинной хроматографии с использованием белка А (MabSelectSure, фирма GE Healthcare) с последующей гель-фильтрацией (HiLoad 16/60 Супердекс 200, фирма GE Healthcare). Для осуществления аффинной хроматографии супернатант смешивали в соотношении 1:1 с 2М глицином, 0,6М NaCl, pH 8,6 и вносили в колонку HiTrap ProteinA HP (CV=5 мл, фирма GE Healthcare), уравновешенную 25 мл буфера, содержащего 1М глицин, 0,3М NaCl, pH 8,6. Несвязанный белок удаляли путем промывки буфером, содержащим 1М глицин, 0,3М NaCl, pH 8,6, используя его в объеме, кратном по меньшей 10 объемам колонки, а требуемый белок элюировали с использованием буфера, содержащего 1М глицин, 0,3М NaCl, pH 4,0 используя его в объеме, кратном 6 объемам колонки. Белковый раствор нейтрализовали путем добавления 1/10 0,5М раствора фосфата натрия, pH 8,0. Требуемый белок концентрировали и фильтровали перед внесением в колонку HiLoad Супердекс 200 (фирма GE Healthcare), уравновешенную буфером, содержащим 20 мМ гистидин, 140 мМ хлорид натрия, pH 6,0, 0,01% Твин20.

Полученный в результате препарат человеческий PD-L1-IL2v содержал 99% мономера (по данным, полученным с использованием колонки для аналитической гель-фильтрации TSKgel G3000 SW XL (фирма Tosoh) в подвижном буфере, содержащем 25 мМ K_2HPO_4 , 125 мМ NaCl, 200 мМ моногидрохлорид L-аргинина, 0,02% (мас./об.) NaN_3 , pH 6,7 при 25°C) и имел 100%-ную чистоту (по данным, полученным с помощью капиллярного электрофореза в присутствии ДСН в невосстанавливающих условиях с использованием системы Caliper LabChip GXII (фирма Caliper lifescience), которую применяли согласно инструкции производителя). Выход продукта составлял 23 мг/л. Анализ методом масс-спектрометрии подтвердил получение в основном правильно собранной молекулы со следовыми количествами (<5%) молекул без интерлейкина-2 (масс-спектрометрию осуществляли с использованием системы Agilent LC-MS (фирма Agilent Technologies) с колонкой NUCLEOGEL RP1000-8, 250 мм × 4,6 мм (фирма MACHEREY-NAGEL GmbH) и градиента ацетонитрил-муравьиная кислота).

Содержание мономера в конструкции мышинный аналог PD-L1-IL2v составляло 96%, чистота была равна 100%, а выход продукта составлял 3,8 мг/л.

Пример 1 В. Получение конструкций: мышинный аналог CEA-IL2v и мышинный аналог FAP-IL2v

Создавали мураинизированную суррогатную (являющуюся аналогом) молекулу таргетированного на CEA варианта иммуноцитокина IL-2, CEA-IL2v, обозначенную как muCEA-muIL2v (обозначенную также как muCEA-IL2v), для применения на моделях опухолей in vivo, созданных в полностью иммунокомпетентных мышах, для того, чтобы снижать образование антител к лекарственным средствам (ADA). Кроме того, создавали соответственно мураинизированную химерную версию таргетированного на FAP варианта иммуноцитокина IL-2, FAP-IL2v, обозначенную как muFAP-muIL2v (обозначенную также как muFAP-IL2v), для применения на моделях опухолей in vivo, созданных в полностью иммунокомпетентных мышах, для того, чтобы снижать образование антител к лекарственным средствам (ADA). В мураинизированных

суррогатных молекулах мутации «выступ-во-впадины» в Fc-домене заменяли DDKK-мутациями в muIgG1, а мутации LALA P329G заменяли мутациями DAPG в muIgG1 (согласно описанному в заявке PCT WO 2016/0330350 A1, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

Например, конструкция muCEA-muIL2v характеризовалась следующими особенностями. В качестве родительского антитела применяли человеческое-мышинное химерное антитело IgG₁-подкласса с человеческими (гуманизированными) переменными областями, но с мышинными константными областями. Во избежание потенциальной иммуногенности применяли соответствующий аллотип Black 6 (последовательность, опубликованная в рамках проекта по исследованию мышинного генома (Mouse Genomes Project)). Связывание с muIL2R α аннулировали с помощью трех мутаций, гомологичных мутациям, идентифицированным в человеческом IL-2v, и удаляли соответствующий сайт О-гликозилирования: T23A (O-Glyco), F76A, Y79A, L106G. Кроме того, аналогично альдеслейкину, остаток цистеина подвергали мутации во избежание агрегации с помощью мутации C160A (нумерация на основе UniProt ID P04351, включая сигнальный пептид). Хотя muIgG1 уже обладал пониженной способностью связываться с Fc γ R, связывание с мышинными Fc γ R полностью аннулировали путем интродукции мутаций DAPG (D265A, P329G), при этом сохраняли связывание с muFcRn. muIL-2v сливали через неиммуногенный (G₄S)₂-коннектор только с C-концом одной тяжелой цепи антитела muIgG1. Для достижения этого конструировали иммуноцитокин с использованием эффекта электростатического взаимодействия, обеспечиваемого посредством мутаций DDKK в Fc-домене, для обеспечения гетеродимеризации в мышинном каркасе.

Ниже представлены полипептидные последовательности muCEA-muIL2v:

Тяжелая цепь с мутацией DD и слитая с muIL2v (SEQ ID NO: 44):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWI
 NTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYY
 VEAMDYWGQGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEP
 VTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASS
 TKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVAISKD
 DPEVQFSWVFDVDEVHTAQTTPREEQINSTRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRV
 NSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITV
 EWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYFVYSDLVNQSKEAGNTFTCSVLHEG
 LHNHHTEKSLSHSPGGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTSSSTAEAAQQQQQQQQQ
 QQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRMLTAKFALPKQATELKDLQCLEDE
 LGPLRHVLDGTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVV
 DFLRRWIAFAQSIISTSPQ.

Тяжелая цепь с мутацией KK (SEQ ID NO: 45):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWI
 NTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYY

VEAMDYWGQGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEP
 VVTWTNSSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASS
 TKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVAISKD
 5 DPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRV
 NSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITV
 EWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEG
 10 LHNHHTTEKSLSHSPGK.

Легкая цепь (SEQ ID NO: 46):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYR
 KRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKR
 15 ADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS
 WTDQDSKDSYMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK

Ниже представлены полипептидные последовательности muFAP-muIL2v:

Тяжелая цепь с мутацией DD и слитая с muIL2v (SEQ ID NO: 47):

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGS
 GASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNY
 WGQGT LVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWN
 SSSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKI
 25 VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFS
 WVFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFG
 APIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWN
 GQPAENYDNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHT
 30 EKSLSHSPGGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQQQHLE
 QLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTAKFALPKQATELKDLCLEDELGPLRH
 VLDGTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGS DNTFECQFDDESATVVDLRRWI
 35 AFAQSIISTSPQ.

Тяжелая цепь с мутацией KK (SEQ ID NO: 48):

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGS
 GASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNY
 40 WGQGT LVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWN
 SSSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKI
 VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFS
 45 WVFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFG

APIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWN
GQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHT
EKSLSHSPGK.

Легкая цепь (SEQ ID NO: 49):

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRA
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGGQGTKVEIKRAD
AAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWT
DQDSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC.

Ниже представлены полипептидные последовательности μ PD1:

Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 50):

EVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITSSYRWNWIRKFPGNRLEWMGYINS
AGISNYNPSLKRRISITRDTSKNQFFLQVNSVTTEDAATYYCARSDNMGTTPFTY
WGQGLTVTVSSASTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNS
GSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEP
RGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMSISPIVTCVVVDVSEDDPD
VQISWFWNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVN
NKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIY
VEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNW
VERNSYSCSVVHEGLHNHHT TKSFSRTPGK.

Легкая цепь (SEQ ID NO: 51):

DIVMTQGTLNPNVPSGESVSITCRSSKSLLYSDGKTYLNWYLQRPQGQSPQLLIYW
MSTRASGVSDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYYCQQGLEFPTFGGGTKLEL
KRTDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLN
SWTDQDSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

Полученные в этом примере иммуноконъюгаты применяли также в приведенных ниже примерах.

Пример 2

Пример 2А. Связывание PD1-IL2v с активированными CD8- и CD4-Т-клетками

Свежевыделенные РВМС из здоровых доноров стимулировали в течение ночи с помощью CD3 и CD28 для индукции повышающей регуляции PD1 на Т-клетках. РВМС высевали в среду (RPMI1640, 10% FCS, 2 мМ глутамин) в колбы для культуры клеток, которые сенсibilizировали в течение 1 ч при 37°C 1 мкг/мл (антитела к) CD3 (клон ОКТ3, №317304, фирма BioLegend). (Антитело к) CD28 добавляли в раствор к РВМС в концентрации 2 мкг/мл (клон CD28.2, №302914, фирма BioLegend). На следующий день РВМС собирали и переносили в 96-луночный круглодонный планшет (200000 клеток на лунку). Клетки промывали FACS-буфером (3ФР, 2% FBS, 5 мМ ЭДТА, 0,025% NaN₃) и окрашивали, используя по 40 мкл указанных молекул (PD1 IgG, PD1-IL2v и CEA-IL2v) в FACS-буфере в течение 30 мин при 4°C. Клетки промывали дважды FACS-буфером для удаления несвязанных молекул. Затем к клеткам добавляли 40 мкл разведенного меченного РЕ античеловеческого Fc-специфического вторичного антитела

(№109-116-170, фирма Jackson ImmunoResearch). После инкубации в течение 30 мин при 4°C клетки промывали дважды FACS-буфером. Для детекции Т-клеток РВМС окрашивали с использованием 40 мкл смеси CD3, конъюгированного с ФИТЦ (клон UCHT1, №300406, фирма BioLegend), CD4, конъюгированного с APC (клон RPA-T4, №300514, фирма BioLegend), и CD8, конъюгированного с BV421 (клон RPA-T8, №301036, фирма BioLegend), в течение 30 мин при 4°C. Несвязанные антитела удаляли путем промывки дважды FACS-буфером. И, наконец, клетки фиксировали с помощью 1% PFA в FACS-буфере и оценивали с использованием устройства BD Fortessa с установкой дискриминационного окна на CD3⁺CD4⁺ -клетки (CD4 Т-клетки) и CD3⁺CD8⁺ -клетки (CD8 Т-клетки).

Как продемонстрировано на фиг. 2, PD1-IL2v и соответствующий PD1 IgG связывались аналогичным образом с CD4- и CD8- Т-клетками. Аналогичный иммуноцитокин: CEA-IL2v, таргетированный на CEA на опухолевых клетках вместо PD1, служил в качестве «ненацеленного» (нетаргетированного) контроля для сравнения воздействия конструкции на основе только иммуноцитокина IL2v, нетаргетированной на PD1.

Пример 2Б. Активация и пролиферация Т-клеток и NK-клеток с помощью PD1-IL2v

Свежевыделенные РВМС из здоровых доноров инкубировали в течение ночи и затем метили с помощью CFSE (сложный N-сукцинимидиловый эфир 5(6)-карбоксифлуоресцеиндиацетата, №21888, фирма Sigma-Aldrich). В целом, метод состоял в следующем: 30 млн РВМС промывали однократно 3ФР. Параллельно маточный раствор CFSE (2 мМ в ДМСО) разводили в соотношении 1:20 в 3ФР. РВМС ресуспендировали в 30 мл предварительно нагретого 3ФР, добавляли 30 мкл раствора CFSE и клетки немедленно перемешивали. Для оптимального мечения клетки инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем добавляли 10 мл предварительно нагретой среды (RPMI1640, 10% FCS, 1% глутамина) для прекращения реакции мечения. Клетки перемешивали в течение 10 мин при 400 × g и ресуспендировали в 20 мл свежей среды, и инкубировали в течение еще 30 мин при 37°C. И, наконец, клетки однократно промывали средой и ресуспендировали в свежей среде из расчета 1 млн клеток на мл. Меченые РВМС высевали в 96-луночный круглодонный планшет (200000 клеток на лунку) и обрабатывали в течение 5 дней указанными молекулами (PD1-IL2v, CEA-IL2v, PD1 IgG и комбинацией PD1 IgG плюс CEA-IL2v). После инкубации клетки однократно промывали FACS-буфером и окрашивали с использованием 20 мкл смеси CD3 APC/Cy7 (клон UCHT1, №300426, фирма BioLegend), CD56 APC (клон HCH56, №318310, фирма BioLegend), CD4 PE (клон RPA-T4, №300508, фирма BioLegend) и CD25 BV421 (клон M-A251, фирма BioLegend) в FACS-буфере в течение 30 мин при 4°C. Затем РВМС промывали дважды FACS-буфером, после чего их фиксировали с использованием 1% PFA в FACS-буфере и количественно оценивали флуоресценцию с помощью устройства BD Fortessa. Пролиферацию определяли, измеряя разведение CFSE для CD8 Т-клеток (CD3+CD4-), CD4 Т-клеток (CD3+CD4+) и NK-клеток (CD3-CD56+).

Как продемонстрировано на фиг. 3, активность PD1-IL2v оказалась сопоставимой с активностью CEA-IL2v и CEA-IL2v в комбинации с PD1 IgG. PD1 IgG при его индивидуальном применении не обладал активностью в этом эксперименте.

На фиг. 4 продемонстрировано, что PD1-IL2v индуцирует активацию (измеренную по повышающей регуляции CD25) NK-клеток, CD8 Т-клеток и CD4 Т-клеток. Активация, индуцированная CEA-IL2v и комбинацией CEA-IL2v с PD1 IgG, оказалась схожей. PD1 IgG при его индивидуальном применении не индуцировал активацию в этом эксперименте.

Пример 2В. Активация и пролиферация предварительно активированных CD8- и

CD4-Т-клеток с помощью PD1-IL2v

Свежевыделенные РВМС из здоровых доноров метили с помощью CFSE (сложный N-сукцинимидиловый эфир 5(6)-карбоксифлуоресцеиндиацетата, №21888, фирма Sigma-Aldrich). В целом, метод состоял в следующем: 30 млн РВМС промывали однократно 3ФР. Параллельно маточный раствор CFSE (2 мМ в ДМСО) разводили в соотношении 1:20 в 3ФР. РВМС ресуспендировали в 30 мл предварительно нагретого 3ФР, добавляли 30 мкл раствора CFSE и клетки немедленно перемешивали. Для оптимального мечения клетки инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем добавляли 10 мл предварительно нагретой среды (RPMI1640, 10% FCS, 1% глутамина) для прекращения реакции мечения. Клетки перемешивали в течение 10 мин при 400 × g и ресуспендировали в 20 мл свежей среды, и инкубировали в течение еще 30 мин при 37°C. И, наконец, клетки однократно промывали средой и ресуспендировали в свежей среде из расчета 1 млн клеток на мл. Меченные CFSE РВМС предварительно активировали в течение ночи с помощью 1 мкг/мл ФГА (№L8902, фирма Sigma-Aldrich) для индукции повышающей регуляции PD-1 на Т-клетках. На следующий день собирали предварительно активированные РВМС и подсчитывали. Затем РВМС высевали в 96-луночный круглодонный планшет (200000 клеток на лунку) и обрабатывали в течение 4 дней указанными молекулами (PD1-IL2v, CEA-IL2v, PD1 IgG и комбинацией PD1 IgG плюс CEA-IL2v). После инкубации клетки однократно промывали FACS-буфером и окрашивали 20 мкл смеси CD3 APC/Cy7 (клон UCHT1, №300426, фирма BioLegend), CD8 APC (клон SK1, фирма BioLegend) и CD25 BV421 (клон М-А251, фирма BioLegend) в FACS-буфере в течение 30 мин при 4°C. Затем РВМС промывали дважды FACS-буфером, после чего фиксировали их с использованием 1% PFA в FACS-буфере и количественно оценивали флуоресцентность с помощью устройства BD Fortessa. Пролиферацию CD8 Т-клеток (CD3+CD8+) и CD4 Т-клеток (CD3+CD8-) определяли, измеряя разведение CFSE.

На фиг. 5 продемонстрировано, что PD1-IL2v индуцирует пролиферацию активированных ФГА CD8- и CD4-Т-клеток, которые экспрессируют PD-1. Активность оказалась сопоставимой с активностью CEA-IL2v и комбинации CEA-IL2v с PD1 IgG. PD1 IgG при его индивидуальном применении не обладал активностью в этом эксперименте. Никакого дополнительного действия блокирования PD-1 не удалось обнаружить в этом эксперименте, вероятно, из-за отсутствия PD-L1-позитивных опухолевых клеток.

Как продемонстрировано на фиг. 6, PD1-IL2v индуцирует активацию активированных ФГА CD8- и CD4-Т-клеток, которые экспрессируют PD-1 (с использованием экспрессии CD25 в качестве маркера активации). CEA-IL2v и комбинация CEA-IL2v с PD1 IgG индуцировали сопоставимый уровень активации Т-клеток. PD1 IgG при его индивидуальном применении не обладал активностью в этом эксперименте. Никакого дополнительного воздействия блокады PD-1 не удалось обнаружить в этом эксперименте, вероятно, из-за отсутствия PD-L1-позитивных опухолевых клеток.

Пример 2Г. Пролиферация NK92 под воздействием PD1-IL2v и PD-L1-IL2v

NK92-клетки собирали, подсчитывали и оценивали жизнеспособность. Клетки промывали три раза 3ФР для удаления остаточных количеств IL-2 и ресуспендировали в среде (RPMI1640, 10% FCS, 1% глутамина) без IL-2. Промытые NK92-клетки инкубировали в течение 2 ч в инкубаторе для клеток (IL-2-«голодание»). После периода «голодания» клетки ресуспендировали в свежей среде без IL2 до достижения концентрации клеток 200000 на мл и 50 мкл клеточной суспензии переносили в 96-луночный обработанный плоскодонный планшет для культуры клеток и дополняли 50 мкл разведенных антител (в среде без IL-2), пролейкина (конечная концентрация 1,5

мкг/мл) или среды (контрольные лунки) до достижения конечного объема 100 мкл на лунку. Планшет инкубировали в течение 2 дней в инкубаторе. Через 2 дня реагенты CellTiter-Glo (фирма Promega) и планшет для культуры клеток уравнивали до комнатной температура. Раствор CellTiter-Glo приготавливали согласно инструкциям производителя и 100 мкл раствора добавляли в каждую лунку. После 10-минутной инкубации оставшиеся агрегаты ресуспендировали путем пипетирования и 150 мкл смеси переносили в белый плоскодонный планшет. Люминесценцию измеряли с помощью мультимодального ридера Tecan Spark 10M.

На фиг. 7А продемонстрировано, что PD-L1-IL2v индуцирует пролиферацию NK92-клеток столь же эффективно, что и CEA-IL2v. На фиг. 7Б продемонстрировано, что PD-L1-IL2v и PD1-IL2v обладают одинаковой активностью в отношении индукции пролиферации NK92-клеток. NK92-клетки являются PD1-негативными.

Пример 2Д. Связывание PD-L1-IL2v с CTLL2-клетками

Мышиная Т-клеточная линия CTLL2 экспрессирует PD-L1. Эти клетки применяли для тестирования связывания PD-L1-IL2v (мышинный аналог) с PD-L1. Клетки собирали, оценивали жизнеспособность и переносили их в 96-луночный круглодонный планшет (200000 клеток на лунку). Клетки промывали FACS-буфером (3ФР, 2% FBS, 5 мМ ЭДТА, 0,025% NaN₃) и окрашивали с помощью 40 мкл указанных молекул в FACS-буфере в течение 30 мин при 4°C. Клетки промывали дважды FACS-буфером для удаления несвязанных молекул. Затем к клеткам добавляли 40 мкл разведенного конъюгированного с APC антимышиного Fc-специфического вторичного антитела (№115-136-071, фирма Jackson ImmunoResearch). После 30-минутной инкубации при 4°C клетки промывали дважды FACS-буфером. Клетки анализировали с использованием устройства BD LSR Fortessa.

На фиг. 8 продемонстрировано, что PD-L1-IL2v связывается с CTLL2-клетками столь же эффективно, что и соответствующий PD-L1 mIgG1. Эти клетки являются PD1-негативными.

Пример 2Е. Пролиферация СТБ2-клеток под воздействием PD1-IL2v и PD-L1-IL2V

CTLL2-клетки собирали, подсчитывали и оценивали их жизнеспособность. Клетки промывали три раза 3ФР (для удаления остаточных количеств IL-2), ресуспендировали в среде (RPMI1640, 10% FCS, 1% глутамин) без IL-2. и инкубировали в течение 2 ч в инкубаторе для клеток (IL-2-«голодание»). После периода «голодания» клетки ресуспендировали в свежей среде без IL2 до достижения концентрации клеток 200000 на мл и 50 мкл клеточной суспензии переносили в 96-луночный обработанный плоскодонный планшет для культуры клеток. 50 мкл разведенной конструкции мышинный аналог PD1-IL2v, мышинный аналог PD-L1-IL2v, мышинный аналог CEA-IL2v, разведенного пролейкина (конечная концентрация 1,5 мкг/мл) или только среды (все с использованием не содержащей IL-2 среды) добавляли в лунки до достижения конечного объема 100 мкл/лунку. Образцы инкубировали в течение 3 дней в инкубаторе для клеток и пролиферацию оценивали с помощью системы CellTiter-Glo согласно инструкциям производителя. В целом, метод состоял в следующем: 100 мкл реагентов добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 10 мин. Оставшиеся агрегаты ресуспендировали путем пипетирования и 150 мкл смеси переносили в белый плоскодонный планшет. Люминесценцию измеряли с помощью мультимодального ридера Tecan Spark 10M.

На фиг. 9А продемонстрировано, что PD-L1-IL2v индуцирует пролиферацию CTLL2-клеток. Активность оказалась более высокой по сравнению с CEA-IL2v, вероятно, из-за экспрессии PD-L1 на CTLL2-клетках. На фиг. 9Б продемонстрировано также, что

PD1-IL2v индуцирует пролиферацию CTLL2-клеток. Активность оказалась более низкой по сравнению с PD-L1-IL2v, вероятно, из-за того, что эти клетки экспрессируют только PD-L1, но не экспрессируют PD1.

Пример 3

5 In vivo эффективность PD1-IL2v и PD-L1-IL2v на сингенной мышшиной модели опухоли Иммуноконъюгаты (мышшиные аналоги) PD1-IL2v и PD-L1-IL2v тестировали индивидуально и в сравнении с соответствующими антителами к PD1 и PD-L1 в отношении их противоопухолевой эффективности на сингенной модели Panc02-Fluc.

10 Клетки Panc02-H7 (мышшиная карцинома поджелудочной железы) исходно были получены из центра рака MD Anderson (шт. Техас, США) и после размножения депонированы во внутреннем банке клеток фирмы Roche-Glycart. Линию клеток Panc02-H7-Fluc получали в лаборатории заявителей путем трансфекции кальцием и с помощью методов субклонирования. Клетки Panc02-H7-Fluc культивировали в среде RPMI, содержащей 10% FCS (фирма Sigma), 500 мкг/мл гигромицина и 1% Glutamax. Клетки 15 культивировали при 37°C в насыщенной водяным паром атмосфере с 5% CO₂. Для трансплантации применяли пассаж 23. Жизнеспособность клеток составляла 90,4%.

Инъекцировали 1×10^5 клеток на животное в поджелудочные железы мышей линии Black 6, используя 0,3-миллилитровый туберкулиновый шприц (фирма BD Biosciences, 20 Германия). Для этой цели делали небольшой разрез в левой части брюшной области анестезированных мышей. Брюшную стенку открывали, и поджелудочные железы осторожно изымали с помощью пинцета. 10 мкл (1×10^5 клеток Panc02-H7-Fluc в среде RPMI) клеточной суспензии инъекцировали в хвост поджелудочных желез. На брюшную стенку и кожные раны накладывали швы, используя рассасывающийся шовный материал 25 5/0.

Самок мышей линии Black 6, возраст которых в начале эксперимента составлял 10-12 недель (фирма Charles Rivers, Лион, Франция) содержали в свободных от специфических патогенов условиях с суточным циклом 12 ч света/12 ч темноты согласно принятым руководствам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол экспериментального 30 исследования был рассмотрен и одобрен местными органами управления (ZH193/2014). После доставки животных выдерживали одну неделю для акклиматизации к новому окружению и для обследования. Регулярно осуществляли мониторинг состояния здоровья.

35 Мышам инъекцировали внутрь поджелудочных желез в день 0 опыта 1×10^5 клеток Panc02-Fluc, произвольно разделяли на группы и взвешивали. Через 1 неделю после инъекции опухолевых клеток мышам инъекцировали i.v. PD1-IL2v, PD-L1-IL2v или антитела к PD1 и PD-L1, один раз в неделю в течение 4 недель.

40 Всем мышам инъекцировали i.v. 200 мкл соответствующего раствора. Мышам в обработанной наполнителем группе инъекцировали гистидиновый буфер, а мышам из групп обработки (тестируемыми агентами) инъекцировали конъюгаты: мышшиный аналог PD1-IL2v и мышшиный аналог PD-L1-IL2v или соответствующие антитела к PD1 и PD-L1, разведенные по мере необходимости гистидиновым буфером. Количество антител, инъекцированных каждой мышши, в мг /кг, составляло: 1,5 мг/кг PD1-IL2v и PD-L1-IL2v, 10 мг/кг антител к PD1 и PD-L1.

45 На фиг. 10 и в таблице 1 продемонстрировано, что конъюгат PD1-IL2v опосредовал существенно более высокую эффективность с позиции повышенной медианной и общей выживаемости по сравнению со всеми другими тестируемыми индивидуально агентами, включая, что важно отметить, и PD-L1-IL2v.

Таблица 1. Медианная и общая выживаемость мышей линии Black 6, обработанных конъюгатом PD1-IL2v, PD-L1-IL2v, антителом к PD1 или к PD-L1, на сингенной модели опухоли Panc02-Fluc

Группы	Медианная выживаемость в днях	p-значение относительно контроля	Общая выживаемость
muPD1-IL2v	не достигнута	<0,0001***	7/8
muPD-L1-IL2v	43	0,0045*	0/8

Группы	Медианная выживаемость в днях	p-значение относительно контроля	Общая выживаемость
muPD1	58	0,0002**	0/8
muPD-L1	28	0,0985	0/8
наполнитель	24	1	0/8

Для получения биолюминисцентных изображений с помощью системы IVIS® SPECTRUM мышам инъецировали внутривенно 150 мг/кг D-люциферина за 10 мин до регистрации биолюминисцентных изображений (изображений в режиме биолюминесценции) (BLI) и последующей анестезии с помощью 4% изофлурана. Затем мышей переносили в изолированную камеру, которую помещали в устройство IVIS® Spectrum. In vivo регистрацию BLI осуществляли путем регистрации люминесцентного сигнала в течение 10-50 с. Данные запасали в виде излучения (фотоны)/с/см²/стерадиан (sr). In vivo анализ BLI-данных осуществляли с помощью программного обеспечения Living Image® 4.4 и описывали с помощью кривой ингибирования опухоли.

На фиг. 11 продемонстрировано, что PD1-IL2v обладал более высокой эффективностью с позиции снижения биолюминесцентного сигнала (фотоны/с) по сравнению со всеми другими группами, включая, что важно отметить, PD-L1-IL2v. Уже после первой терапевтической обработки в день 7 обнаружено с использованием IVIS® Spectrum снижение биолюминесцентного сигнала в Panc02-Fluc в нескольких группах обработки, но только для PD1-IL2v обнаружено полное отсутствие BLI-сигнала у большинства мышей, и оно сохранялось в течение всего эксперимента, свидетельствуя о полном ответе у 7 из 8 мышей.

Пример 4

Воздействие доставки IL-2v к истощенным вирусспецифическим Т-клетками посредством блокады либо PD-1 или PD-L1

Экспрессия PD-1 впервые описана на истощенных вирусспецифических Т-клетках как результат хронического воздействия вирусных антигенов, и это ассоциировано с неспособностью Т-клеток поддерживать эффективный антивирусный ответ. Вирусспецифические CD4 Т-клетки обладают способностью одновременно секретировать IL-2 и IFN-γ, обеспечивая защиту от вирусной реактивации при хронических инфекциях. Так, полифункциональная сигнатура CD4 Т-клеток ассоциирована с контролем вирусов у здоровых индивидуумов, зараженных цитомегаловирусом (CMV), вирусом Эпштейна-Барра (EBV) и вирусом герпеса простого (HSV), а также у тех индивидуумов, зараженных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), у которых в течение нескольких лет отсутствуют симптомы.

В контексте хронических вирусных инфекций при создании изобретения разработан анализ in vitro для оценки воздействия таргетинга PD-1 и PD-L1 на доставку мутантной версии IL-2 (IL-2v) к антигенспецифическим Т-клеткам с нарушенной функцией. Во

избежание ограничений, связанных с количеством приемлемых для осуществления данного исследования доноров, при создании изобретения был выбран иммуногенный вирусный белок CMV (pp65) в качестве «воскресшего» антигена для Т-клеток, принимая грубо, что 80% популяции является CMV-серопозитивной. Таким образом, при создании изобретения осуществляли стимуляцию моноклеональных клеток периферической крови (РВМС) здорового донора с использованием CMV-pp65 в течение нескольких часов до добавления предлагаемых в изобретении конструкций в концентрации 10 мкг/мл. Через 43 ч блокировали белковый транспорт из аппарата Гольджи, добавляя Golgi Plug (брефелдин А) и Golgi Stop (монензин), и инкубировали клетки при 37°C в течение еще 5 ч. Затем клетки промывали, окрашивали поверхность с помощью антител к человеческим CD3, CD4, CD8, CD62L и CD45RO, после чего фиксировали/пермеабелизировали с помощью Fix/Perm-буфера (фирма BD Bioscience). В завершение осуществляли внутриклеточное окрашивание в отношении IL-2, IFN- γ и Ki67 (обе фирмы eBioscience).

Было установлено, что как PD1-IL2v, так и PD-L1-IL2v, а также комбинация соответствующих антител IgG-типа с IL-2v, повышали до сопоставимых уровней встречаемость полифункциональных (фиг. 12Б) и монофункциональных (IL-2 и IFN- γ) (фиг. 12А и 12В соответственно) CD4 Т-клеток, обеспечивая более высокое действие по сравнению с блокадой антителом к PD-1 и антителом к PD-L1 соответственно. Для размноженных популяций полифункциональных (фиг. 13Б) и монофункциональных по IFN- γ CD4 Т-клеток (фиг. 13В и 13Г) характерен профиль эффекторных клеток-клеток памяти (CD45RO⁺ CD62L⁻) и полностью дифференцированных эффекторных клеток (CD45RO⁻ CD62L⁻). Наоборот, для IL-2-монофункциональных CD4 Т-клеток, индуцированных антагонизмом PD-L1 и дополнительно размноженных путем совместной доставки IL-2v, характерна наивная сигнатура (CD62L⁺ CD45RO⁻) (фиг. 13А).

Было сделано заключение о том, что доставка IL-2v к истощенным CMV-специфическим CD4 Т-клеткам посредством слитого белка PD1-IL-2v приводила к размножению долгоживущей защитной вирусоспецифической популяции, характеризующейся способностью секретировать совместно IL-2 и IFN- γ .

Пример 5

Пример 5А. Преимущественное связывание PD1-IL2v с активированными каноническими Т-клетками по сравнению с активированными регуляторными Т-клетками

Особенности связывания PD1-IL2v с активированными каноническими и регуляторными Т-клетками оценивали с помощью конкурентного анализа связывания. CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} регуляторные Т-клетки (T_{reg}) выделяли с помощью набора для двухступенчатого выделения регуляторных Т-клеток (фирма Miltenyi, №130-094-775). Параллельно выделяли канонические CD4⁺CD25⁻ Т-клетки (T_{conv}), собирая негативную фракцию, полученную при CD25-позитивной селекции (фирма Miltenyi, №130-092-983) с последующим обогащением CD4⁺ (фирма Miltenyi, №130-045-101). T_{conv} метили с помощью CFSE (фирма eBioscience, №65-0850-84), а T_{reg} метили с помощью Cell Trace Violet (фирма ThermoFisher scientific, C34557) для отслеживания пролиферации обеих популяций. T_{conv} и T_{reg} совместно высевали в культуральный планшет, который сенсibilizировали в течение ночи при 4°C 1 мкг/мл CD3 (клон ОКТ3, №317315, фирма

BioLegend). CD28 добавляли в раствор в концентрации 1 мкг/мл CD28 (клон CD28.2, №302923, фирма BioLegend). После стимуляции в течение 5 дней осуществляли анализ связывания с антителами к PD1 (0376) и PD1-IL2v (0590), которые оба метили в лаборатории заявителей с помощью AF647.

5 Для биспецифического антитела PD1-IL2v обнаружен профиль связывания, сопоставимый с профилем связывания для PD1 (фиг. 14А и 14Б). На фиг. 14А продемонстрирована разница частоты встречаемости данного антитела, связанного с T_{conv} , по сравнению с T_{reg} , в одном и том же образце. Каждый символ обозначает отдельного донора, горизонтальными линиями обозначены медианы при $N=4$. Для
10 обеих молекул установлена более высокая способность к связыванию с T_{conv} по сравнению с T_{reg} из-за более высоких уровней экспрессии PD-1 на T_{conv} , чем на T_{reg} (фиг. 14Б; представлены данные, полученные для одного репрезентативного донора, демонстрирующие связывание с T_{conv} (черная линия) и T_{reg} (серая линия)). Таким
15 образом, биспецифическое антитело PD1-IL2v сохраняет способность к связыванию с PD1, несмотря на то, что с антителом сшит IL2v.

Пример 5Б. «Спасение» эффекторной функции T_{conv} после обработки PD1-IL2v в анализе T_{reg} -супрессии

На следующей стадии тестировали, может ли PD1-IL2v реверсировать супрессию
20 T_{conv} , обусловленную T_{reg} . Для этой цели разработали анализ для оценки супрессорной функции, при осуществлении которого T_{conv} и T_{reg} культивировали совместно в течение 5 дней с блокирующими антителами или без них в присутствии $CD4^+ CD25^-$ клеток из неродственного донора для аллоспецифической стимуляции. Для этой цели T_{conv} и T_{reg}
25 выделяли и метили согласно описанному выше методу. Накопление цитокинов в комплексе Гольджи повышали путем применения ингибиторов белкового транспорта (Protein Transport Inhibitors) (GolgiPlug, №555029, фирма BD и GolgiStop, №554724, фирма BD) в течение 5 ч до осуществления FACS-окрашивания.

Оценивали способность пролиферирующих T_{conv} секретировать гранзим В (GrzB;
30 фиг. 15А) и интерферон гамма (IFN γ ; фиг. 15Б) в присутствии T_{reg} и без них.

T_{reg} -супрессию рассчитывали помощью следующей формулы:

$$\% \text{ супрессии цитокина} = 100 - (\% \text{ цитокина}_{T_{conv}+T_{reg} \pm \text{блокирующее антитело}}) / (\% \text{ цитокина}_{T_{conv} \text{ необработанные}}) \times 100),$$

в которой $\% \text{ цитокина}_{T_{conv}+T_{reg} \pm \text{блокирующее антитело}}$ обозначает уровень цитокина, секретированного T_{conv} в присутствии $T_{reg} \pm$ блокирующее антитело, $\% \text{ цитокина}_{T_{conv} \text{ необработанные}}$ обозначает уровень цитокина, секретированного T_{conv} , в отсутствии T_{reg} .
40 На фиг. 15А и 15Б каждый символ обозначает отдельного донора, горизонтальными линиями обозначены медианы при $N=5$, а пунктирными линиями при 0% обозначено отсутствие супрессии T_{reg} -клетками. Р рассчитывали с помощью одностороннего регрессионного анализа (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

На фиг. 15А продемонстрировано, что обработка антителом к PD1 (0376) приводит
45 к получению медианного значения супрессии функции T_{conv} , составляющего 47,7%, по сравнению с медианным значением супрессии в необработанной группе (статически незначимое различие), составляющим 68,6%. Аналогично этому, блокада взаимодействия PD-1/PD-L1 с помощью атезолизумаба, ниволумаба и пембролизумаба характеризуется

такой же тенденцией, что и в случае антитела к PD1. Важно отметить, что DP47-IL2v (медианное значение = -11,3%, $p=0,0011$) и PD1-IL2v (медианное значение = -43,6%, $p<0,0001$) «спасали» эффекторную функцию T_{conv} GrzB от T_{reg} -супрессии. Кроме того, конструкция PD1-IL2v даже с большей достоверностью ($p=0,0026$) обладала более

Параллельно осуществляли такой же анализ для оценки обусловленной Treg супрессии секреции $INF\gamma$ T_{conv} (фиг. 15Б). DP47-IL2v (медианное значение = 51,77%, $p=0,0251$) и PD1-IL2v (медианное значение = 31,23%, $p<0,0001$) «спасали» эффекторную функцию T_{conv} $INF\gamma$ от T_{reg} -супрессии.

Пример 6

In vivo эффективность иммуноконъюгатов PD1-IL2v на сингенной модели, созданной с помощью линий мышинных опухолевых клеток, в сравнении с антителами к PD1 и FAP-IL2v, применяемыми в качестве индивидуальных агентов и в комбинации

Иммуноконъюгат мышинный аналог PD1-IL2v (muPD1-IL2v) тестировали в сравнении с комбинацией мышинного аналога PD1 и мышинного аналога FAP-IL2v (muFAP-IL2v) в отношении их противоопухолевой эффективности на сингенной модели. Применяемая сингенная модель представляла собой сингенную модель Panc02-Fluc, созданную на поджелудочных железах.

Иммуноконъюгат мышинный аналог PD1-IL2v тестировали на мышах линии Black 6, внутрь поджелудочных желез которых инъецировали применяемую для трансфекции мышиную клеточную линию Panc02-Fluc. Клетки Panc02-H7 (мышинная карцинома поджелудочной железы) исходно были получены из центра рака MD Anderson (шт. Техас, США) и после размножения депонированы во внутреннем банке клеток фирмы Roche-Glycart. Линию клеток Panc02-H7-Fluc получали в лаборатории заявителей путем трансфекции кальцием и с помощью методов субклонирования. Клетки Panc02-H7-Fluc культивировали в среде RPMI, содержащей 10% FCS (фирма Sigma), 500 мкг/мл гигромицина и 1% Glutamax. Клетки культивировали при 37°C в насыщенной водяным паром атмосфере с 5% CO₂. Для трансплантации применяли пассаж 23.

Жизнеспособность клеток составляла 87,5%. Инъецировали 1×10^5 клеток на животное в поджелудочные железы мышей линии Black 6, используя 0,3-миллилитровый туберкулиновый шприц (фирма BD Biosciences, Германия). Для этой цели делали небольшой разрез в левой части брюшной области анестезированных мышей Black 6. Брюшную стенку открывали и поджелудочные железы осторожно изымали с помощью пинцета. 10 мкл (1×10^5 клеток Panc02-H7-Fluc в среде RPMI) клеточной суспензии инъецировали в хвост поджелудочных желез. На брюшную стенку и кожные раны накладывали швы, используя рассасывающийся шовный материал 5/0.

Самок мышей линии Black 6, возраст которых в начале эксперимента составлял 10-12 недель (фирма Charles Rivers, Лион, Франция) выдерживали в свободных от специфических патогенов условиях с суточным циклом 12 ч света/12 ч темноты согласно принятым руководствам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол экспериментального исследования был рассмотрен и одобрен местными органами управления (ZH193/2014). После доставки животных выдерживали одну неделю для акклиматизации к новому окружению и для обследования. Регулярно осуществляли мониторинг состояния здоровья.

Мышам инъецировали внутрь поджелудочных желез в день 0 опыта 1×10^5 клеток Panc02-Fluc, животных произвольно разделяли на группы и взвешивали. Через 1 неделю

после инъекции опухолевых клеток мышам инъецировали внутривенно в двух различных дозах PD1-IL2v и сравнивали с комбинацией антител к PD1 и FAP-IL2v один раз в неделю в течение 4 недель.

Всем мышам инъецировали внутривенно 200 мкл соответствующего раствора.

- 5 Мышам в обработанной носителем группе инъецировали гистидиновый буфер, а мышам из групп обработки инъецировали антитела PD1-IL2v (0,5 мг/кг или 1 мг/кг), PD1 (10 мг/кг) и FAP-IL2v (2,5 мг/кг) или комбинацию антител PD1 и FAP-IL2v (10 мг/кг PD1 и 2,5 мг/кг FAP-IL2v). Для получения соответствующего количества иммуноконъюгатов на 200 мкл маточные растворы при необходимости разводили
- 10 гистидиновым буфером, что продемонстрировано в таблице 2.

**Таблица 2. Соединения, дозы, буферы для приготовления формы и
концентрация маточного раствора**

15	Соединение	Доза	Буфер для приготовления формы	Концентрация маточного раствора (мг/мл)
	muPD1-IL2v	10 мкг и 30 мкг	20мМ гистидин, 140мМ NaCl, 0,01% Твин20; pH 6,0	3,63
	muFAP-IL2v	50 мкг	20мМ гистидин, 140мМ NaCl, 0,01% Твин20; pH 6,0	4,91
20	muPD1	200 мкг	20мМ гистидин, 140мМ NaCl, 0,01% Твин20; pH 6,0	5,84

- Для получения биолуминесцентных изображений с помощью системы IVIS® SPECTRUM мышам инъецировали внутрибрюшинно 150 мг/кг D-люциферина за 10 мин до регистрации биолуминесцентных изображений (BLI) и последующей анестезии с
- 25 помощью 4% изофлурана. Затем мышей переносили в изолированную камеру, которую помещали в устройство IVIS® Spectrum. In vivo регистрацию BLI осуществляли путем регистрации люминесцентного сигнала в течение 10-50 с. Данные запасали в виде излучения (фотоны)/с/см²/sr. In vivo анализ BLI-данных осуществляли с помощью программного обеспечения Living Image® 4.4 и описывали с помощью кривой
- 30 ингибирования опухоли.

- Для изучения иммунофармакодинамики с помощью гистологии 3 мышей из каждой группы умерщвляли через 4 дня после первой обработки путем скручивания шеи. Опухоли поджелудочных желез изымали и немедленно фиксировали в 10% формалина. Ткань выдерживали в растворе формалина в течение ночи и затем обрабатывали для
- 35 FFRET-анализа (устройство Leica 1020, Германия). Затем 4-микрометровые парафиновые срезы нарезали с помощью микротомы (устройство Leica RM2235, Германия). Иммуногистохимию для выявления мышинных CD3, PD1 и ICOS осуществляли с помощью автоматической системы окрашивания (автостейнер) Leica (устройство Leica ST5010, Германия) согласно протоколам производителя. Изображения сканировали с помощью
- 40 сканера фирмы Olympus.

- На фиг. 16 продемонстрированы результаты эксперимента по оценке эффективности, позволяющие сравнивать действие антитела, содержащего мышинный аналог PD1-IL2v, с антителом, содержащим мышинный аналог FAP-IL2v, и антителом к мышинному аналогу PD-1, при их применении в качестве индивидуальных агентов и в комбинации.
- 45 Применяемые для трансфекции клетки карциномы поджелудочной железы линии Panc02-N7-Fluc инъецировали в поджелудочные железы мышей Black 6 для изучения выживаемости на ортотопической сингенной модели опухолей поджелудочной железы. Количество антител, инъецированных каждой мышью, в мг/кг составляло: 0,5 и 1 мг/кг

антитела, содержащего мышинный аналог PD1-IL2v, 10 мг/кг антитела к мышинному аналогу PD1 и 2,5 мг/кг антитела, содержащего мышинный аналог FAP-IL2v. Антитела инъецировали внутривенно один раз в неделю в течение 4 недель. Значимо увеличенные медианная и общая выживаемость обнаружены при применении в дозе 0,5 и 1 мг/кг конструкции мышинный аналог PD1-IL2v по сравнению с индивидуальными применением всех других агентов и применением комбинации антитела к мышинному аналогу PD-1 и конструкции мышинный аналог FAP-IL2v. На фиг. 16 и в таблице 3 продемонстрировано, что при применении в обеих дозах конструкция PD1-IL2v опосредовала существенно более высокую эффективность касательно повышенной медианной и общей выживаемости по сравнению с индивидуальными применением всех других агентов и применением комбинации PD1 и FAP-IL2v.

Таблица 3: Медианная и общая выживаемость мышей Black 6, обработанных антителами PD1-IL2v, PD1, FAP-IL2v и комбинацией PD-1 и FAP-IL2v, на сингенной модели опухоли Panc02-Fluc

Группы	Медианная выживаемость в днях	p-значение относительно контроля	Общая выживаемость
muPD1-IL2v (0,5 мг/кг)	не достигнута	<0,0001 ***	4/7
muPD1-IL2v (1 мг/кг)	не достигнута	<0,0001 ***	7/7
muPD1 (10 мг/кг)	63	0,0014 *	0/7
muFAP-IL2v	45	0,0941	0/6
muPD-1 и muFAP-IL2v	75	0,0002 ***	1/7
Наполнитель	37	1	0/6

На фиг. 17 продемонстрированы результаты эксперимента по оценке эффективности, в котором сравнивали мышинный аналог PD1-IL2v с FAP-IL2v, с мышинным аналогом PD1 и их комбинацией. Применяемые для трансфекции клетки карциномы поджелудочной железы линии Panc02-H7-Fluc инъецировали в поджелудочные железы мышей Black 6 для изучения выживаемости на ортотопической сингенной модели опухолей поджелудочной железы с помощью биолюминесценции. Уже на 7-й день после первой обработки было обнаружено с помощью IVIS® Spectrum снижение биолюминесцентного сигнала Panc02-Fluc в нескольких группах обработки, но только при применении PD1-IL2v было обнаружено полное исчезновение BLI-сигнала у большинства мышей, которое сохранялось на протяжении всего эксперимента, свидетельствуя о полном ответе у 4 из 7 мышей из группы, обработанной дозой 0,5 мг/кг, и у 7 из 7 мышей из группы, обработанной дозой 1 мг/кг. На фиг. 17 продемонстрировано, что при использовании в обеих дозах конструкция PD1-IL2v опосредовала наивысшую эффективность с точки зрения снижения биолюминесцентного сигнала (количество фотонов/с) по сравнению с группами, обработанными всеми другими агентами при их индивидуальном применении и в комбинации.

На фиг. 18А и 18Б представлены результаты иммуногистохимической визуализации опухолей поджелудочных желез, окрашенных антителом к мышинному CD3 (фиг. 18А), и результаты количественного анализа Т-клеток (фиг. 18Б). Иммуногистохимическое окрашивание CD3 Т-клеток осуществляли на опухолях поджелудочных желез мышей Black 6, отобранных из указанных групп обработки. Образцы ткани подготавливали для иммуногистохимического окрашивания: опухоли изымали из животных после обработки, фиксировали в 10% формалина (фирма Sigma, Германия) и затем обрабатывали для FFPE-анализа (устройство Leica 1020, Германия). Затем 4-микрометровые парафиновые срезы нарезали с помощью микротомы (устройство Leica

RM2235, Германия). Иммуногистохимию для выявления мышинового CD3 осуществляли с использованием антитела к мышиному CD3 (фирма Diagnostic Biosystem, Германия) с помощью автостейнера Leica (устройство Leica ST5010, Германия) согласно протоколам производителя. Изображения сканировали с помощью сканера фирмы Olympus. Количественную оценку muCD3-позитивных Т-клеток проводили с помощью программного обеспечения Definiens (фирма Definiens, Германия). Статистический анализ осуществляли с помощью одностороннего регрессионного анализа для множественных сравнений. Уже в день 4 дня после первой терапевтической обработки обнаружено значимое увеличение количества CD3-позитивных Т-клеток в обработанных PD1-IL2v группах по сравнению с обработанной наполнителем группой. Тенденция к увеличению количества CD3-позитивных клеток обнаружена также в группе, обработанной комбинацией мышинового аналога PD1 и конструкции мышиный аналог FAP-IL2v, по сравнению с обработанной наполнителем группой, но это различие не было достоверным. На фиг. 18А и 18Б продемонстрировано, что конструкция PD1-IL2v вызывала увеличение инфильтрации CD3 в опухоль поджелудочной железы через 4 дня после первой обработки по сравнению со всеми другими группами.

На фиг. 19 представлены результаты иммуногистохимической визуализации опухолей поджелудочных желез, окрашенных антителом к мышиному PD1. Иммуногистохимическое окрашивание PD1-позитивных Т-клеток осуществляли на опухолях поджелудочных желез мышей Black 6, отобранных из указанных групп обработки. Образцы ткани подготавливали для иммуногистохимического окрашивания: опухоли изымали из животных после обработки, фиксировали в 10% формалина (фирма Sigma, Германия) и затем обрабатывали для FFPET-анализа (устройство Leica 1020, Германия). Затем 4-микрометровые парафиновые срезы нарезали с помощью микротомы (устройство Leica RM2235, Германия). Иммуногистохимию для выявления мышинового PD1 осуществляли с использованием антитела к мышиному PD1 (фирма R&D System, Германия) с помощью автостейнера Leica (устройство Leica ST5010, Германия) согласно протоколам производителя. Изображения сканировали с помощью сканера фирмы Olympus. Уже в день 4 после первой терапевтической обработки обнаружено очень существенное увеличение количества PD1-позитивных Т-клеток в обработанных PD1-IL2v группах по сравнению с обработанной наполнителем группой. Кроме того, умеренное увеличение количества PD1-позитивных клеток обнаружено в группе, обработанной комбинацией мышинового аналога PD1 и мышинового аналога FAP-IL2v, по сравнению с обработанной наполнителем группой. На фиг. 19 продемонстрировано, что конструкция PD1-IL2v вызывала увеличение инфильтрации PD1-позитивных Т-клеток в опухоль поджелудочной железы через 4 дня после первой обработки по сравнению со всеми другими группами.

На фиг. 20 представлены результаты иммуногистохимической визуализации опухолей поджелудочных желез, окрашенных антителом к мышиному ICOS. Иммуногистохимическое окрашивание ICOS-позитивных Т-клеток осуществляли на опухолях поджелудочных желез мышей Black 6, отобранных из указанных групп обработки. Образцы ткани подготавливали для иммуногистохимического окрашивания: опухоли изымали из животных после обработки, фиксировали в 10% формалина (фирма Sigma, Германия) и затем обрабатывали для FFPET-анализа (устройство Leica 1020, Германия). Затем 4-микрометровые парафиновые срезы нарезали с помощью микротомы (устройство Leica RM2235, Германия). Иммуногистохимию для выявления мышинового ICOS осуществляли с использованием антитела к мышиному ICOS (фирма (My Biosource, Германия) с помощью автостейнера Leica (устройство Leica ST5010, Германия) согласно

протоколам производителя. Изображения сканировали с помощью сканера фирмы Olympus. Уже в день 4 дня после первой терапевтической обработки было обнаружено снижение количества ICOS-позитивных Т-клеток в обработанных PD1-IL2v группах по сравнению с обработанной наполнителем группой. На фиг. 20 продемонстрировано, что конструкция PD1-IL2v вызывала пониженную инфильтрации ICOS-позитивных Т-клеток в опухоль поджелудочной железы через 4 дня после первой обработки по сравнению со всеми другими группами.

Пример 7

In vivo эффективность иммуноконъюгатов PD1-IL2v на сингенной модели, созданной с помощью линий мышинных опухолевых клеток, в сравнении с антителами к PD1 и FAP-IL2v (две различные дозы), применяемыми индивидуально и в комбинации

Иммуноконъюгат PD1-IL2v (muPD1-IL2v) тестировали в сравнении с комбинацией мышинного аналога PD1 и мышинного аналога FAP-IL2v (muFAP-IL2v) в двух различных дозах в отношении их противоопухолевой эффективности на одной сингенной модели.

Применяемая сингенная модель представляла собой сингенную модель Panc02-Fluc, созданную на поджелудочных железах. Иммуноконъюгат мышинный аналог PD1-IL2v тестировали на мышах линии Black 6, внутрь поджелудочных желез которых инъецировали применяемую для трансфекции мышиную клеточную линию Panc02-Fluc. Клетки Panc02-H7 (мышинная карцинома поджелудочной железы) исходно были получены из центра рака MD Anderson (шт. Техас, США) и после размножения депонированы во внутреннем банке клеток фирмы Roche-Glycart. Линию клеток Panc02-H7-Fluc получали в лаборатории заявителей путем трансфекции кальцием и с помощью методов субклонирования. Клетки Panc02-H7-Fluc культивировали в среде RPMI, содержащей 10% FCS (фирма Sigma), 500 мкг/мл гидромицина и 1% Glutamax. Клетки культивировали при 37°C в насыщенной водяным паром атмосфере с 5% CO₂. Для трансплантации

применяли пассаж 16. Жизнеспособность клеток составляла 83,3%. Инъецировали 1×10⁵ клеток на животное в поджелудочные железы мышей линии Black 6, используя 0,3-миллилитровый туберкулиновый шприц (фирма BD Biosciences, Германия). Для этой цели делали небольшой разрез в левой части брюшной области анестезированных мышей Black 6. Брюшную стенку открывали и поджелудочные железы осторожно изымали с помощью пинцета. 10 мкл (1×10⁵ клеток Panc02-H7-Fluc в среде RPMI) клеточной суспензии инъецировали в хвост поджелудочных желез. На брюшную стенку и кожные раны накладывали швы, используя рассасывающийся шовный материал 5/0.

Самок мышей линии Black 6, возраст которых в начале эксперимента составлял 10-12 недель (фирма Charles Rivers, Лион, Франция) содержали в свободных от специфических патогенов условиях с суточным циклом 12 ч света/12 ч темноты согласно принятым руководствам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол экспериментального исследования был рассмотрен и одобрен местными органами управления (ZH193/2014). После доставки животных выдерживали одну неделю для акклиматизации к новому окружению и для обследования. Регулярно осуществляли мониторинг состояния здоровья.

Мышам инъецировали внутрь поджелудочных желез в день 0 опыта 1×10⁵ клеток Panc02-Fluc, произвольно разделяли на группы и взвешивали. Через 1 неделю после инъекции опухолевых клеток мышам инъецировали внутривенно PD1-IL2v и сравнивали с комбинацией МАт PD1+FAP-IL2v в двух различных дозах один раз в неделю в течение 4 недель.

Всем мышам инъецировали внутривенно 200 мкл соответствующего раствора. Мышам в обработанной наполнителем группе инъецировали гистидиновый буфер, а мышам из групп обработки (тестируемыми агентами) инъецировали антитела PD1-IL2v (1 мг/кг), PD1 (10 мг/кг) и FAP-IL2v (0,625 мг/кг или 1, 25 мг/кг) или комбинацию антител PD1+FAP-IL2v (10 мг/кг + 1,25 мг/кг или 10 мг/кг + 0,625 мг/кг). Для получения соответствующего количества иммуноконъюгатов на 200 мкл маточные растворы при необходимости разводили гистидиновым буфером, что продемонстрировано в таблице 4.

Таблица 4. Соединения, дозы, буферы для приготовления формы и концентрация маточного раствора

Соединение	Доза	Буфер для приготовления формы	Концентрация маточного раствора (мг/мл)
muPD1-IL2v	10 мкг и 30 мкг	20мМ гистидин, 140мМ NaCl, 0,01% Твин20; pH 6,0	3,63
muFAP-IL2v	50 мкг	20мМ гистидин, 140мМ NaCl, 0,01% Твин20; pH 6,0	4,91
muPD1	200 мкг	20мМ гистидин, 140мМ NaCl, 0,01% Твин20; pH 6,0	5,84

Для получения биолюминисцентных изображений с помощью системы IVIS® SPECTRUM мышам инъецировали внутривенно 150 мг/кг D-люциферина за 10 мин до регистрации биолюминисцентных изображений (изображений в режиме биолюминесценции) (BLI) и последующей анестезии с помощью 4% изофлурана. Затем мышей переносили в изолированную камеру, которую помещали в устройство IVIS® Spectrum. In vivo регистрацию BLI осуществляли путем регистрации люминесцентного сигнала в течение 10-50 с. Данные запасали в виде излучения (фотоны)/с/см²/sr. In vivo анализ BLI-данных осуществляли с помощью программного обеспечения Living Image® 4.4 и описывали с помощью кривой ингибирования опухоли.

Для изучения иммунофармакодинамики с помощью гистологии 3 мышей из каждой группы умерщвляли через 4 дня после первой обработки путем скручивания шеи. Опухоли поджелудочных желез изымали и немедленно фиксировали в 10% формалина. Ткань выдерживали в растворе формалина в течение ночи и затем обрабатывали для FFPE-анализа (устройство Leica 1020, Германия). Затем 4-микрометровые парафиновые срезы нарезали с помощью микротом (устройство Leica RM2235, Германия). Иммуногистохимию для выявления мышинных CD3, CD8, PD1 и гранзима В осуществляли с помощью автоматической системы окрашивания (автостейнер) Leica (устройство Leica ST5010, Германия) согласно протоколам производителя. Изображения сканировали с помощью сканера фирмы Olympus.

На фиг. 21 и в таблице 5 продемонстрированы результаты эксперимента по оценке эффективности, позволяющие сравнивать действие антител muPD1-IL2v с muFAP-IL2v и muPD-1 при их применении индивидуально и в комбинации. Применяемые для трансфекции клетки карциномы поджелудочной железы линии Panc02-H7-Fluc инъецировали в поджелудочные железы мышей Black 6 для изучения выживаемости на ортотопической сингенной модели опухолей поджелудочной железы. Количество антител, инъецированных каждой мышью, в мг/кг составляло: 1 мг/кг muPD1-IL2v, 10 мг/кг muPD1 и 0,625 или 1,25 мг/кг muFAP-IL2v. Антитела инъецировали внутривенно один раз в неделю в течение 4 недель. Значимо самые высокие медианная и общая выживаемость обнаружены при применении в дозе 1 мг/кг muPD1-IL2v по сравнению

с индивидуальным применением всех других агентов и применением комбинации muPD-1 + muFAP-IL2v в обеих изученных дозах. Таким образом, можно сделать заключение о том, что конструкция PD1-IL2v опосредовала наиболее высокую эффективность с точки зрения повышенной медианной и общей выживаемости по сравнению с индивидуальным применением всех других агентов и применением комбинаций PD1 + FAP-IL2v в обеих изученных дозах.

Таблица 5: Медианная и общая выживаемость мышей Black 6, обработанных PD1-IL2v, PD1, FAP-IL2v и комбинацией антител PD-1 и FAP-IL2v на сингенной модели опухоли Panc02-Fluc

Группы	Медианная выживаемость в днях	p-значение относительно контроля	Общая выживаемость
Наполнитель	30	1,0000	0/6
1 мг/кг muPD-1-IL2v	Не достигнута	<0,0001***	6/6
10 мг/кг muPD1 + 0,625 мг/кг muFAP-IL2v	62	0,0053*	1/6
10 мг/кг muPD1 + 1,25 мг/кг muFAP-IL2v	86	0,0005**	0/6
0,625 мг/кг muFAP-IL2v	36	0,2607	0/6

Группы	Медианная выживаемость в днях	p-значение относительно контроля	Общая выживаемость
1,25 мг/кг muFAP-IL2v	31	0,6834	0/6
10 мг/кг muPD1	48	0,0005**	0/6

На фиг. 22 представлены результаты эксперимента по оценке эффективности, в котором сравнивали muPD1-IL2v с FAP-IL2v, muPD1 и их комбинации, применяемые в двух различных дозах. Применяемые для трансфекции клетки карциномы поджелудочной железы линии Panc02-H7-Fluc инъецировали в поджелудочные железы мышей Black 6 для изучения выживаемости на ортотопической сингенной модели опухолей поджелудочной железы с помощью биолюминесценции. В процессе всего опыта снижение биолюминесцентного сигнала определяли с помощью IVIS® Spectrum в нескольких группах обработки, но только при лечении с помощью muPD1-IL2v обнаружено полное исчезновение BLI-сигнала у всех мышей, что сохранялось на протяжении всего эксперимента, свидетельствуя о полном ответе у всех 6 мышей. На фиг. 22 продемонстрировано, что конструкция PD1-IL2v опосредовала наивысшую эффективность с точки зрения снижения биолюминесцентного сигнала (количество фотонов/с) по сравнению с группами, обработанными всеми другими агентами индивидуально и в комбинации.

На фиг. 23 представлены результаты иммуногистохимической визуализации опухолей поджелудочных желез, окрашенных антителом к мышинному CD3.

Иммуногистохимическое окрашивание CD3 Т-клеток осуществляли на опухолях поджелудочных желез мышей Black 6, отобранных из указанных групп обработки. Образцы ткани подготавливали для иммуногистохимического окрашивания следующим образом: опухоли изымали из животных после обработки, фиксировали в 10%

формалина (фирма Sigma, Германия) и затем обрабатывали для FFPET-анализа (устройство Leica 1020, Германия). Затем 4-микрометровые парафиновые срезы нарезали с помощью микротомы (устройство Leica RM2235, Германия). Иммуногистохимию для выявления мышинового CD3 осуществляли с использованием антитела к мышинному CD3 (фирма Diagnostic Biosystem, Германия) с помощью автостейнера Leica (устройство Leica ST5010, Германия) согласно протоколам производителя. Изображения сканировали с помощью сканера фирмы Olympus. Уже в день 4 дня после первой терапевтической обработки обнаружено очень большое увеличение количества CD3-позитивных Т-клеток в обработанных μ PD1-IL2v группах по сравнению с обработанной наполнителем группой. Кроме того, умеренное увеличение количества CD3-позитивных клеток обнаружено во всех других повергнутых терапевтической обработке группах, по сравнению с обработанной наполнителем группой. На фиг. 23 продемонстрировано, что конструкция PD1-IL2v вызывала повышение инфильтрации CD3-позитивных Т-клеток в опухоль поджелудочной железы через 4 дня после первой терапевтической обработки по сравнению со всеми другими группами.

На фиг. 24А и 24Б и в таблице 6 представлены результаты иммуногистохимической визуализации опухолей поджелудочных желез, окрашенных антителом к мышинному CD8 (фиг. 24А), и результаты количественного анализа Т-клеток (фиг. 24Б).

Иммуногистохимическое окрашивание CD8 Т-клеток осуществляли на опухолях поджелудочных желез мышей Black 6, отобранных из указанных групп обработки. Образцы ткани подготавливали для иммуногистохимического окрашивания: опухоли изымали из животных после обработки, фиксировали в 10% формалина (фирма Sigma, Германия) и затем обрабатывали для FFPET-анализа (устройство Leica 1020, Германия). Затем 4-микрометровые парафиновые срезы нарезали с помощью микротомы (устройство Leica RM2235, Германия). Иммуногистохимию для выявления мышинового CD8 осуществляли с использованием антитела к мышинному CD8 (фирма Serotec, Германия) с помощью автостейнера Leica (устройство Leica ST5010, Германия) согласно протоколам производителя. Изображения сканировали с помощью сканера фирмы Olympus. Количественную оценку μ CD8-позитивных Т-клеток проводили с помощью программного обеспечения Definiens (фирма Definiens, Германия). Статистические характеристики анализировали с помощью одностороннего регрессионного анализа для множественных сравнений. Уже в день 4 дня после первой терапевтической обработки обнаружено значимое увеличение количества CD8-позитивных Т-клеток в обработанных μ PD1-IL2v группах по сравнению со всеми другими группами. Тенденция к увеличению количества CD8-позитивных клеток обнаружено также во всех обработанных терапевтическими агентами изученных группах, но это различие не было достоверным. Так, на фиг. 24А и 24Б продемонстрировано, что конструкция PD1-IL2v вызывала повышенную инфильтрацию CD8 в опухоль поджелудочной железы через 4 дня после первой обработки по сравнению со всеми другими группами.

Таблица 6. CD8-позитивные Т-клетки

Группы	Количество CD8-позитивных Т-клеток/мм ²	р-значение относительно контроля
muPD1-IL2v, 1 мг/кг	4914	0,0032 **
muPD1, 10 мг/кг	974	0,7395
muFAP-IL2v, 1,25 мг/кг	872	0,8066
muPD-1, 10 мг/кг + muFAP-IL2v, 1,25 мг/кг	1899	0,2703
наполнитель	590	1

На фиг. 25А и 25Б и в таблице 7 представлены результаты иммуногистохимической визуализации опухолей поджелудочных желез, окрашенных антителом к гранзиму В (25А), данные количественного анализа площади, окрашенной маркером гранзима В (25Б). Иммуногистохимическое окрашивание гранзима В осуществляли на опухолях поджелудочных желез мышей Black 6, отобранных из указанных групп обработки. Образцы ткани подготавливали для иммуногистохимического окрашивания: опухоли изымали из животных после обработки, фиксировали в 10% формалина (фирма Sigma, Германия) и затем обрабатывали для FFPET-анализа (устройство Leica 1020, Германия). Затем 4-микрометровые парафиновые срезы нарезают с помощью микротомы (устройство Leica RM2235, Германия). Иммуногистохимию для выявления мышинового гранзима В осуществляли с использованием антитела к мышинному гранзиму В (фирма Abcam, Германия) с помощью автостейнера Leica (устройство Leica ST5010, Германия) согласно протоколам производителя. Изображения сканировали с помощью сканера фирмы Olympus. Количественную оценку площади маркера гранзима В проводили с помощью программного обеспечения Definiens (фирма Definiens, Германия). Статистические характеристики анализировали с помощью одностороннего регрессионного анализа для множественных сравнений. Уже в день 4 дня после первой терапевтической обработки обнаружено значимое увеличение количества гранзима В в обработанных muPD1-IL2v группах по сравнению со всеми другими группами. Тенденция к увеличению площади маркера гранзима была обнаружена также во всех обработанных терапевтическими агентами изученных группах, но это различие не было достоверным. Так, на фиг. 25А и 25Б продемонстрировано, что конструкция PD1-IL2v вызывала увеличенную позитивную по гранзиму В площадь в опухоли поджелудочной железы через 4 дня после первой обработки по сравнению со всеми другими группами.

Таблица 7. Позитивная по гранзиму В площадь

Группы	% позитивной по гранзиму В площади	р-значение относительно контроля
muPD1-IL2v, 1 мг/кг	16,67	0,0006 **
muPD1, 10 мг/кг	1,867	0,6709
muFAP-IL2v, 1,25 мг/кг	1,533	0,7442
muPD-1, 10 мг/кг + muFAP-IL2v, 1,25 мг/кг	2,033	0,6355
Наполнитель	0,44	1

На фиг. 26А и 26Б и в таблице 8 представлены результаты иммуногистохимической визуализации опухолей поджелудочных желез, окрашенных антителом к мышинному PD1 (фиг. 26А), и результаты количественного анализа PD1-позитивных клеток (фиг. 26Б).

Иммуногистохимическое окрашивание позитивных по PD1 клеток осуществляли на

опухолях поджелудочных желез мышей Black 6, отобранных из указанных групп обработки. Образцы ткани подготавливали для иммуногистохимического окрашивания: опухоли изымали из животных после обработки, фиксировали в 10% формалина (фирма Sigma, Германия) и затем обрабатывали для FFPET-анализа (устройство Leica 1020, Германия). Затем 4-микрометровые парафиновые срезы нарезали с помощью микротомы (устройство Leica RM2235, Германия). Иммуногистохимию для выявления мышинового PD1 осуществляли с использованием антитела к мышинному PD1 (фирма Serotec, Германия) с помощью автостейнера Leica (устройство Leica ST5010, Германия) согласно протоколам производителя. Изображения сканировали с помощью сканера фирмы Olympus. Количественную оценку muPD1-позитивных Т-клеток проводили с помощью программного обеспечения Definiens (фирма Definiens, Германия). Статистические характеристики анализировали с помощью одностороннего регрессионного анализа для множественных сравнений. Уже в день 4 дня после первой терапевтической обработки обнаружено значимое увеличение количества PD1-позитивных клеток в обработанных muPD1-IL2v группах по сравнению со всеми другими группами. Тенденция к увеличению количества PD1-позитивных клеток была обнаружена также во всех других обработанных терапевтическими агентами изученных группах, но это различие не было достоверным. Так, на фиг. 26А и 26Б продемонстрировано, что конструкция PD1-IL2v вызывала повышение количества PD1-позитивных клеток в опухоли поджелудочной железы через 4 дня после первой обработки по сравнению со всеми другими группами.

Таблица 8. PD1-позитивных клеток

Группы	Количество PD1-позитивных клеток/мм ²	р-значение относительно контроля
muPD1-IL2v, 1 мг/кг	6628	0,0004**
muPD1, 10 мг/кг	1582	0,5331
muFAP-IL2v, 1,25 мг/кг	1350	0,6705
muPD-1, 10 мг/кг + muFAP-IL2v, 1,25 мг/кг	3038	0,0803
наполнитель	858	1

Пример 7

Воздействие доставки IL-2v к истощенным вирусспецифическим Т-клетками посредством блокады PD-1

Экспрессия PD-1 впервые описана на истощенных вирусспецифических Т-клетках как результат хронического воздействия вирусных антигенов, и это ассоциировано с неспособностью Т-клеток поддерживать эффективный антивирусный ответ. Вирусспецифические CD4 Т-клетки обладают способностью одновременно секретировать IL-2 и IFN-γ, обеспечивая защиту от вирусной реактивации при хронических инфекциях. Так, полифункциональная сигнатура CD4 Т-клеток ассоциирована с контролем вирусов у здоровых индивидуумов, зараженных цитомегаловирусом (CMV), вирусом Эпштейна-Барра (EBV) и вирусом герпеса простого (HSV), а также у тех индивидуумов, зараженных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), у которых в течение нескольких лет отсутствуют симптомы.

В контексте хронических вирусных инфекций при создании изобретения разработан анализ in vitro для оценки воздействия таргетинга PD-1 на доставку мутантной версии IL-2 (IL-2v) к антигенспецифическим Т-клеткам с нарушенной функцией. Во избежание ограничений, связанных с количеством приемлемых для осуществления данного исследования доноров, при создании изобретения был выбран иммуногенный вирусный

белок CMV (pp65) в качестве «воскресшего» антигена для Т-клеток, принимая грубо, что 80% популяции является CMV-серопозитивной. Таким образом, при создании изобретения осуществляли стимуляцию мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) здорового донора с использованием CMV-pp65 (фирма Miltenic) в присутствии предлагаемых в изобретении конструкций в концентрации 10 мкг/мл. Через 43 ч блокировали белковый транспорт из аппарата Гольджи, добавляя Golgi Plug (фирма BD Bioscience, брефелдин А) и Golgi Stop (фирма BD Bioscience, монензин), и инкубировали клетки при 37°C в течение еще 5 ч. Затем клетки промывали, окрашивали поверхность с помощью антител к человеческим CD3, CD4, CD8, CD62L и CD45RO, после чего фиксировали/пермеабелизировали с помощью буфера из набора для окрашивания фактора транскрипции FoxP3 (фирма eBioscience). В конце осуществляли внутриклеточное окрашивание в отношении IL-2, IFN-γ и Ki67 (все фирмы eBioscience) для оценки клеточной пролиферации.

На фиг. 27 продемонстрирована способность CD4 Т-клеток секретировать IL-2 (А), IL-2 и IFN-γ (Б) или IFN-γ (В) и способность к пролиферации (Г) при бустер-обработке в течение 48 ч иммуногенным белком CMV pp65 в присутствии либо антитела к PD-1 индивидуально, либо в комбинации с IL-2v, либо в виде слитого белка. Обнаружена тенденция способности PD1-IL2v к повышению частоты встречаемости полифункциональных CD4 Т-клеток, которые могут совместно секретировать IL-2 и IFN-γ (фиг. 27Б), и значимому увеличению популяции, секретирующей только IFN-γ (фиг. 27В), по сравнению с образцами, обработанными pp65 и антителом к PD1. И, наоборот, комбинация pp65 и нетаргетированной конструкции IL-2v (DP47-IL2v) повышала частоту встречаемости секретирующих только IL-2 монофункциональных CD4 Т-клеток (фиг. 27А). Как и ожидалось, все клетки, обработанные таргетированными или нетаргетированными IL-2v, пролиферировали, что установлено по позитивному Ki67-окрашиванию.

На фиг. 28 представлены данные о статусе дифференцировки в виде экспрессия CD45RO и CD62L вирусоспецифическими CD4 Т-клетками, секретирующими IFN-γ при бустер-обработке в течение 48 ч иммуногенным белком CMV pp65 в присутствии либо антитела к PD-1 индивидуально, либо в комбинации с IL-2v, либо в виде слитого белка. Фенотипическая характеристика размножившихся секретирующих IFN-γ вирусоспецифических CD4 Т-клеток (фиг. 28) подтвердила профиль, соответствующий эффекторным клеткам памяти (CD45RO+CD62L-). Было сделано заключение о том, что доставка IL-2v к истощенным CMV-специфическим CD4 Т-клеткам посредством слитого белка PD1-IL-2v приводила к размножению долгоживущей защитной вирусоспецифической популяции, характеризующейся дифференцированным профилем памяти и способностью секретировать совместно IL-2 и IFN-γ.

Пример 8

Пример 8А. Активация клеток доноров 1 и 2 (pSTAT5-анализ)

Свежевыделенные из здоровых доноров РВМС высевали в теплую среду (RPMI1640, 10% FCS, 2 mM глутамин) в 96-луночный круглодонный планшет (200000 клеток/лунку). Планшеты центрифугировали при 300 g в течение 10 мин и супернатант удаляли. Клетки ресуспендировали в 50 мкл среды, содержащей молекулы IL2, и стимулировали в течение 20 мин при 37°C. Для сохранения статуса фосфорилирования клетки немедленно после стимуляции фиксировали в равном количестве предварительно нагретого Cytofix-буфера (554655, фирма BD Bioscience) в течение 10 мин при 37°C. Затем планшеты центрифугировали в течение 10 мин при 300 g и супернатант удаляли. Для обеспечения внутриклеточного окрашивания клетки пермеабелизировали в 200 мкл Phosflow Perm

буфера III (558050, фирма BD Bioscience) в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки промывали дважды 150 мкл холодного FACS-буфера и разделяли на два 96-луночных круглодонных планшета и окрашивали каждый с помощью 20 мкл смеси I или II антител в течение 60 мин в холодильнике. Смесь I антител применяли для окрашивания pSTAT5 в CD4 Т-клетках и регуляторных Т-клетках, а смесь II антител применяли для окрашивания pSTAT5 в CD8 Т-клетках и NK-клетках. Затем клетки промывали дважды FACS-буфером и ресуспендировали, используя 200 мкл FACS-буфера, содержащего 2% PFA, на лунку. Анализ осуществляли с использованием проточного цитометра BD Fortessa.

Для FACS-анализа применяли смеси антител, указанные в таблице 9 и таблице 10.

Таблица 9. Смесь I антител, применяемых для FACS (CD4 Т-клетки и регуляторные Т-клетки)

Антитело	Объем/образец
CD4 PE/Cy7, клон SK3, мышиный IgG1, κ (557852, фирма BD Bioscience)	0,5 мкл/лунку
CD25 APC, клон M-A251, мышиный IgG1, κ (356110, фирма BioLegend)	4 мкл/лунку
PE мышиный античеловеческий FoxP3 клон 259D/C7 (560046, фирма BD Bioscience)	1 мкл/лунку
A488 pSTAT5 (pY694), клон 47, мышиный IgG1 (562075, фирма BD Bioscience)	1 мкл/лунку

Таблица 10. Смесь II антител, применяемых для FACS (CD8 Т-клетки и NK-клетки)

Антитело	Объем/образец
CD3 PE/Cy7, клон UCHT1, мышиный IgG1, κ (300420, фирма BioLegend)	1 мкл/лунку
CD56 APC, клон HCD56, мышиный IgG1, κ (318310, фирма BioLegend)	1 мкл/лунку
CD8 PE, клон HIT8a, мышиный IgG1 (555635, фирма BD Bioscience)	1 мкл/лунку
A488 pSTAT5 (pY694), клон 47, мышиный IgG1 (фирма BD Bioscience)	1 мкл/лунку

На фиг. 29 представлены данные о фосфорилировании STAT5 в CD8 Т-клетках (А), NK-клетках (Б), CD4 Т-клетках (В) и регуляторных Т-клетках (Г) после обработки покоящихся PBMC донора 1 с использованием PD1-IL2v, FAP-IL2v и FAP-IL2wt. Все три протестированные молекулы обладали одинаковой активностью в отношении CD8 Т-клеток, NK-клеток и CD4 Т-клеток (за исключением Treg). Конструкция FAP-IL2wt обладала более высокой активностью в отношении индукции фосфорилирования STAT5 в Treg, за ней в порядке снижения активности следовала конструкция PD1-IL2v. Конструкция FAP-IL2v обладала наименьшей активностью в отношении Treg.

На фиг. 30 представлены данные о фосфорилировании STAT5 в CD4 Т-клетках (А), CD8 Т-клетках (Б), регуляторных Т-клетках (В) и NK-клетках (Г) после обработки покоящихся PBMC донора 2 с использованием FAP-IL2v, PD1-IL2c, FAP-IL2wt и PD1-TIM3-IL2v. Все четыре протестированные молекулы обладали сопоставимой активностью в отношении CD8 Т-клеток, NK-клеток и CD4 Т-клеток (за исключением

Treg). Конструкция FAP-IL2wt обладала более высокой активностью в отношении индукции фосфорилирования STAT5 в Treg за ней в порядке снижения активности следовала конструкция PD1-IL2v. Конструкция FAP-IL2v обладала наименьшей активностью в отношении Treg.

Пример 8Б. Активация клеток доноров 3 и 4 (pSTAT5-анализ)

Замороженные выделенные из здоровых доноров РВМС подвергали оттаиванию и культивировали в течение ночи при 37°C. На следующий день клетки высевали в теплую среду (RPMI1640, 10% FCS, 2 mM глутамин) в 96-луночный круглодонный планшет (200000 клеток/лунку). Планшеты центрифугировали при 300 g в течение 10 мин и супернатант удаляли. Клетки ресуспендировали в 50 мкл среды, содержащей молекулы IL2, и стимулировали в течение 20 мин при 37°C. Для сохранения статуса фосфорилирования клетки немедленно после стимуляции фиксировали в равном количестве предварительно нагретого Cytofix-буфера (554655, фирма BD Bioscience) в течение 10 мин при 37°C. Затем планшеты центрифугировали в течение 10 мин при 300 g и супернатант удаляли. Для обеспечения внутриклеточного окрашивания клетки пермеабилizировали в 200 мкл Phosflow Perm буфера III (558050, фирма BD Bioscience) в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки промывали дважды 150 мкл холодного FACS-буфера и разделяли на два 96-луночных круглодонных планшета и окрашивали каждый с помощью 20 мкл смеси I или II антител в течение 60 мин в холодильнике. Смесь I антител применяли для окрашивания pSTAT5 в CD4 Т-клетках и регуляторных Т-клетках, а смесь II антител применяли для окрашивания pSTAT5 в CD8 Т-клетках и НК-клетках. Затем клетки промывали дважды FACS-буфером и ресуспендировали, используя 200 мкл FACS-буфера, содержащего 2% PFA, на лунку. Анализ осуществляли с использованием проточного цитометра BD Fortessa.

Для FACS-анализа применяли смеси антител, указанные в таблице 11 и таблице 12.

Таблица 11. Смесь I антител, применяемых для FACS (CD4 Т-клетки и регуляторные Т-клетки)

Антитело	Объем/образец
CD4 PE/Cy7, клон SK3, мышиный IgG1, κ (557852, фирма BD Bioscience)	0,5 мкл/лунку
CD25 APC, клон M-A251, мышиный IgG1, κ (356110, фирма BioLegend)	4 мкл/лунку
PE мышиный античеловеческий FoxP3 клон 259D/C7 (560046, фирма BD Bioscience)	1 мкл/лунку
A488 pSTAT5 (pY694), клон 47, мышиный IgG1 (562075, фирма BD Bioscience)	1 мкл/лунку

Таблица 12. Смесь II антител, применяемых для FACS (CD8 Т-клетки и NK-клетки)

Антитело	Объем/образец
CD3 PE/Cy7, клон UCST1, мышиный IgG1, κ (300420, фирма BioLegend)	1 мкл лунку
CD56 APC, клон HCD56, мышиный IgG1, κ (318310, фирма BioLegend)	1 мкл/лунку
CD8 PE, клон HIT 8a, мышиный IgG1 (555635, фирма BD Bioscience)	1 мкл/лунку
A488 pSTAT5 (pY694), клон 47, мышиный IgG1 (фирма BD Bioscience)	1 мкл/лунку

На фиг. 31 представлены данные о фосфорилировании STAT5 в CD8 Т-клетках (А), NK-клетках (Б), CD4 Т-клетках (В) и регуляторных Т-клетках (Г) после обработки полежащих РВМС донора 3 с использованием FAP-IL2v, PD1-IL2v, FAP-IL2wt, PD1-TIM3-IL2v. Все четыре протестированные молекулы обладали сопоставимой активностью в отношении CD8 Т-клеток, NK-клеток и CD4 Т-клеток (за исключением Treg). Конструкция FAP-IL2wt обладала более высокой активностью в отношении индукции фосфорилирования STAT5 в Treg. за ней в порядке снижения активности следовала конструкция PD1-IL2v. Конструкция FAP-IL2v обладала наименьшей активностью в отношении Treg.

На фиг. 32 представлены данные о фосфорилировании STAT5 в CD8 Т-клетках (А), NK-клетках (Б), CD4 Т-клетках (В) и регуляторных Т-клетках (Г) после обработки полежащих РВМС донора 4 FAP-IL2v, PD1-IL2v, FAP-IL2wt, PD1-TIM3-IL2v. Все четыре протестированные молекулы обладали сопоставимой активностью в отношении CD8 Т-клеток, NK-клеток и CD4 Т-клеток (за исключением Treg). Конструкция FAP-IL2wt обладала более высокой активностью в отношении индукции фосфорилирования STAT5 в Treg за ней в порядке снижения активности следовала конструкция PD1-IL2v. Конструкция FAP-IL2v обладала наименьшей активностью в отношении Treg.

Дополнительные объекты изобретения

1. Иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид IL-2 и антитело, которое связывается с PD-1,

в котором мутантный полипептид IL-2 представляет собой молекулу человеческого IL-2, содержащую аминокислотные замены F42A, Y45A и L72G (нумерация относительно последовательности SEQ ID NO: 19) человеческого IL-2.

2. Иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид IL-2 и антитело, которое связывается с PD-1,

в котором мутантный полипептид IL-2 представляет собой молекулу человеческого IL-2, содержащую аминокислотные замены F42A, Y45A и L72G (нумерация относительно последовательности человеческого IL-2 SEQ ID NO: 19); и

в котором антитело содержит (а) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую HVR-H1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HVR-H2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HVR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, FR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 в положениях 71-73 согласно нумерации Кэбота, и (б) переменную область легкой цепи (VL), содержащую HVR-L1, который содержит аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 4, HVR-L2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и HVR-L3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

3. Иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид IL-2 и антитело, которое связывается с PD-1,

в котором мутантный полипептид IL-2 представляет собой молекулу человеческого IL-2, содержащую аминокислотные замены F42A, Y45A и L72G (нумерация относительно последовательности человеческого IL-2 SEQ ID NO: 19); и

в котором антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую HVR-H1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, HVR-H2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, HVR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую HVR-L1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, HVR-L2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и HVR-L3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

4. Иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид IL-2 и антитело, которое связывается с PD-1,

в котором мутантный полипептид IL-2 представляет собой молекулу человеческого IL-2, содержащую аминокислотные замены F42A, Y45A и L72G (нумерация относительно последовательности человеческого IL-2 SEQ ID NO: 19); и

в котором антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

5. Иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 1-4, в котором мутантный полипептид IL-2 содержит дополнительно аминокислотную замену T3A и/или аминокислотную замену C125 A.

6. Иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 1-5, в котором мутантный полипептид IL-2 содержит последовательность SEQ ID NO: 20.

7. Иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 1-6, где иммуноконъюгат содержит не более одного мутантного полипептида IL-2.

8. Иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 1-7, в котором антитело содержит Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц.

9. Иммуноконъюгат по объекту изобретения 8, в котором Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG-класса, в частности Fc-домен IgG₁-подкласса.

10. Иммуноконъюгат по объекту изобретения 8 или 9, в котором Fc-домен представляет собой человеческий Fc-домен.

11. Иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 1-10, в котором антитело представляет собой иммуноглобулин IgG-класса, в частности IgG₁-подкласса.

12. Иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 8-11, в котором Fc-домен содержит модификацию, способствующую ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена.

13. Иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 8-12, в котором в CH3-

доме первой субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, который имеет больший объем боковой цепи, что приводит к образованию выпуклости на СН3-доме первой субъединицы, которая может помещаться в полость в СН3-доме второй субъединицы, и в СН3-доме второй субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, который имеет меньший объем боковой цепи, что приводит к образованию полости в СН3-доме второй субъединицы, в которую может помещаться выпуклость на СН3-доме первой субъединицы.

14. Иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 8-13, в котором в первой субъединице Fc-домена остаток треонина в положении 366 заменен на остаток триптофана (T366W), а во второй субъединице Fc-домена остаток тирозина в положении 407 заменен на остаток валина (Y407V) и необязательно остаток треонина в положении 366 заменен на остаток серина (T366S) и остаток лейцина в положении 368 заменен на остаток аланина (L368A) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

15. Иммуноконъюгат по объекту изобретения 14, в котором в первой субъединице Fc-домена дополнительно остаток серина в положении 354 заменен на остаток цистеина (S354C) или остаток глутаминовой кислоты в положении 356 заменен на остаток цистеина (E356C), и во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток тирозина в положении 349 заменен на остаток цистеина (Y349C) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

16. Иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 8-15, в котором мутантный полипептид IL-2 слит на его аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой одной из субъединиц Fc-домена, в частности первой субъединицы Fc-домена, необязательно через линкерный пептид.

17. Иммуноконъюгат по объекту изобретения 16, в котором линкерный пептид имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

18. Иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 8-16, в котором Fc-домен содержит одну или несколько аминокислотную(ых) замену(н), которая(ые) снижает (ют) связывание с Fc-рецептором, в частности Fcγ-рецептором, и/или эффекторную функцию, в частности антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC).

19. Иммуноконъюгат по объекту изобретения 18, в котором указанная(ые) одна или несколько аминокислотная(ых) замена(н) находится(ятся) в одном или нескольких положении(ях), выбранном(ых) из группы L234, L235 и P329 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

20. Иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 8-19, в котором каждая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

21. Иммуноконъюгат по одному из п.п. 1-20, содержащий полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 22, полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24, и полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 25.

22. Иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 1-21, который практически состоит из мутантного полипептида IL-2 и молекулы иммуноглобулина IgG₁,

соединенных линкерной последовательностью.

23. Один или несколько выделенных полинуклеотидов, который(ые) кодирует(ют) иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 1-22.

24. Один или несколько векторов, в частности экспрессионных векторов, содержащих полинуклеотид(ы) по объекту изобретения 23.

25. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид(ы) по объекту изобретения 23 или вектор(ы) по объекту изобретения 24.

26. Способ получения иммуноконъюгата, который содержит мутантный полипептид IL-2 и антитело, которое связывается с PD-1, включающий (а) культивирование клетки-хозяина по объекту изобретения 25 в условиях, пригодных для экспрессии иммуноконъюгата, и необязательно (б) выделение иммуноконъюгата.

27. Иммуноконъюгат, который содержит мутантный полипептид IL-2 и антитело, которое связывается с PD-1, полученный способом по объекту изобретения 26.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 1-22 или 27 и фармацевтически приемлемый носитель.

29. Иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 1-22 или 27, предназначенный для применения в качестве лекарственного средства.

30. Иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 1-22 или 27, предназначенный для применения для лечения заболевания.

31. Иммуноконъюгат, предназначенный для лечения заболевания по объекту изобретения 30, где указанное заболевание представляет собой рак.

32. Применение иммуноконъюгата по одному из объектов изобретения 1-22 или 27 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения заболевания.

33. Применение по объекту изобретения 32, в котором указанное заболевание представляет собой рак.

34. Способ лечения заболевания у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве композиции, которая содержит иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 1-22 или 27 в фармацевтически приемлемой форме.

35. Способ по объекту изобретения 34, в котором указанное заболевание представляет собой рак.

36. Способ стимуляции иммунной системы индивидуума, включающий введение указанному индивидууму в эффективном количестве композиции, которая содержит иммуноконъюгат по одному из объектов изобретения 1-22 или 27 в фармацевтически приемлемой форме.

37. Изобретение, как оно описано выше.

Хотя 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 специально полностью включены в него в качестве ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Ф. Хоффманн-Ля Рош АГ
- <120> Иммуноконъюгаты антитела к PD-1 с мутантом IL-2 или IL-15
- <130> P34189
- <160> 51
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 5 <223> Synthetic construct
 <400> 1
 Ser Ser Tyr Thr
 1
 <210> 2
 10 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic construct
 15 <400> 2
 Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr
 1 5
 <210> 3
 <211> 5
 20 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 3
 25 Gly Arg Val Tyr Phe
 1 5
 <210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 30 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 4
 Thr Ser Asp Asn Ser Phe
 35 1 5
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 40 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 5
 Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5
 45 <210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 6
 Asn Tyr Asp Val Pro Trp
 5 1 5
 <210> 7
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 10 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 7
 Arg Asp Asn
 1
 15 <210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 20 <223> Synthetic Construct
 <400> 8
 Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 9
 25 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 30 <400> 9
 Gly Gly Arg
 1
 <210> 10
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 10
 40 Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp
 1 5
 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 45 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 11

Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe
1 5 10
<210> 12
<211> 3
5 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 12
10 Arg Ser Ser
1
<210> 13
<211> 6
<212> PRT
15 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 13
Asn Tyr Asp Val Pro Trp
20 1 5
<210> 14
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
25 <220>
<223> Synthetic Construct
<400> 14
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
35 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
40 Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 15
45 <211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 15

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

5 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser

20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

10 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr

85 90 95

15 Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 16

<211> 111

<212> PRT

20 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 16

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

25 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser

20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro

35 40 45

30 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser

65 70 75 80

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr

35 85 90 95

Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 17

<211> 111

40 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 17

45 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser

20 25 30

RU 2761377 C2

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45
 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 5 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
 85 90 95
 Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 10 100 105 110
 <210> 18
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 18
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 20 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
 20 25 30
 Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45
 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 25 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
 85 90 95
 30 Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 19
 <211> 133
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 40 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 45 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

RU 2 761 377 C2

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125
5 Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 20
<211> 133
<212> PRT
10 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 20
Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
15 1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys
35 40 45
20 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
25 85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125
30 Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 21
<211> 15
<212> PRT
35 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 21
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
40 1 5 10 15
<210> 22
<211> 597
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
45 <220>
<223> Synthetic Construct
<400> 22
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

RU 2761377 C2

	1		5		10		15
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala
				20			25
	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln
5			35			40	
	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly
			50			55	
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser
	65				70		
10	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg
			85			90	
	Val	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg	Val
			100			105	
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
15			115			120	
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
			130			135	
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
	145				150		
20	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
			165			170	
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
			180			185	
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
25			195			200	
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
			210			215	
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
	225				230		
30	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
			245			250	
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
			260			265	
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
35			275			280	
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
			290			295	
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
	305				310		
40	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
			325			330	
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
			340			345	
	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp
45			355			360	
	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			370			375	
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu

RU 2761377 C2

	385		390		395		400									
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
				405					410						415	
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
5				420					425						430	
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
				435					440						445	
	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
				450					455						460	
10	Ala	Pro	Ala	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
	465															480
	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
				485												495
	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Ala	Lys	Phe	Ala	Met	Pro	Lys
15				500												
	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys
				515												
	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Gly	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu
				530												
									535							540
20	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu
	545															560
	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
				565												575
	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ala	Gln	Ser	Ile
25				580												
									585							590
	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr											
				595												
	<210>	23														
	<211>	448														
30	<212>	PRT														
	<213>	Artificial Sequence														
	<220>															
	<223>	Synthetic Construct														
	<400>	23														
35	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5						10				15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20							25				30	
	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
40				35							40				45	
	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Arg	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val
				50												
									55							60
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65								70							80
45	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85							90					95
	Val	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg	Val	Tyr	Phe	Ala	Leu	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln
				100							105					110

RU 2761377 C2

	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
				115					120				125			
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
			130					135				140				
5	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
	145					150					155					160
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
				165						170					175	
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
10				180					185					190		
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
			195					200					205			
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
			210				215					220				
15	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly
	225					230					235					240
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245						250					255	
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
20				260					265					270		
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
			275					280				285				
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
		290					295				300					
25	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
	305					310					315					320
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu
				325						330					335	
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys
30				340					345					350		
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
		355						360					365			
	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
		370				375					380					
35	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
	385					390					395					400
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
				405					410						415	
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
40				420					425					430		
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
			435					440				445				
	<210>	24														
	<211>	448														
45	<212>	PRT														
	<213>	Artificial Sequence														
	<220>															
	<223>	Synthetic Construct														

<400> 24

	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Ser	Ser	Tyr
5				20					25					30		
	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
				35				40					45			
	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Arg	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val
		50					55				60					
10	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70				75					80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95		
	Val	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg	Val	Tyr	Phe	Ala	Leu	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln
15				100					105					110		
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
		115						120					125			
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
		130					135					140				
20	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
	145					150				155						160
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
				165					170						175	
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
25				180					185					190		
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
			195					200					205			
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
		210					215					220				
30	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly
	225					230				235						240
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245					250					255		
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
35				260					265					270		
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
		275						280				285				
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
		290					295					300				
40	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
	305					310				315						320
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu
				325					330					335		
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys
45				340					345					350		
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
		355						360					365			
	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp

RU 2 761 377 C2

	370		375		380												
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
	385					390					395					400	
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
5					405					410					415		
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430			
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
				435				440						445			
10	<210>	25															
	<211>	218															
	<212>	PRT															
	<213>	Artificial Sequence															
	<220>																
15	<223>	Synthetic Construct															
	<400>	25															
	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	
	1				5					10					15		
	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	
20				20				25					30				
	Asp	Asn	Ser	Phe	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	
				35				40					45				
	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ser	Thr	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp		
		50					55					60					
25	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
	65				70					75					80		
	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Tyr	
				85						90					95		
	Asp	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	
30				100				105						110			
	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	
				115				120						125			
	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	
		130					135						140				
35	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	
	145					150					155				160		
	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	
				165						170					175		
	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	
40				180					185					190			
	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	
				195				200					205				
	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
		210					215										
45	<210>	26															
	<211>	20															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															

<400> 26
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15
Val Thr Asn Ser
5 20
<210> 27
<211> 268
<212> PRT
<213> Homo sapiens
10 <400> 27
Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
1 5 10 15
Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
20 25 30
15 Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
35 40 45
Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
50 55 60
20 Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
65 70 75 80
Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
85 90 95
Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
100 105 110
25 Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
115 120 125
Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
130 135 140
30 Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser
145 150 155 160
Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala
165 170 175
Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Lys Glu Asp
180 185 190
35 Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly Glu Leu Asp Phe
195 200 205
Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro Cys Val Pro Glu
210 215 220
40 Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly Met Gly Thr Ser
225 230 235 240
Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg Ser Ala Gln Pro
245 250 255
Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
260 265
45 <210> 28
<211> 288
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15
Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
5 20 25 30
Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45
Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60
10 Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80
Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95
Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
15 100 105 110
Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125
Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140
20 Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160
Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175
Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
25 180 185 190
Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205
Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220
30 Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240
Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255
Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
35 260 265 270
Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285
<210> 29
<211> 133
40 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 29
45 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

RU 2761377 C2

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 5 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 10 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130
 15 <210> 30
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 20 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 25 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 30 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 35 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 40 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 45 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro

225
 <210> 31
 <211> 107
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 10 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 15 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 20 100 105
 <210> 32
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 32
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30
 30 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 35 65 70 75 80
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105
 40 <210> 33
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 45 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

RU 2 761 377 C2

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 5 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 10 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 15 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 20 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 25 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 30 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 35 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325
 <210> 34
 40 <211> 607
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 45 <400> 34
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ser

RU 2761377 C2

		20		25		30											
		Tyr	Arg	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Lys	Phe	Pro	Gly	Asn	Arg	Leu	Glu	Trp
		35							40				45				
		Met	Gly	Tyr	Ile	Asn	Ser	Ala	Gly	Ile	Ser	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
5		50						55				60					
		Lys	Arg	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Phe
		65					70					75				80	
		Leu	Gln	Val	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95		
10		Ala	Arg	Ser	Asp	Asn	Met	Gly	Thr	Thr	Pro	Phe	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln
					100				105					110			
		Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val
					115				120					125			
		Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr
15		130						135				140					
		Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr
		145					150					155				160	
		Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
					165					170					175		
20		Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser
					180				185					190			
		Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala
					195				200					205			
		Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly	Cys
25		210						215				220					
		Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile	Phe
		225					230					235				240	
		Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	Val
					245					250					255		
30		Thr	Cys	Val	Val	Val	Ala	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe
					260					265				270			
		Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Lys	Pro
					275				280				285				
		Arg	Glu	Glu	Gln	Ile	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Pro
35		290						295				300					
		Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg	Val
		305					310					315				320	
		Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr
					325					330					335		
40		Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Lys
					340				345					350			
		Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr	Asn
					355				360				365				
		Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln	Pro
45		370						375				380					
		Ala	Glu	Asn	Tyr	Asp	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asp	Thr	Asp	Gly	Ser
		385					390					395				400	
		Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Asp	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala

RU 2 761 377 C2

					405					410					415	
	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His
					420					425					430	
	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
5				435				440					445			
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Ala	Ser	Ser	Ser
				450				455				460				
	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Glu	Ala	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
	465					470				475						480
10	Gln	Gln	Gln	Gln	His	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Met	Asp	Leu	Gln	Glu	Leu
				485				490				495				
	Leu	Ser	Arg	Met	Glu	Asn	Tyr	Arg	Asn	Leu	Lys	Leu	Pro	Arg	Met	Leu
				500				505				510				
	Thr	Ala	Lys	Phe	Ala	Leu	Pro	Lys	Gln	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	Asp	Leu
15				515				520				525				
	Gln	Cys	Leu	Glu	Asp	Glu	Leu	Gly	Pro	Leu	Arg	His	Val	Leu	Asp	Gly
				530				535				540				
	Thr	Gln	Ser	Lys	Ser	Phe	Gln	Leu	Glu	Asp	Ala	Glu	Asn	Phe	Ile	Ser
	545					550				555						560
20	Asn	Ile	Arg	Val	Thr	Val	Val	Lys	Leu	Lys	Gly	Ser	Asp	Asn	Thr	Phe
				565				570				575				
	Glu	Cys	Gln	Phe	Asp	Asp	Glu	Ser	Ala	Thr	Val	Val	Asp	Phe	Leu	Arg
				580				585				590				
	Arg	Trp	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Ser	Pro	Gln	
25				595				600				605				
	<210>	35														
	<211>	442														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial Sequence														
30	<220>															
	<223>	Synthetic Construct														
	<400>	35														
	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
	1			5				10					15			
35	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Ser
				20				25					30			
	Tyr	Arg	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Lys	Phe	Pro	Gly	Asn	Arg	Leu	Glu	Trp
				35				40				45				
	Met	Gly	Tyr	Ile	Asn	Ser	Ala	Gly	Ile	Ser	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
40		50				55					60					
	Lys	Arg	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Phe
	65					70				75						80
	Leu	Gln	Val	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
				85				90						95		
45	Ala	Arg	Ser	Asp	Asn	Met	Gly	Thr	Thr	Pro	Phe	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100				105					110			
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val
				115				120					125			

RU 2761377 C2

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 145 150 155 160
 5 Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 10 195 200 205
 Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 210 215 220
 Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240
 15 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro
 20 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 290 295 300
 Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
 305 310 315 320
 25 Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335
 Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
 340 345 350
 Lys Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn
 30 355 360 365
 Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys Thr Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 35 Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
 405 410 415
 Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 420 425 430
 His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
 40 435 440
 <210> 36
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 45 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 36
 Asp Ile Val Met Thr Gln Gly Thr Leu Pro Asn Pro Val Pro Ser Gly

RU 2 761 377 C2

5	1				5				10				15			
	Glu	Ser	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser
	20				25				30							
	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
	35				40				45							
10	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Met	Ser	Thr	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Ser
	50				55				60							
	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
	65				70				75				80			
	Ser	Gly	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly
15	85				90				95							
	Leu	Glu	Phe	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg
	100				105				110							
	Thr	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln
	115				120				125							
20	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
	130				135				140							
	Pro	Lys	Asp	Ile	Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln
	145				150				155				160			
	Asn	Gly	Val	Leu	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
25	165				170				175							
	Tyr	Ser	Met	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Arg
	180				185				190							
	His	Asn	Ser	Tyr	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro
	195				200				205							
30	Ile	Val	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys						
	210				215											
	<210>		37													
	<211>		595													
	<212>		PRT													
35	<213>		Artificial Sequence													
	<220>															
	<223>		Synthetic Construct													
	<400>		37													
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
40	1				5				10				15			
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Ser
	20				25				30							
	Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	35				40				45							
45	Ala	Trp	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50				55				60							
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
	65				70				75				80			
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
50	85				90				95							
	Ala	Arg	Arg	His	Trp	Pro	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
	100				105				110							

RU 2761377 C2

	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
5	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
10	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
15	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
20	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
25	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
30	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
35	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
40	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
45	Ala	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu

RU 2 761 377 C2

Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala
 500 505 510
 Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu
 515 520 525
 5 Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro
 530 535 540
 Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly
 545 550 555 560
 Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile
 10 565 570 575
 Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser
 580 585 590
 Thr Leu Thr
 595
 15 <210> 38
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 20 <223> Synthetic Construct
 <400> 38
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
 25 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 35 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 40 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 45 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

RU 2761377 C2

	210		215		220												
	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	
	225					230					235					240	
	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
5					245					250					255		
	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
				260					265					270			
	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
			275					280					285				
10	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
	290					295					300						
	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
	305				310						315					320	
	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
15				325						330				335			
	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	
			340						345				350				
	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	
		355						360				365					
20	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
	370					375					380						
	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
	385				390					395					400		
	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
25				405						410				415			
	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
			420						425				430				
	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro			
		435					440				445						
30	<210>	39															
	<211>	214															
	<212>	PRT															
	<213>	Artificial Sequence															
	<220>																
35	<223>	Synthetic Construct															
	<400>	39															
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
	1			5					10					15			
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	
40			20						25				30				
	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	
		35					40				45						
	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50					55					60						
45	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
	65				70				75					80			
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Leu	Tyr	His	Pro	Ala	
			85						90					95			

RU 2761377 C2

```

    Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
      100                      105                      110
    Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
      115                      120                      125
5    Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
      130                      135                      140
    Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
    145                      150                      155                      160
    Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
10                      165                      170                      175
    Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      180                      185                      190
    Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
      195                      200                      205
15    Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210
    <210> 40
    <211> 605
    <212> PRT
20    <213> Artificial Sequence
    <220>
    <223> Synthetic Construct
    <400> 40
    Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
25    1                      5                      10                      15
    Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
      20                      25                      30
    Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35                      40                      45
30    Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50                      55                      60
    Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
    65                      70                      75                      80
    Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35                      85                      90                      95
    Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100                      105                      110
    Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
      115                      120                      125
40    Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly
      130                      135                      140
    Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn
    145                      150                      155                      160
    Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
45                      165                      170                      175
    Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr
      180                      185                      190
    Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser

```

RU 2761377 C2

			195				200				205						
		Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly	Cys	Lys	Pro
		210				215				220							
5		Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
		225				230				235				240			
		Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys
						245				250				255			
		Val	Val	Val	Ala	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp
10		260				265				270							
		Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu
		275				280				285							
		Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met
		290				295				300							
15		His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser
		305				310				315				320			
		Ala	Ala	Phe	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly
						325				330				335			
		Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln
20		340				345				350							
		Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr	Asp	Phe	Phe
		355				360				365							
		Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu
		370				375				380							
25		Asn	Tyr	Asp	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asp	Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe
		385				390				395				400			
		Val	Tyr	Ser	Asp	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn
						405				410				415			
		Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr
30		420				425				430							
		Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
		435				440				445							
		Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Ala	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser
		450				455				460							
35		Ser	Ser	Thr	Ala	Glu	Ala	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
		465				470				475				480			
		Gln	Gln	His	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Met	Asp	Leu	Gln	Glu	Leu	Leu	Ser
						485				490				495			
		Arg	Met	Glu	Asn	Tyr	Arg	Asn	Leu	Lys	Leu	Pro	Arg	Met	Leu	Thr	Ala
40		500				505				510							
		Lys	Phe	Ala	Leu	Pro	Lys	Gln	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	Asp	Leu	Gln	Cys
		515				520				525							
		Leu	Glu	Asp	Glu	Leu	Gly	Pro	Leu	Arg	His	Val	Leu	Asp	Gly	Thr	Gln
		530				535				540							
45		Ser	Lys	Ser	Phe	Gln	Leu	Glu	Asp	Ala	Glu	Asn	Phe	Ile	Ser	Asn	Ile
		545				550				555				560			
		Arg	Val	Thr	Val	Val	Lys	Leu	Lys	Gly	Ser	Asp	Asn	Thr	Phe	Glu	Cys
						565				570				575			
		Gln	Phe	Asp	Asp	Glu	Ser	Ala	Thr	Val	Val	Asp	Phe	Leu	Arg	Arg	Trp

RU 2 761 377 C2

	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Ser	Pro	Gln			
			595					600					605			
5	<210>	41														
	<211>	440														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial Sequence														
	<220>															
10	<223>	Synthetic Construct														
	<400>	41														
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Ser
				20					25					30		
15	Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
	Ala	Trp	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
20	65					70					75					80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
	Ala	Arg	Arg	His	Trp	Pro	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
				100					105					110		
25	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro
			115						120					125		
	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly
		130					135					140				
	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn
30	145					150					155					160
	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				165						170					175	
	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr
				180						185				190		
35	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser
			195					200					205			
	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly	Cys	Lys	Pro
		210					215					220				
	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
40	225					230					235					240
	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys
				245						250					255	
	Val	Val	Val	Ala	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp
				260					265					270		
45	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr</							

RU 2761377 C2

	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser
	305					310					315					320
	Ala	Ala	Phe	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly
					325					330					335	
5	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Lys	Lys	Gln
				340					345					350		
	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr	Asp	Phe	Phe
			355					360					365			
	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu
10		370					375					380				
	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Lys	Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe
	385					390				395						400
	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn
					405					410					415	
15	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr
				420					425				430			
	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Pro								
			435					440								
	<210>	42														
20	<211>	214														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial Sequence														
	<220>															
	<223>	Synthetic Construct														
25	<400>	42														
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala
				20					25					30		
30	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35					40					45			
	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50					55					60				
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
35	65					70					75					80
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Leu	Tyr	His	Pro	Ala
					85					90				95		
	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala
				100					105					110		
40	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly
			115					120					125			
	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Lys	Asp	Ile
			130				135					140				
	Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln	Asn	Gly	Val	Leu
45	145					150					155					160
	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Met	Ser
					165					170					175	
	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Arg	His	Asn	Ser	Tyr

RU 2761377 C2

		180		185		190											
	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Ile	Val	Lys	Ser	
			195					200					205				
	Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys											
5		210															
	<210>	43															
	<211>	150															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
10	<400>	43															
	Pro	Gly	Trp	Phe	Leu	Asp	Ser	Pro	Asp	Arg	Pro	Trp	Asn	Pro	Pro	Thr	
	1				5					10					15		
	Phe	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Glu	Gly	Asp	Asn	Ala	Thr	Phe	
				20					25					30			
15	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Asn	Thr	Ser	Glu	Ser	Phe	Val	Leu	Asn	Trp	Tyr	
		35						40					45				
	Arg	Met	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala	Phe	Pro	Glu	
		50					55					60					
	Asp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe	Arg	Val	Thr	Gln	Leu	
20	65					70				75					80		
	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp	Phe	His	Met	Ser	Val	Val	Arg	Ala	Arg	Arg	Asn	
					85					90					95		
	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu	Ala	Pro	Lys	Ala	
				100					105					110			
25	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Arg	Val	Thr	Glu	Arg	Arg	
		115						120					125				
	Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	Arg	Pro	Ala	Gly	
		130					135					140					
	Gln	Phe	Gln	Thr	Leu	Val											
30	145					150											
	<210>	44															
	<211>	608															
	<212>	PRT															
	<213>	Artificial Sequence															
35	<220>																
	<223>	Synthetic Construct															
	<400>	44															
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10					15		
40	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Glu	Phe	
				20					25					30			
	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35						40					45				
	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Lys	Thr	Gly	Glu	Ala	Thr	Tyr	Val	Glu	Glu	Phe	
45		50					55					60					
	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Phe	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70				75					80		
	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	

RU 2 761 377 C2

					85					90					95	
	Ala	Arg	Trp	Asp	Phe	Ala	Tyr	Tyr	Val	Glu	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
				100					105					110		
5	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser
			115					120					125			
	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val
		130					135				140					
	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
	145					150				155						160
10	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165						170				175		
	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro
			180						185				190			
	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro
15			195					200					205			
	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly
		210					215				220					
	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile
	225					230				235						240
20	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys
				245						250					255	
	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Ala	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
			260						265					270		
	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Lys
25			275					280					285			
	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Ile	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu
		290					295					300				
	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg
	305				310					315						320
30	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
				325						330					335	
	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro
			340						345					350		
	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr
35			355					360					365			
	Asn	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln
		370					375					380				
	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Asp	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asp	Thr	Asp	Gly
	385				390					395						400
40	Ser	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Asp	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu
				405						410					415	
	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn
			420				</									

RU 2761377 C2

	465		470		475		480
	Gln Gln Gln Gln Gln	His Leu Glu Gln Leu	Leu Met Asp Leu Gln Glu				
		485		490		495	
	Leu Leu Ser Arg Met	Glu Asn Tyr Arg	Asn Leu Lys Leu	Pro Arg Met			
5		500		505		510	
	Leu Thr Ala Lys Phe	Ala Leu Pro Lys	Gln Ala Thr Glu	Leu Lys Asp			
		515		520		525	
	Leu Gln Cys Leu Glu	Asp Glu Leu Gly	Pro Leu Arg His	Val Leu Asp			
		530		535		540	
10	Gly Thr Gln Ser Lys	Ser Phe Gln Leu Glu	Asp Ala Glu Asn	Phe Ile			
	545		550		555		560
	Ser Asn Ile Arg Val	Thr Val Val Lys	Leu Lys Gly Ser	Asp Asn Thr			
		565		570		575	
	Phe Glu Cys Gln Phe	Asp Asp Glu Ser	Ala Thr Val Val	Asp Phe Leu			
15		580		585		590	
	Arg Arg Trp Ile Ala	Phe Ala Gln Ser	Ile Ile Ser Thr	Ser Pro Gln			
		595		600		605	
	<210>	45					
	<211>	445					
20	<212>	PRT					
	<213>	Artificial Sequence					
	<220>						
	<223>	Synthetic Construct					
	<400>	45					
25	Gln Val Gln Leu Val	Gln Ser Gly Ala	Glu Val Lys Lys	Pro Gly Ala			
	1		5		10		15
	Ser Val Lys Val Ser	Cys Lys Ala Ser	Gly Tyr Thr Phe	Thr Glu Phe			
		20		25		30	
	Gly Met Asn Trp Val	Arg Gln Ala Pro	Gly Gln Gly Leu	Glu Trp Met			
30		35		40		45	
	Gly Trp Ile Asn Thr	Lys Thr Gly Glu	Ala Thr Tyr Val	Glu Glu Phe			
		50		55		60	
	Lys Gly Arg Val Thr	Phe Thr Thr Asp	Thr Ser Thr Ser	Thr Ala Tyr			
	65		70		75		80
35	Met Glu Leu Arg Ser	Leu Arg Ser Asp	Asp Thr Ala Val	Tyr Tyr Cys			
		85		90		95	
	Ala Arg Trp Asp Phe	Ala Tyr Tyr Val	Glu Ala Met Asp	Tyr Trp Gly			
		100		105		110	
	Gln Gly Thr Thr Val	Thr Val Ser Ser	Ala Lys Thr Thr	Pro Pro Ser			
40		115		120		125	
	Val Tyr Pro Leu Ala	Pro Gly Ser Ala	Ala Gln Thr Asn	Ser Met Val			
		130		135		140	
	Thr Leu Gly Cys Leu	Val Lys Gly Tyr	Phe Pro Glu Pro	Val Thr Val			
	145		150		155		160
45	Thr Trp Asn Ser Gly	Ser Leu Ser Ser	Gly Val His Thr	Phe Pro Ala			
		165		170		175	
	Val Leu Gln Ser Asp	Leu Tyr Thr Leu	Ser Ser Ser Val	Thr Val Pro			
		180		185		190	

RU 2 761 377 C2

5	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro
	195						200						205			
	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly
	210						215						220			
	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile
10	225			230						235			240			
	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys
				245						250			255			
	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Ala	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
	260						265						270			
15	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Lys
	275						280						285			
	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Ile	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu
	290						295						300			
	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg
20	305			310						315			320			
	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
				325						330			335			
	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro
	340						345						350			
25	Lys	Lys	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr
	355						360						365			
	Asn	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln
	370						375						380			
	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Lys	Thr	Asp	Gly
30	385			390						395			400			
	Ser	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu
				405						410			415			
	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn
	420						425						430			
35	His	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Lys			
	435						440						445			
	<210>	46														
	<211>	215														
	<212>	PRT														
40	<213>	Artificial Sequence														
	<220>															
	<223>	Synthetic Construct														
	<400>	46														
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
45	1	5						10						15		
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Ala	Ala	Val	Gly	Thr	Tyr
	20						25						30			
	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
	35						40						45			
50	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Arg	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50						55						60			
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro

RU 2761377 C2

	65		70		75		80									
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Leu
				85						90					95	
	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala
5				100					105						110	
	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	Thr	Ser
				115					120					125		
	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Lys	Asp
				130					135					140		
10	Ile	Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln	Asn	Gly	Val
				145					150					155		160
	Leu	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Met
				165						170					175	
	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Arg	His	Asn	Ser
15				180					185					190		
	Tyr	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Ile	Val	Lys
				195					200					205		
	Ser	Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys									
				210					215							
20	<210>	47														
	<211>	604														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial Sequence														
	<220>															
25	<223>	Synthetic Construct														
	<400>	47														
	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1			5						10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
30				20					25					30		
	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
				35				40					45			
	Ser	Ala	Ile	Ile	Gly	Ser	Gly	Ala	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
				50				55					60			
35	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70					75					80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
	Ala	Lys	Gly	Trp	Phe	Gly	Gly	Phe	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
40				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu
				115					120					125		
	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys
				130					135					140		
45	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser
	145					150					155					160
	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
				165						170					175	

RU 2761377 C2

	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp
					180				185					190		
	Pro	Ser	Gln	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr
			195					200					205			
5	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly	Cys	Lys	Pro	Cys
		210					215					220				
	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys
	225					230					235					240
	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val
10					245					250					255	
	Val	Val	Ala	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp	Phe
				260					265					270		
	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
			275					280					285			
15	Gln	Ile	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met	His
		290					295					300				
	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser	Ala
	305					310					315					320
	Ala	Phe	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg
20					325					330					335	
	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Met
				340					345					350		
	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr	Asn	Phe	Phe	Pro
			355					360					365			
25	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu	Asn
		370					375					380				
	Tyr	Asp	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asp	Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Val
	385					390					395					400
	Tyr	Ser	Asp	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn	Thr
30					405					410					415	
	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Glu
				420					425					430		
	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
			435					440					445			
35	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Ala	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Ser
		450					455					460				
	Ser	Thr	Ala	Glu	Ala	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
	465					470					475					480
	Gln	His	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Met	Asp	Leu	Gln	Glu	Leu	Leu	Ser	Arg
40					485					490					495	
	Met	Glu	Asn	Tyr	Arg	Asn	Leu	Lys	Leu	Pro	Arg	Met	Leu	Thr	Ala	Lys
				500					505					510		
	Phe	Ala	Leu	Pro	Lys	Gln	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	Asp	Leu	Gln	Cys	Leu
			515					520					525			
45	Glu	Asp	Glu	Leu	Gly	Pro	Leu	Arg	His	Val	Leu	Asp	Gly	Thr	Gln	Ser
		530					535					540				
	Lys	Ser	Phe	Gln	Leu	Glu	Asp	Ala	Glu	Asn	Phe	Ile	Ser	Asn	Ile	Arg
	545					550				555						560

RU 2761377 C2

	Val	Thr	Val	Val	Lys	Leu	Lys	Gly	Ser	Asp	Asn	Thr	Phe	Glu	Cys	Gln
					565					570					575	
	Phe	Asp	Asp	Glu	Ser	Ala	Thr	Val	Val	Asp	Phe	Leu	Arg	Arg	Trp	Ile
				580					585					590		
5	Ala	Phe	Ala	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Ser	Pro	Gln				
			595					600								
	<210>	48														
	<211>	441														
	<212>	PRT														
10	<213>	Artificial Sequence														
	<220>															
	<223>	Synthetic Construct														
	<400>	48														
	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
15	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30		
	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
				35				40					45			
20	Ser	Ala	Ile	Ile	Gly	Ser	Gly	Ala	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70				75						80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
25					85					90					95	
	Ala	Lys	Gly	Trp	Phe	Gly	Gly	Phe	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu
				115				120					125			
30	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys
		130					135					140				
	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser
	145					150				155					160	
	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
35					165					170					175	
	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp
				180					185				190			
	Pro	Ser	Gln	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr
			195				200						205			
40	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly	Cys	Lys	Pro	Cys
		210					215					220				
	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys
	225					230				235					240	
	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val
45					245					250					255	
	Val	Val	Ala	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp	Phe
				260					265				270			
	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu

RU 2761377 C2

	275		280		285
	Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His				
	290		295		300
5	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala				
	305		310		315
	Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg				
		325		330	335
	Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Lys Gln Met				
		340		345	350
10	Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn Phe Phe Pro				
		355		360	365
	Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn				
		370		375	380
15	Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val				
		385		390	395
	Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr				
		405		410	415
	Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu				
		420		425	430
20	Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys				
		435		440	
	<210> 49				
	<211> 215				
	<212> PRT				
25	<213> Artificial Sequence				
	<220>				
	<223> Synthetic Construct				
	<400> 49				
30	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly				
	1	5	10	15	
	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser				
		20	25	30	
	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu				
		35	40	45	
35	Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser				
		50	55	60	
	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu				
		65	70	75	80
	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro				
40		85	90	95	
	Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala				
		100	105	110	
	Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser				
		115	120	125	
45	Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp				
		130	135	140	
	Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val				
		145	150	155	160

RU 2761377 C2

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
 180 185 190
 5 Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215
 <210> 50
 10 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 15 <400> 50
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ser
 20 20 25 30
 Tyr Arg Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Arg Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile Asn Ser Ala Gly Ile Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Arg Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 25 65 70 75 80
 Leu Gln Val Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Asp Asn Met Gly Thr Thr Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 30 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val
 115 120 125
 Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr
 35 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser
 180 185 190
 40 Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 195 200 205
 Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile
 210 215 220
 Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Ala Ala Gly Gly
 45 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp

RU 2761377 C2

		260		265		270											
		Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His
		275							280					285			
		Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg
5		290						295					300				
		Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys
		305					310				315					320	
		Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu
					325						330					335	
10		Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr
					340					345					350		
		Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu
					355				360					365			
		Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp
15		370					375				380						
		Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val
		385				390					395					400	
		Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu
					405						410				415		
20		Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His
					420					425					430		
		Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro
				435				440					445				
		Gly	Lys														
25		450															
		<210>	51														
		<211>	218														
		<212>	PRT														
		<213>	Artificial Sequence														
30		<220>															
		<223>	Synthetic Construct														
		<400>	51														
		Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Gly	Thr	Leu	Pro	Asn	Pro	Val	Pro	Ser	Gly
		1			5					10					15		
35		Glu	Ser	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser
				20					25					30			
		Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
				35				40					45				
		Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Met	Ser	Thr	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Ser
40				50				55					60				
		Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
		65				70				75					80		
		Ser	Gly	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly
					85					90					95		
45		Leu	Glu	Phe	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg
				100					105					110			
		Thr	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln
				115				120						125			

	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
	130						135					140				
	Pro	Lys	Asp	Ile	Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln
	145				150					155						160
5	Asn	Gly	Val	Leu	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
				165					170					175		
	Tyr	Ser	Met	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Arg
				180				185						190		
	His	Asn	Ser	Tyr	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro
10			195				200						205			
	Ile	Val	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys						
	210						215									

(57) Формула изобретения

1. Иммуноконъюгат для таргетинга к цитотокическим Т-лимфоцитам, содержащий
 (I) антитело, которое связывается с PD-1, и (II) мутантный IL-2 полипептид, в котором мутантный полипептид IL-2 представляет собой молекулу человеческого IL-2, содержащую три или пять аминокислотных замен F42A/Y45A/L72G или T3A/F42A/Y45A/L72G/C125A - нумерация относительно последовательности человеческого IL-2 SEQ ID NO: 19, и слит на его аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой одной из субъединиц Fc-домена, в частности с первой субъединицей Fc-домена, через линкерный пептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
 где антитело включает
 (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую HVR-H1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HVR-H2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HVR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и FR-H3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 в положениях 71-73 согласно нумерации Кэбота, и
 (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую HVR-L1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HVR-L2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и HVR-L3, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.
2. Иммуноконъюгат по п. 1, в котором мутантный полипептид IL-2 представляет собой молекулу человеческого IL-2, содержащую аминокислотные замены F42A, Y45A и L72G - нумерация относительно последовательности человеческого IL-2 SEQ ID NO: 19.
3. Иммуноконъюгат по одному из пп. 1, 2, где иммуноконъюгат содержит не более одного мутантного полипептида IL-2.
4. Иммуноконъюгат по одному из пп. 1-3, в котором антитело содержит Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц.
5. Иммуноконъюгат по п. 4, в котором Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG-класса, в частности Fc-домен IgG1-подкласса.
6. Иммуноконъюгат по п. 4 или 5, в котором Fc-домен представляет собой человеческий Fc-домен.
7. Иммуноконъюгат по одному из пп. 1-6, в котором антитело представляет собой

иммуноглобулин IgG-класса, в частности IgG1-подкласса.

8. Иммуноконъюгат по одному из пп. 4-7, в котором Fc-домен содержит модификацию, способствующую ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена.

9. Иммуноконъюгат по одному из пп. 4-8, в котором в СНЗ-доме первой субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, который имеет больший объем боковой цепи, что приводит к образованию выпуклости на СНЗ-доме первой субъединицы, которая может помещаться в полость в СНЗ-доме второй субъединицы, и в СНЗ-доме второй субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, который имеет меньший объем боковой цепи, что приводит к образованию полости в СНЗ-доме второй субъединицы, в которую может помещаться выпуклость на СНЗ-доме первой субъединицы.

10. Иммуноконъюгат по одному из пп. 4-9, в котором в первой субъединице Fc-домена остаток треонина в положении 366 замен на остаток триптофана (T366W), а во второй субъединице Fc-домена остаток тирозина в положении 407 заменен на остаток валина (Y407V) и необязательно остаток треонина в положении 366 заменен на остаток серина (T366S) и остаток лейцина в положении 368 заменен на остаток аланина (L368A) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

11. Иммуноконъюгат по п. 10, в котором в первой субъединице Fc-домена дополнительно остаток серина в положении 354 заменен на остаток цистеина (S354C) или остаток глутаминовой кислоты в положении 356 заменен на остаток цистеина (E356C) и во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток тирозина в положении 349 заменен на остаток цистеина (Y349C) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

12. Иммуноконъюгат по одному из пп. 4-11, в котором в Fc-домен содержит одну или несколько аминокислотную(ых) замену(н), которая(ые) снижает(ют) связывание с Fc-рецептором, в частности Fcγ-рецептором, и/или эффекторную функцию, в частности антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC).

13. Иммуноконъюгат по п. 12, в котором указанная(ые) одна или несколько аминокислотная(ых) замена(н) находится(ятся) в одном или нескольких положениях(ях), выбранном(ых) из группы L234, L235 и P329 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

14. Иммуноконъюгат по одному из пп. 4-13, в котором каждая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

15. Иммуноконъюгат по одному из пп. 1-14, содержащий полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 22, полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24, и полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 25.

16. Иммуноконъюгат по одному из пп. 1-15, который практически состоит из мутантного полипептида IL-2 и молекулы иммуноглобулина IgG1, соединенных линкерной последовательностью.

17. Способ получения иммуноконъюгата по одному из пп. 1-16, включающий (а) культивирование клетки-хозяина в условиях, пригодных для экспрессии иммуноконъюгата, и (б) выделение иммуноконъюгата.

18. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая иммуноконъюгат (ы) по одному из пп. 1-16 в эффективном количестве и фармацевтически приемлемый носитель.

19. Применение иммуноконъюгата по одному из пп. 1-16 для приготовления
5 лекарственного средства, предназначенного для лечения рака.

20. Способ лечения рака у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве композиции, которая содержит иммуноконъюгат по одному из пп. 1-16 в фармацевтически приемлемой форме.

21. Способ стимуляции иммунной системы индивидуума, включающий введение
10 указанному индивидууму в эффективном количестве композиции, которая содержит иммуноконъюгат по одному из пп. 1-16 в фармацевтически приемлемой форме.

15

20

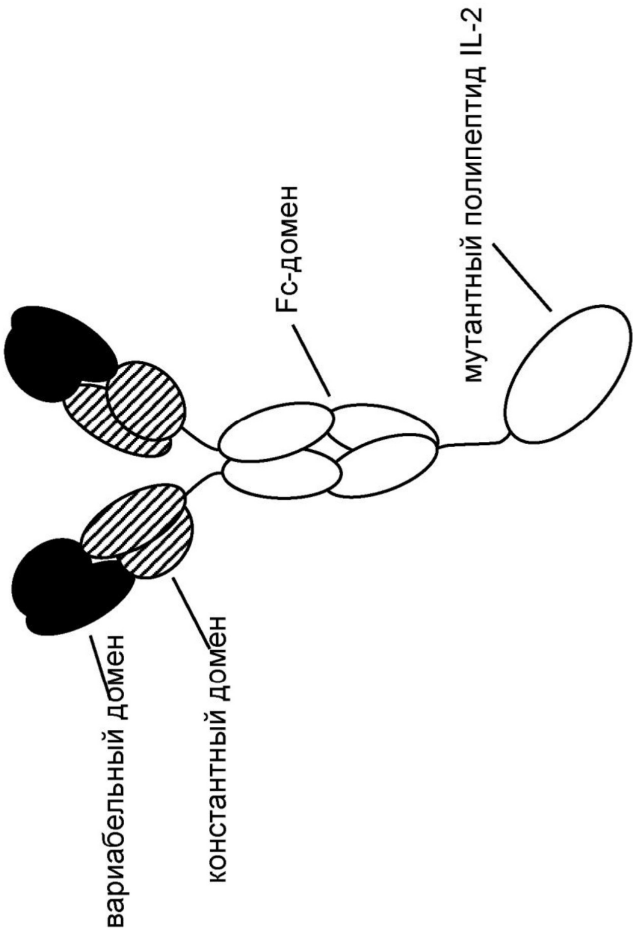
25

30

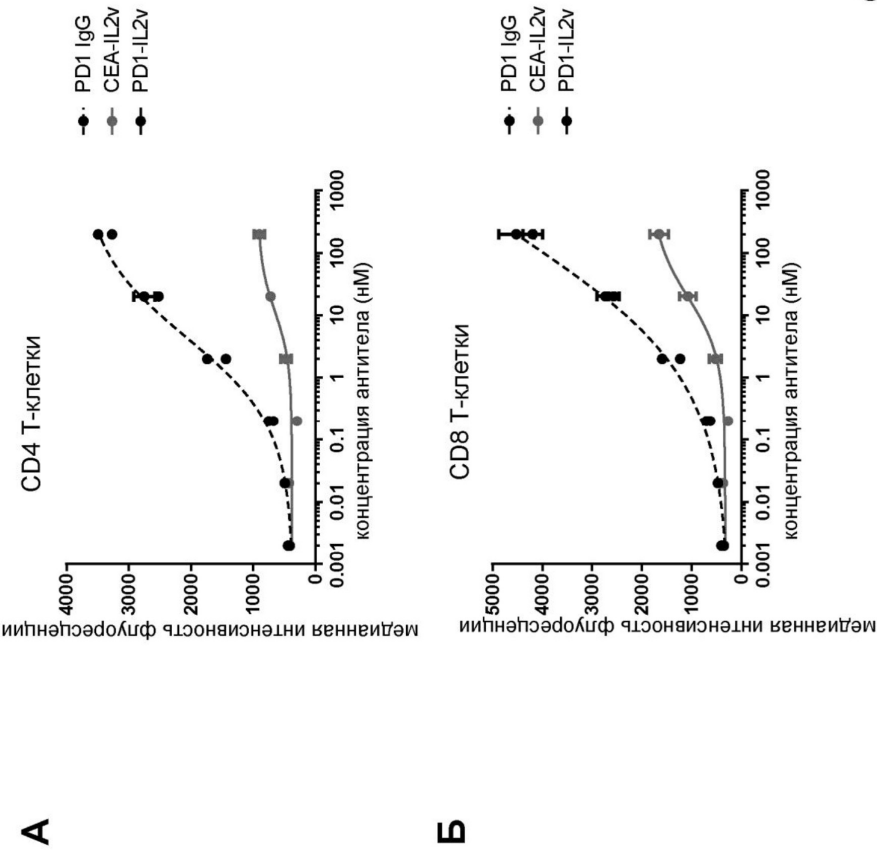
35

40

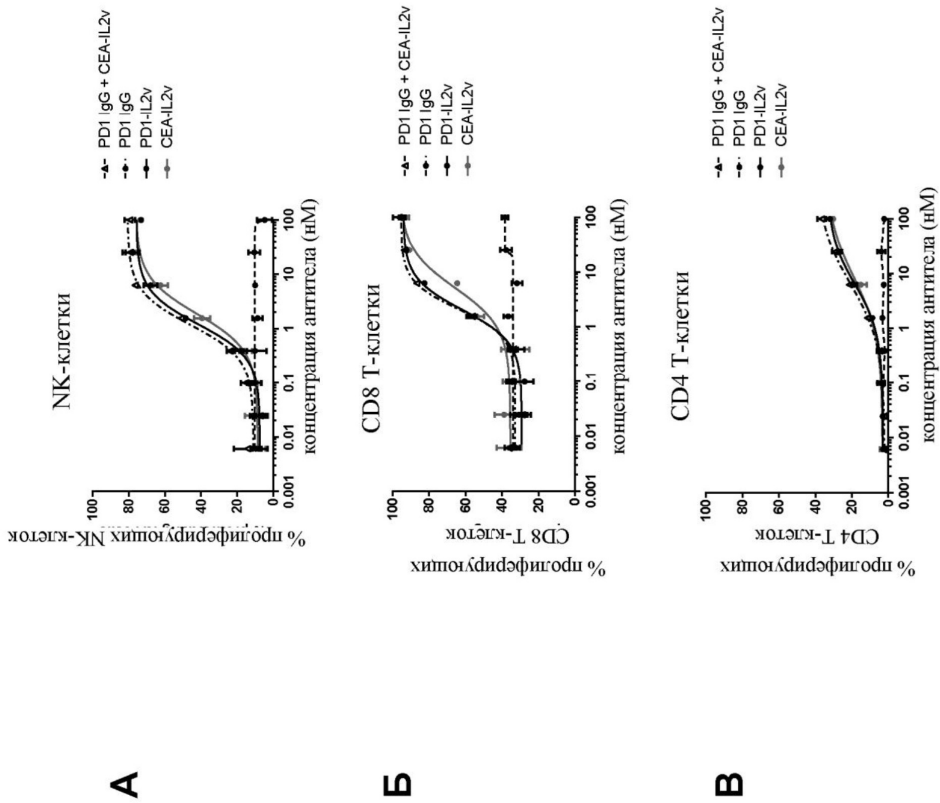
45



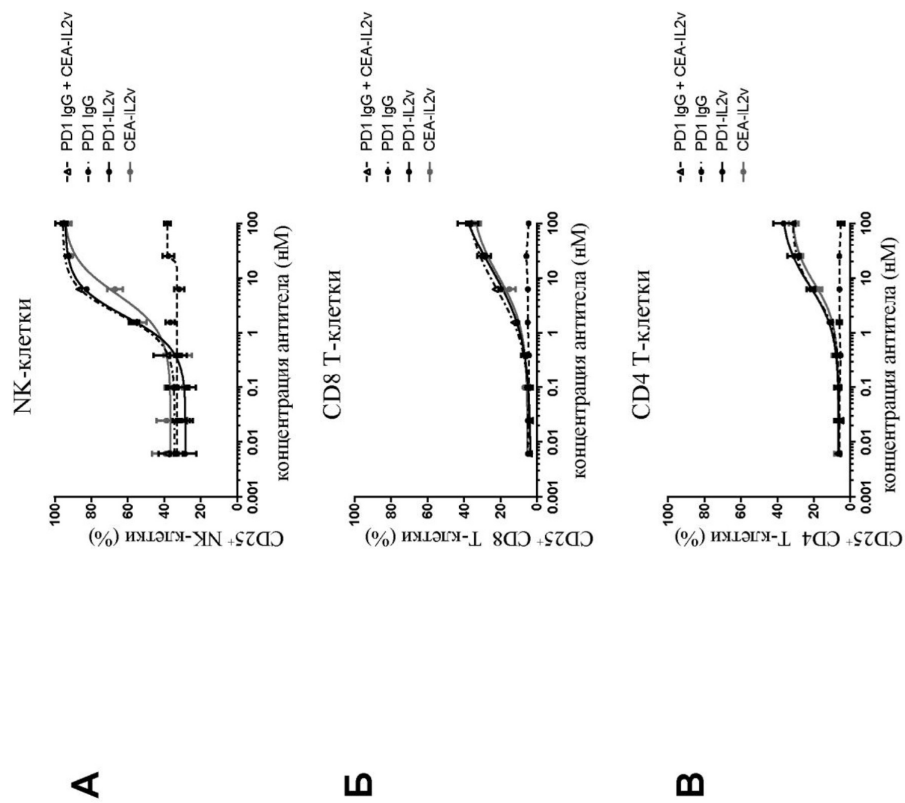
Фиг. 1



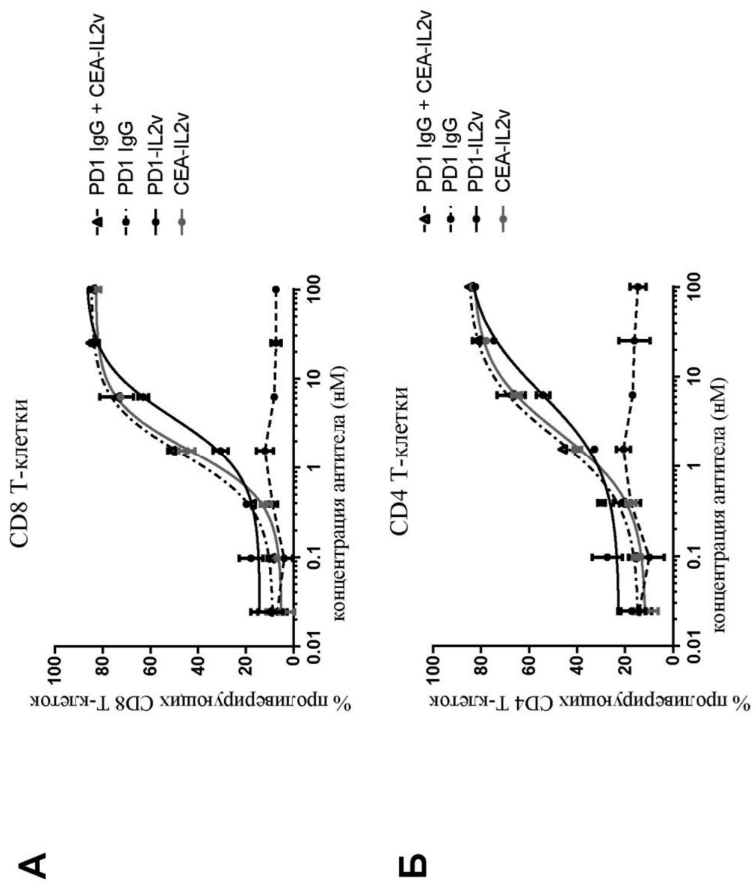
Фиг. 2



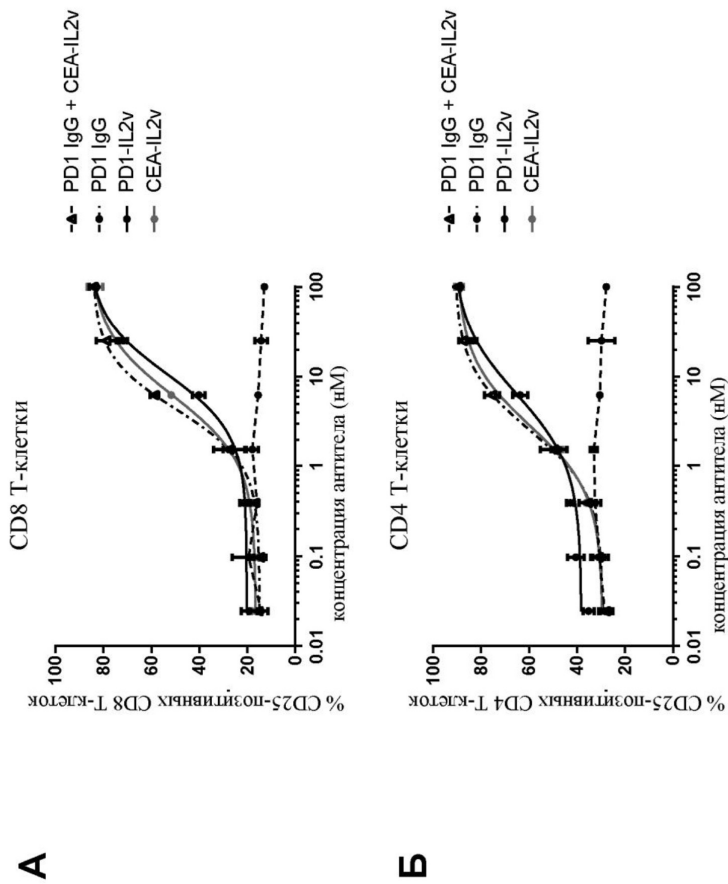
Фиг. 3



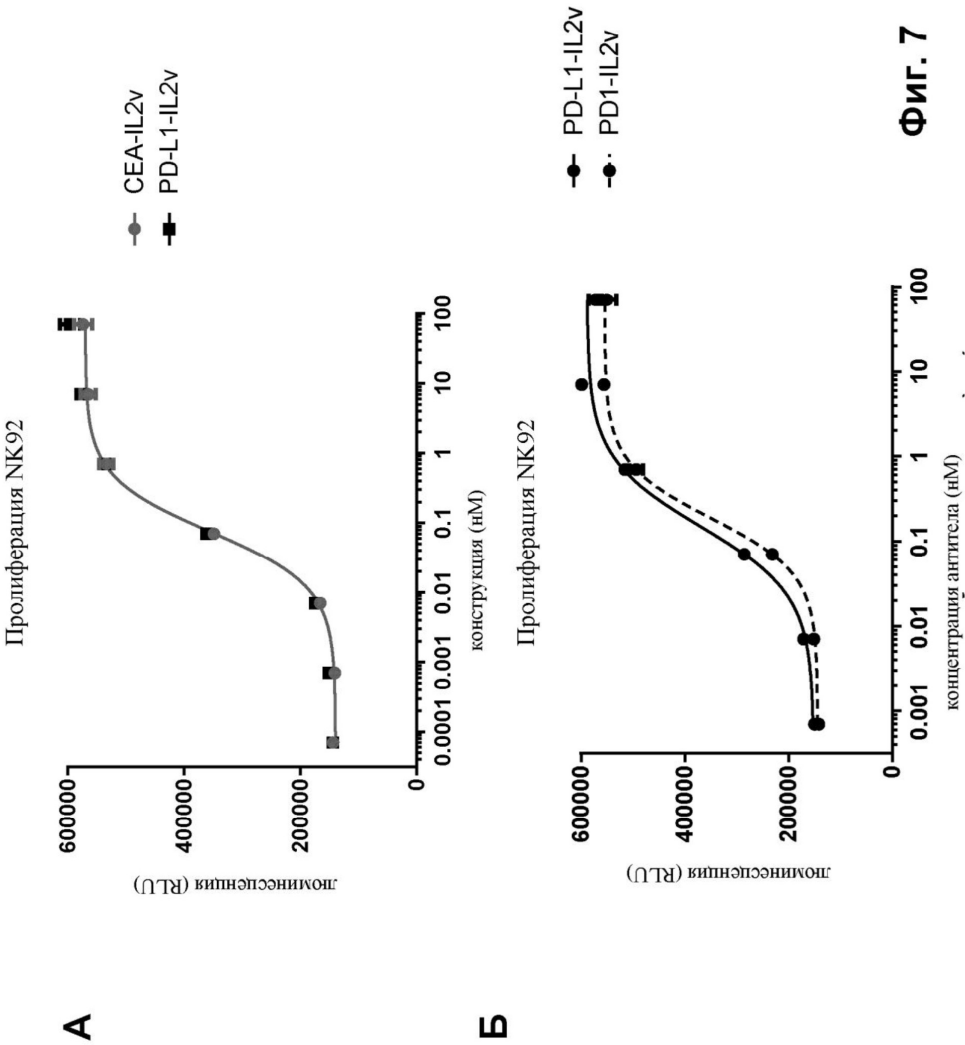
Фиг. 4

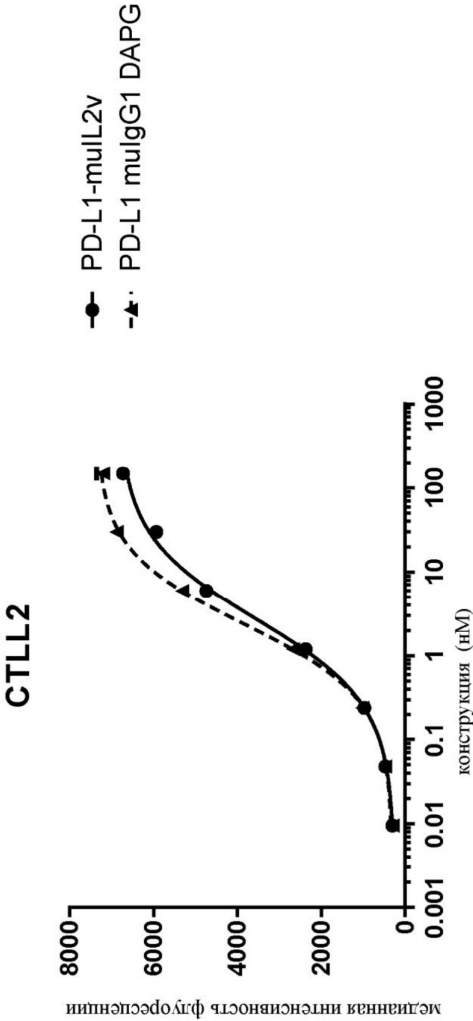


Фиг. 5

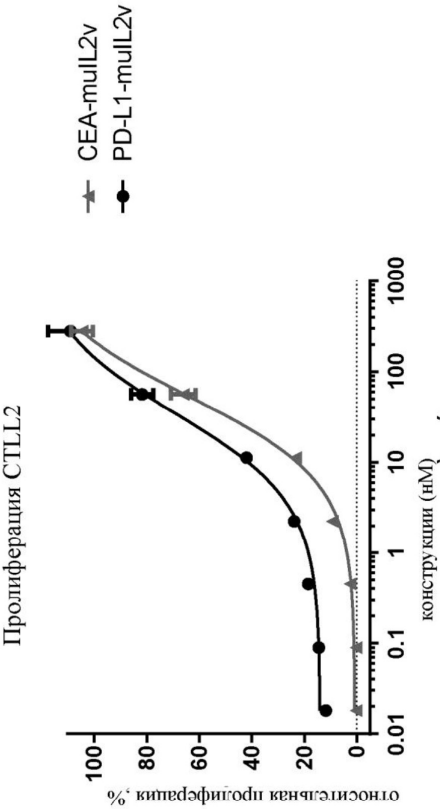


Фиг. 6

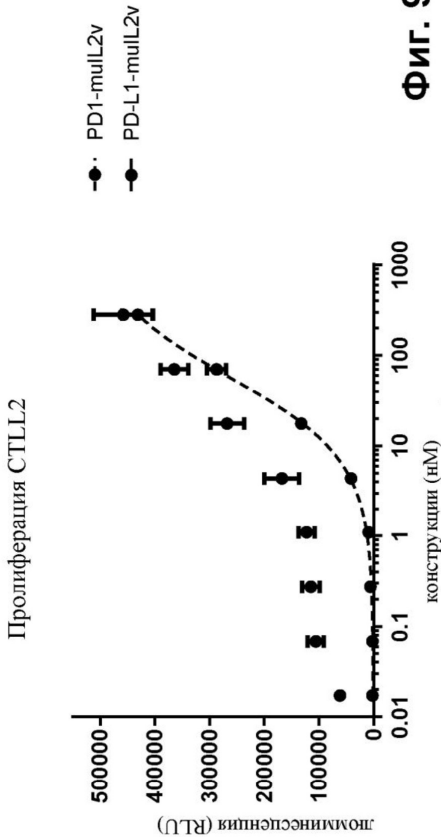




Фиг. 8

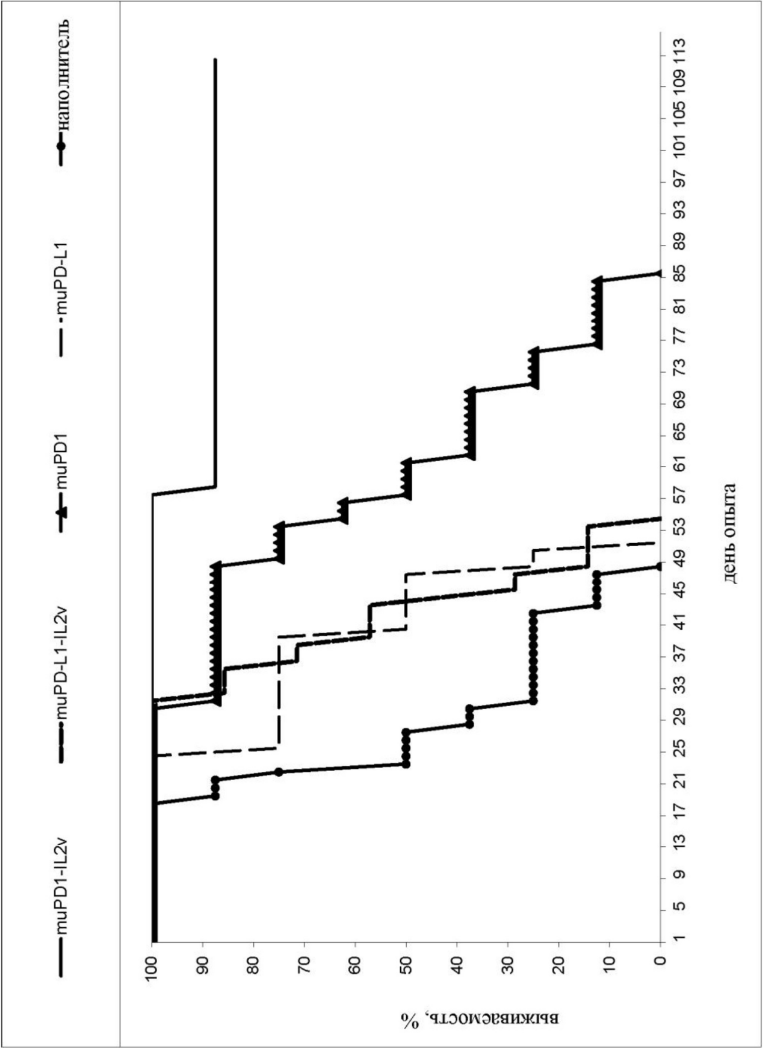


А

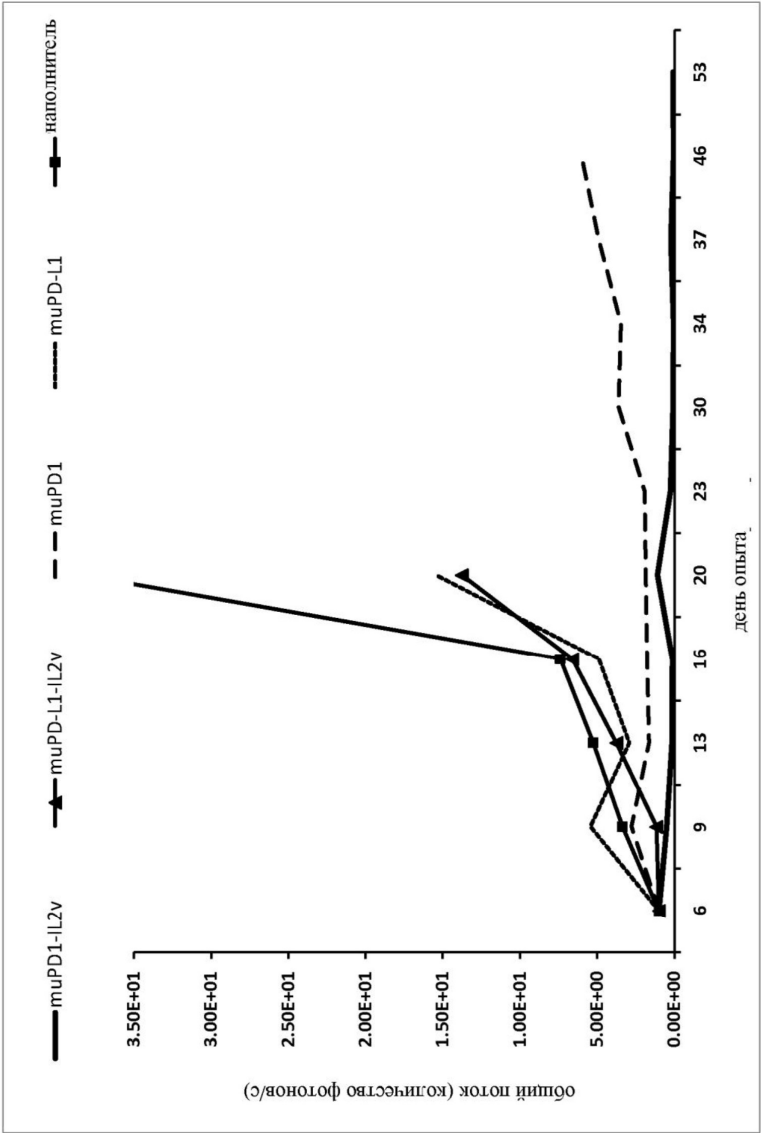


Б

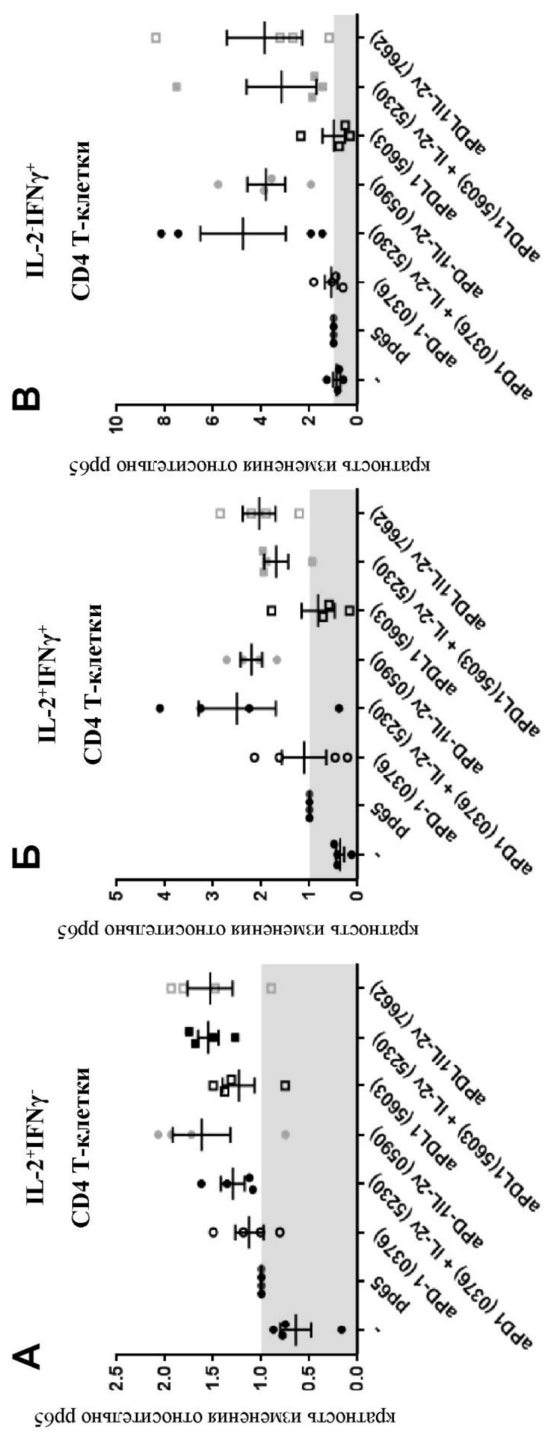
Фиг. 9



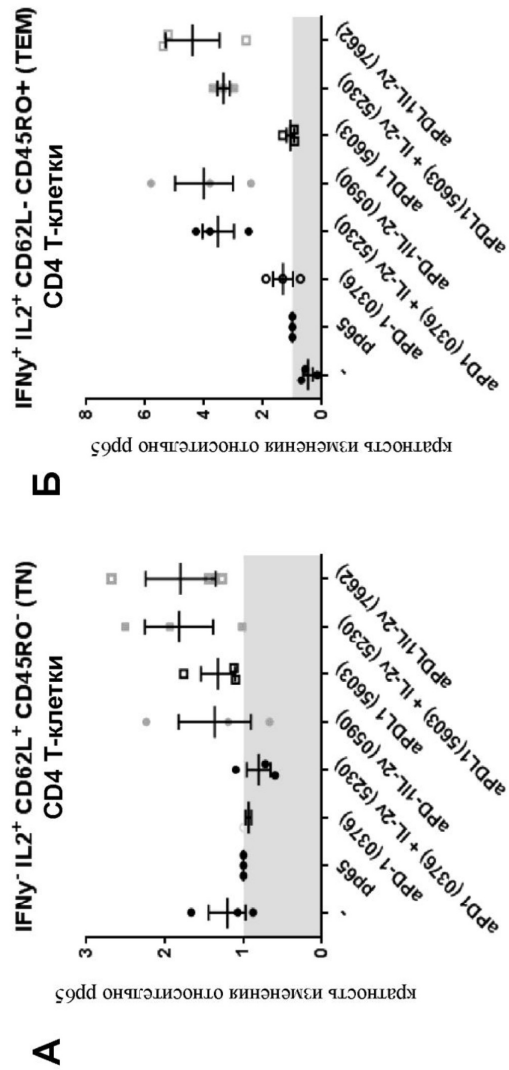
Фиг. 10



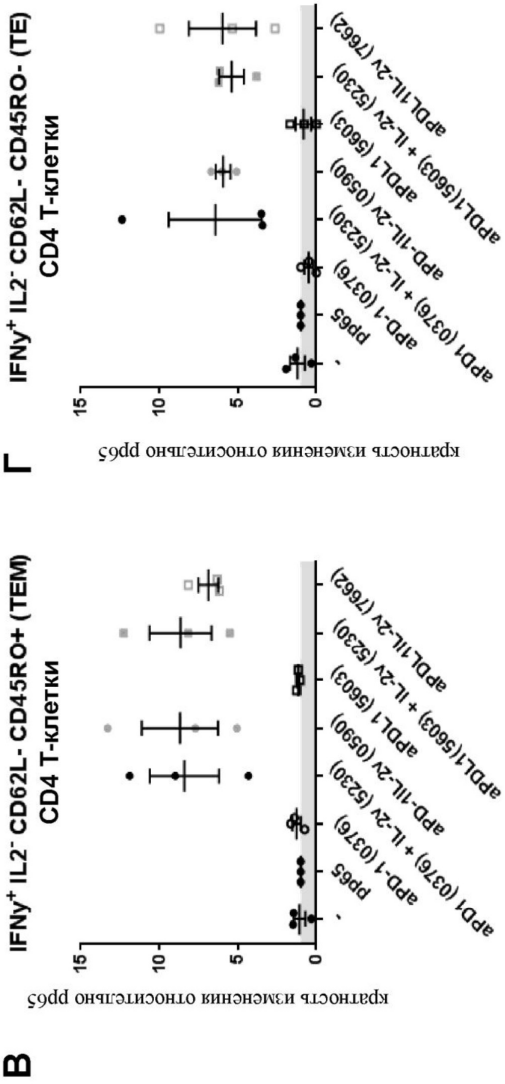
Фиг. 11



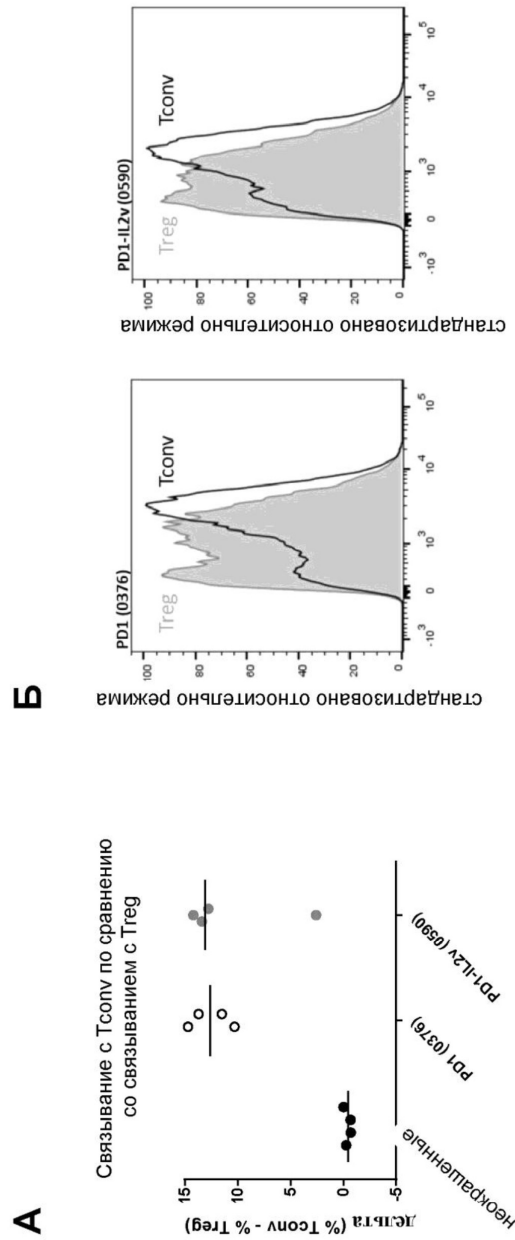
Фиг. 12



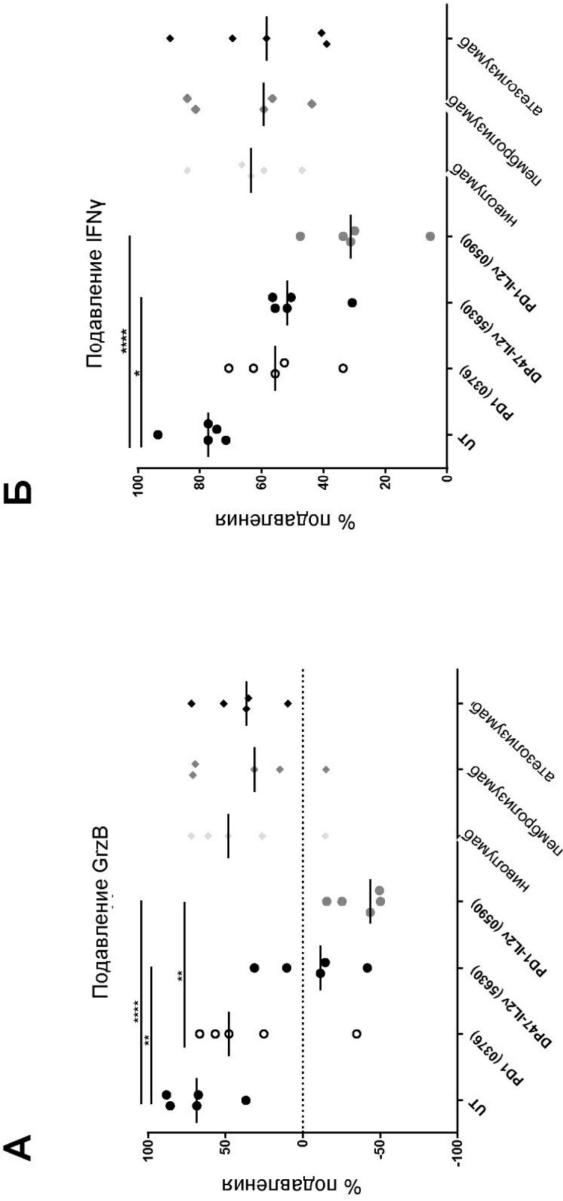
Фиг. 13



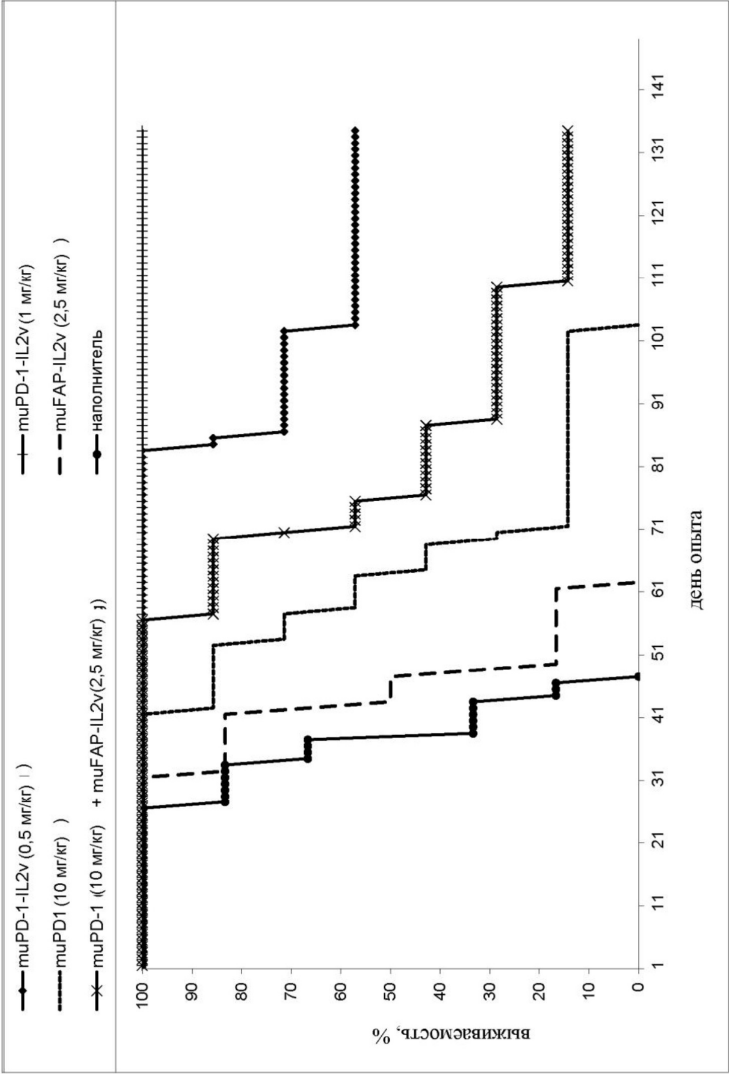
Фиг. 13



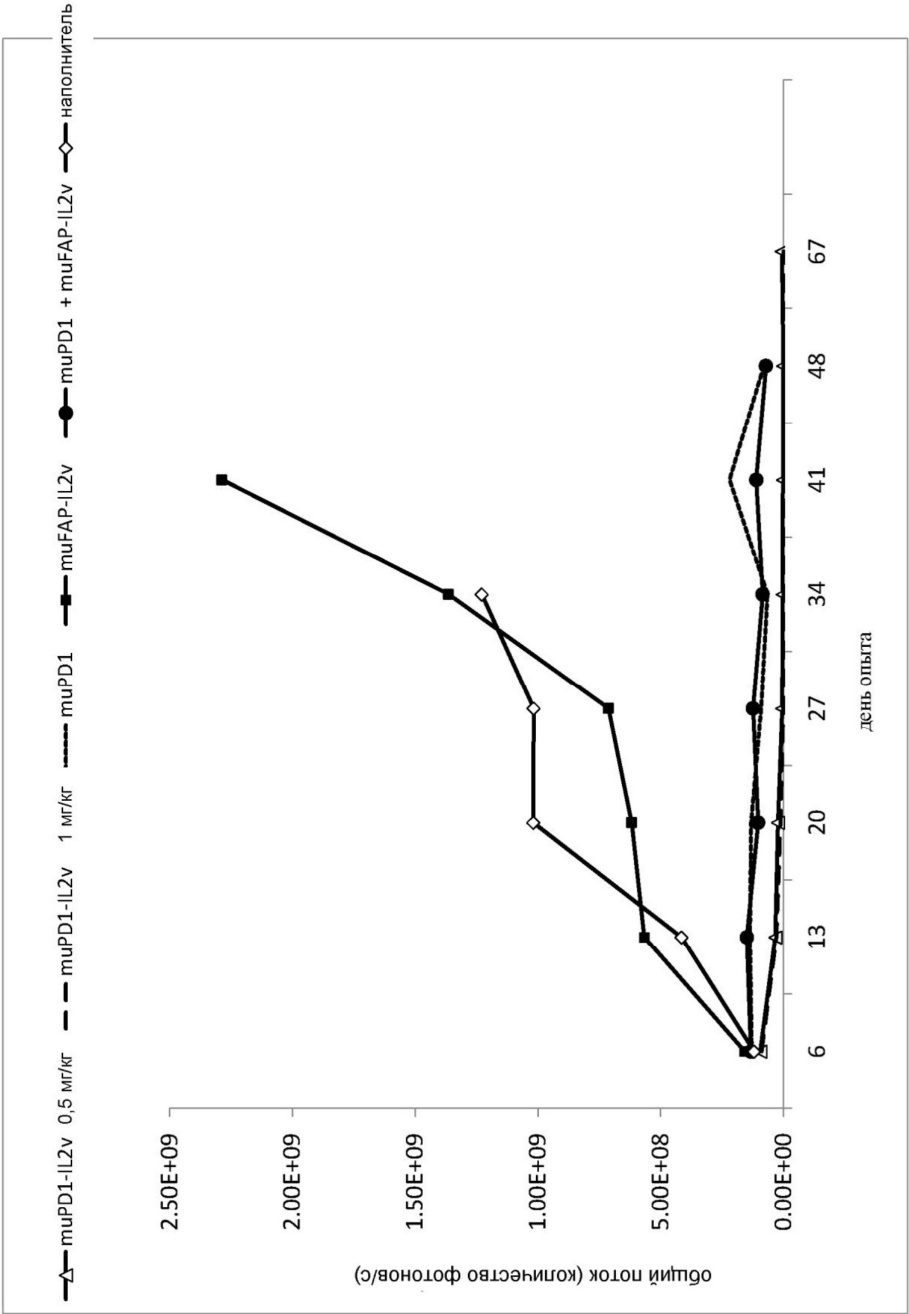
Фиг. 14



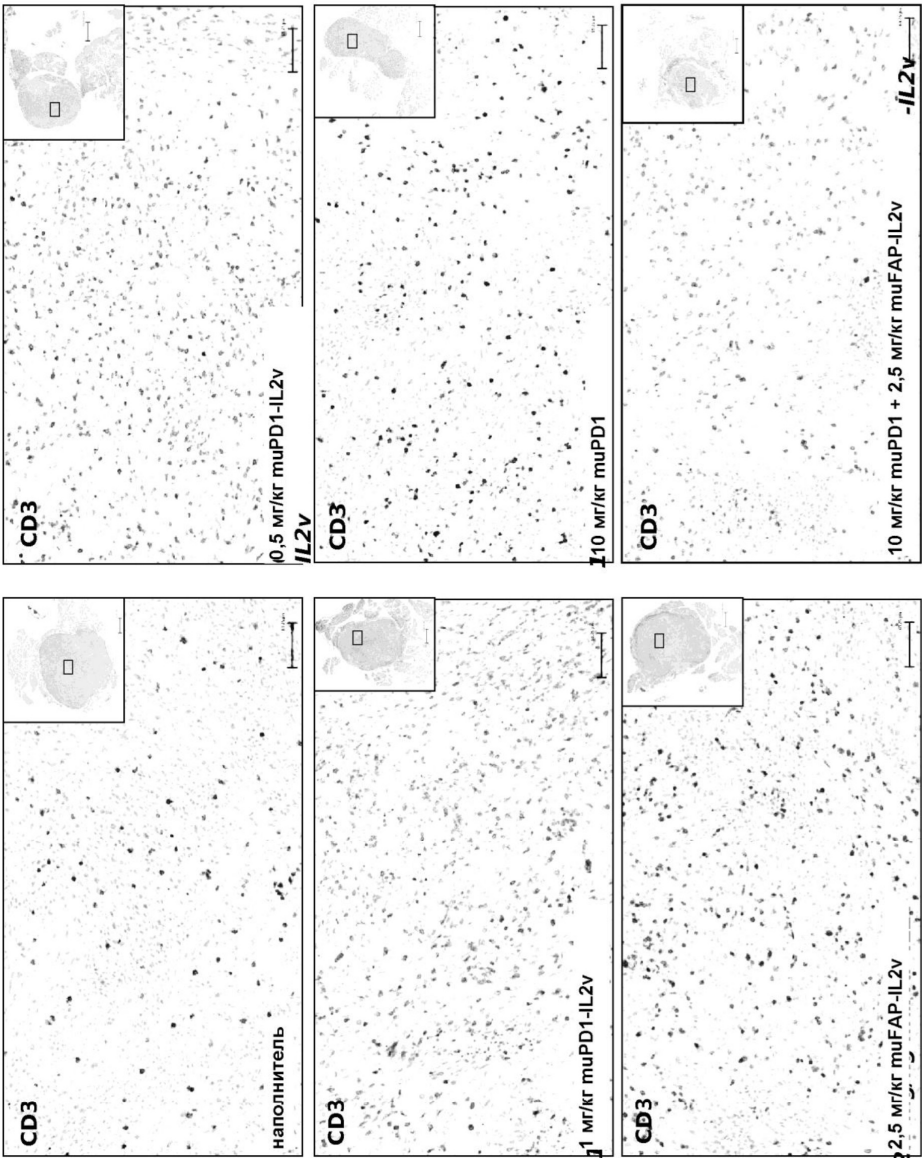
Фиг. 15



Фиг. 16

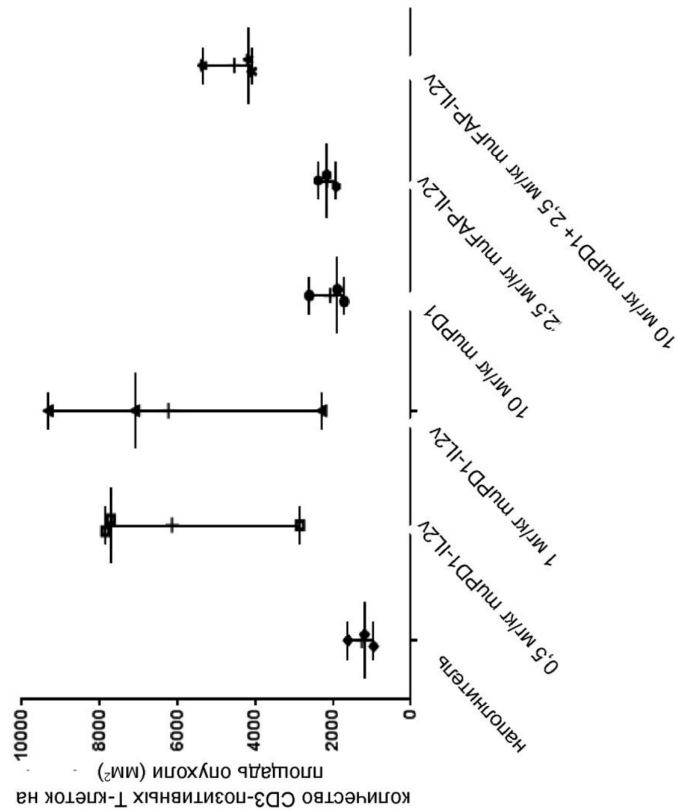


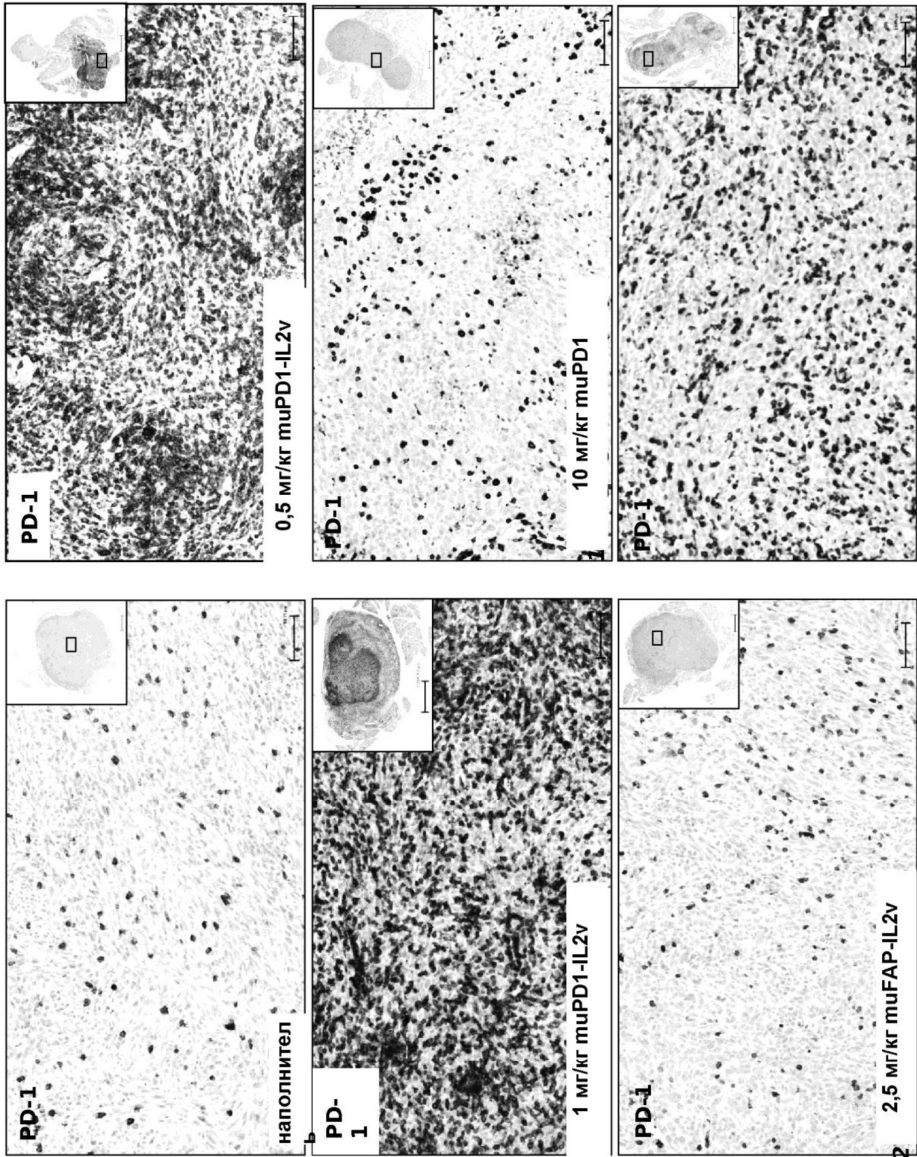
Фиг. 17



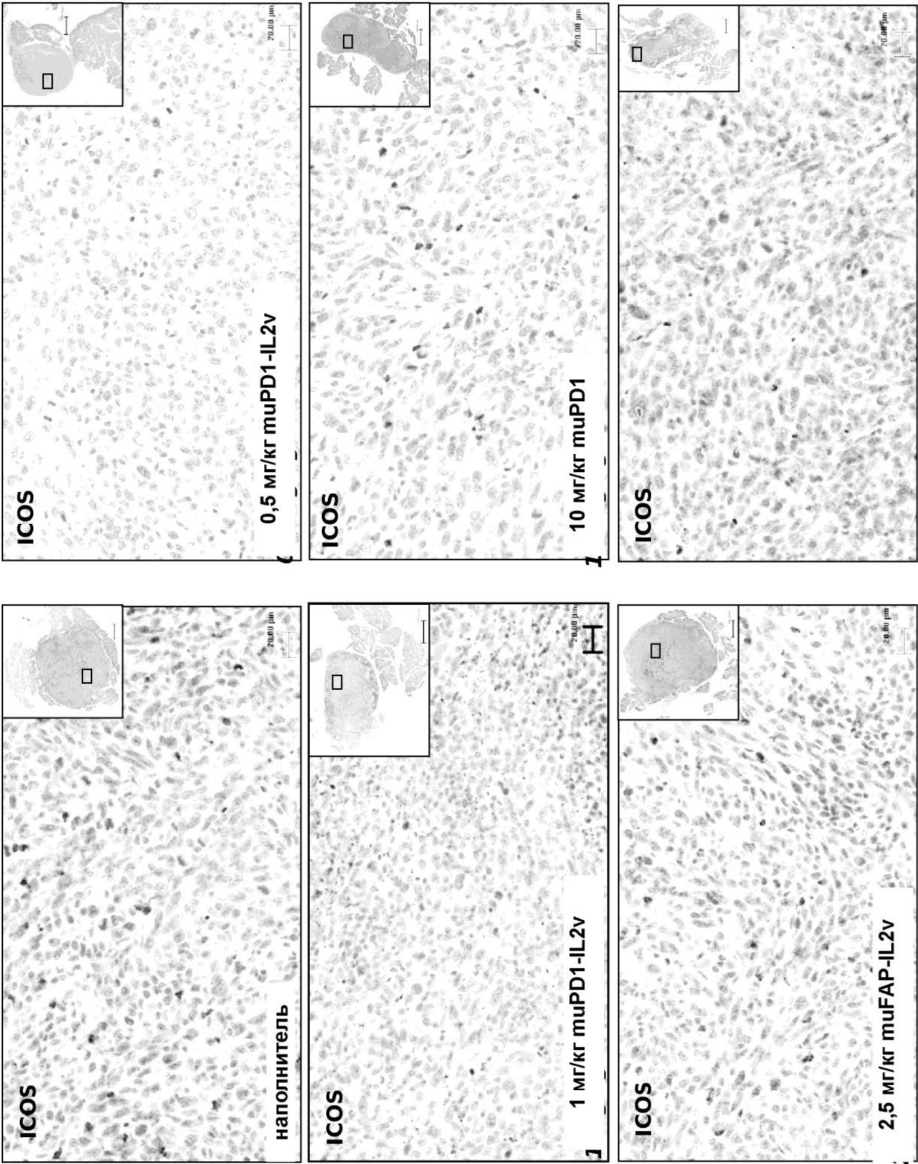
Фиг. 18А

Фиг. 18Б

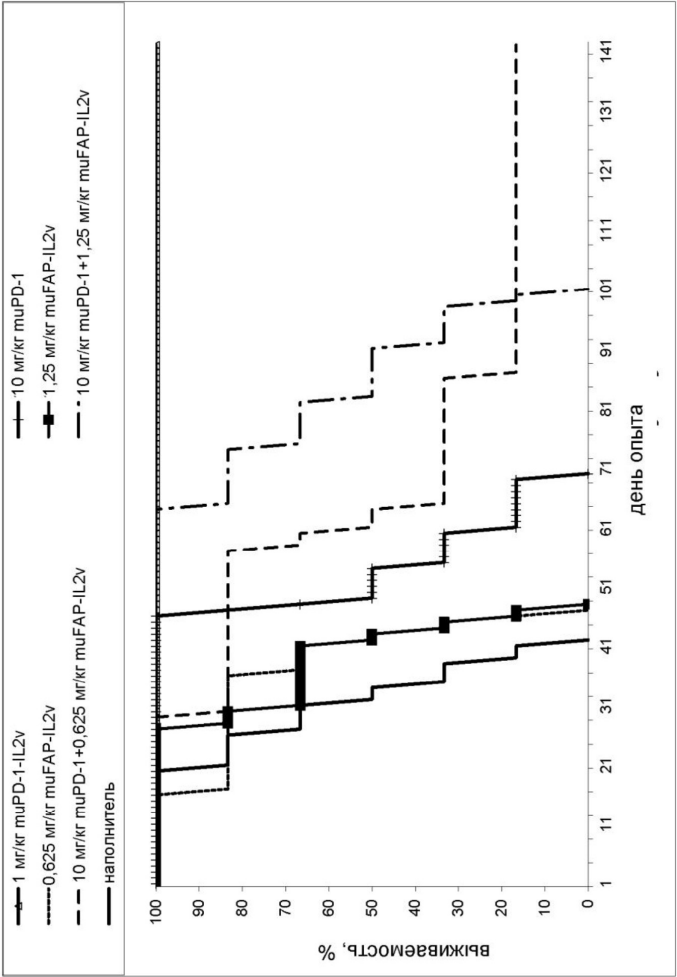




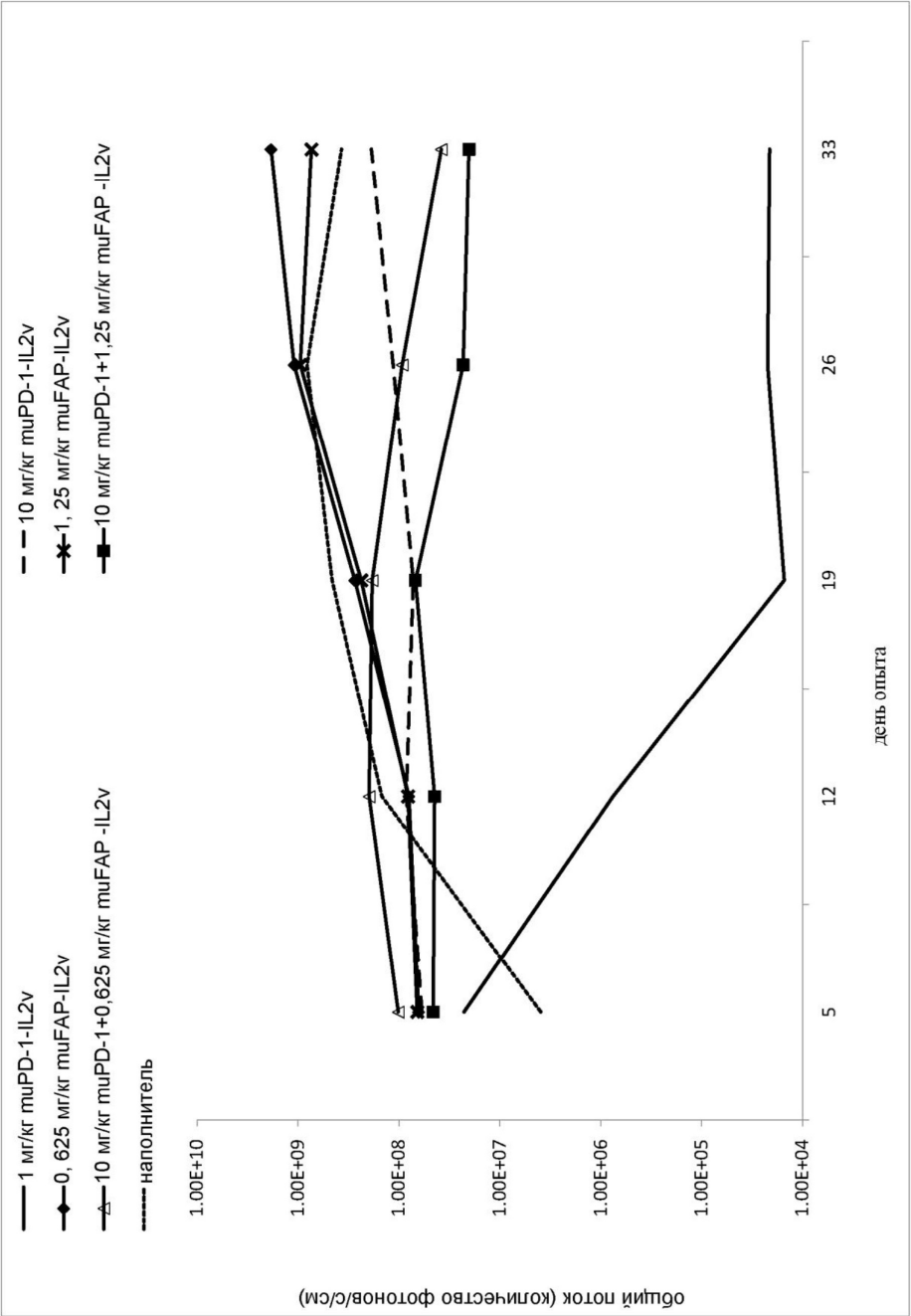
Фиг. 19



Фиг. 20

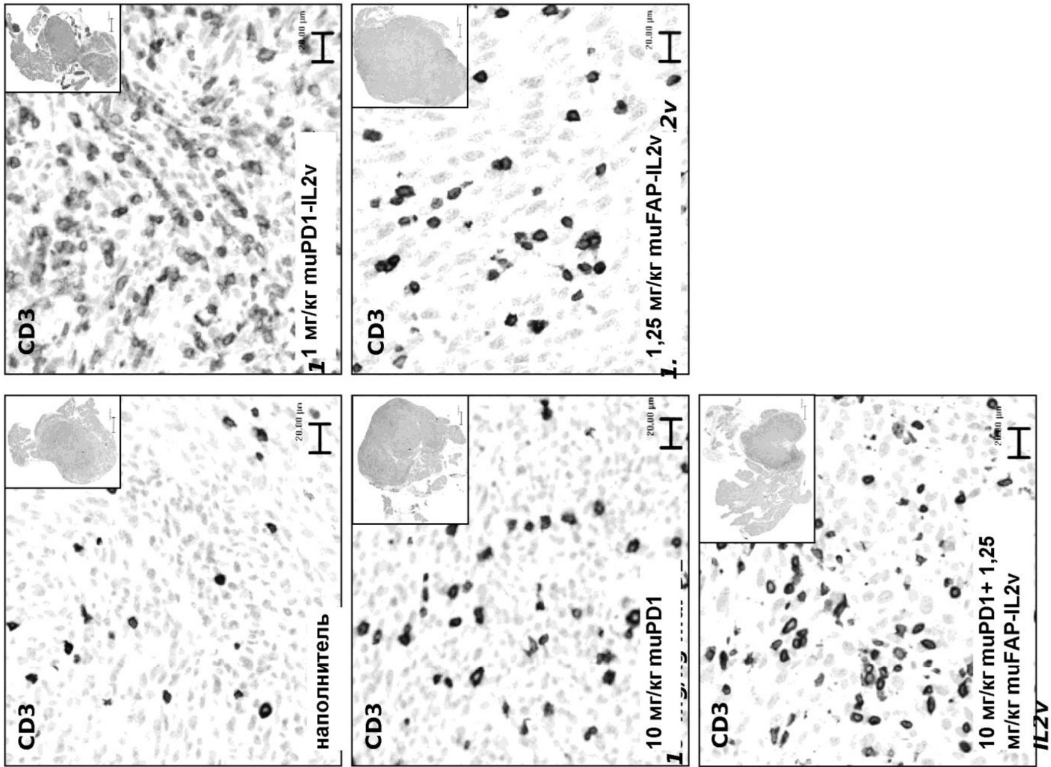


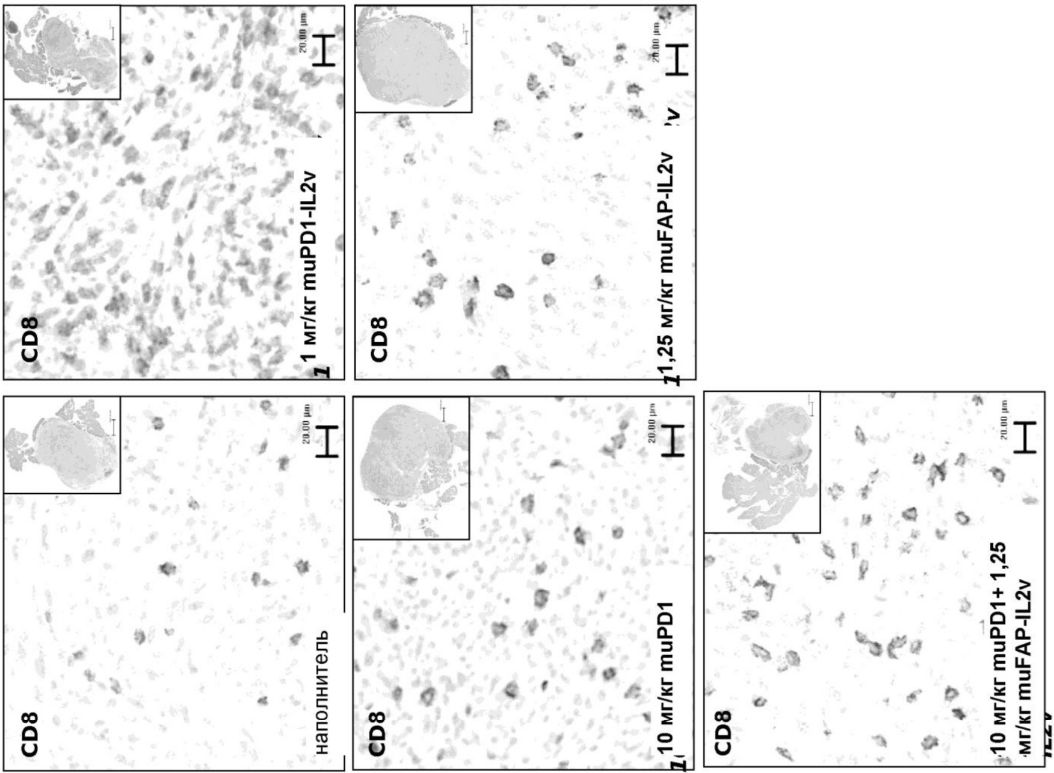
Фиг. 21



Фиг. 22

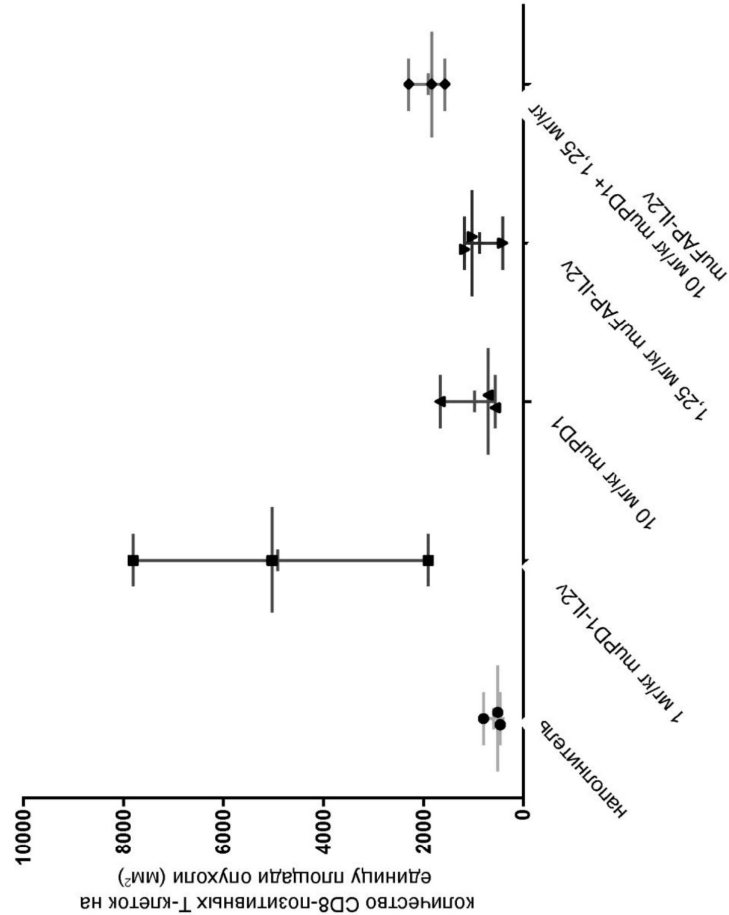
Фиг. 23



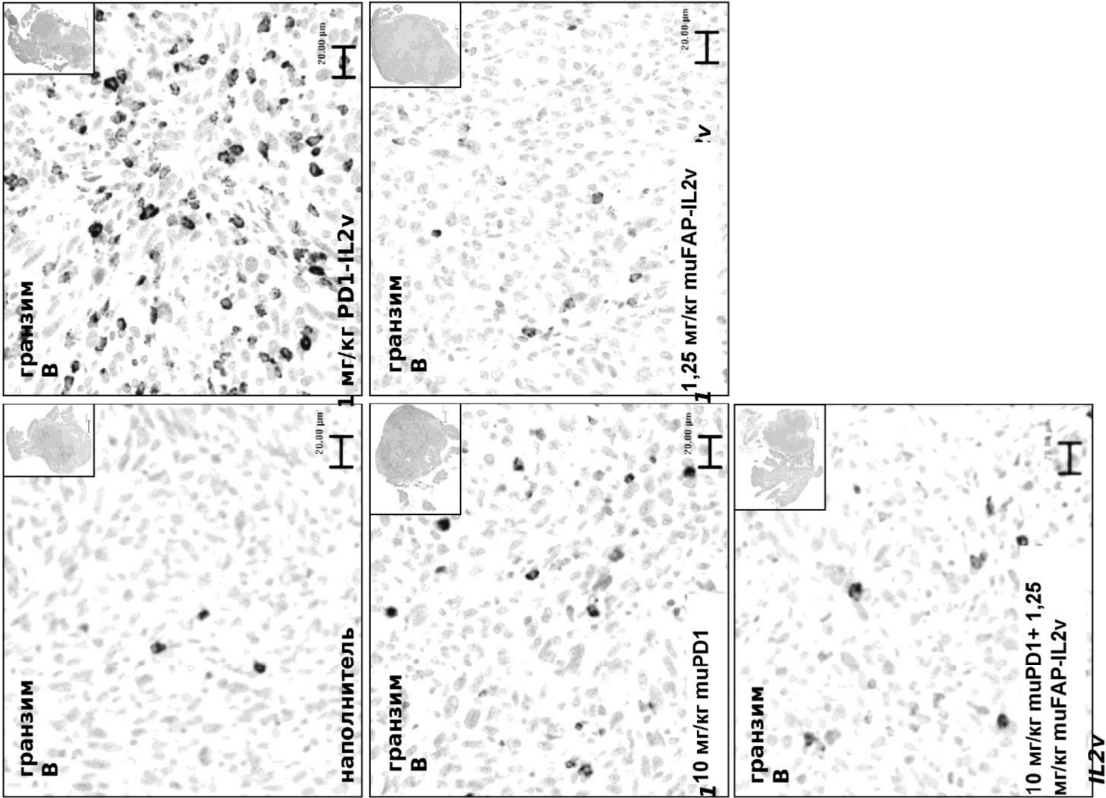


Фиг. 24А

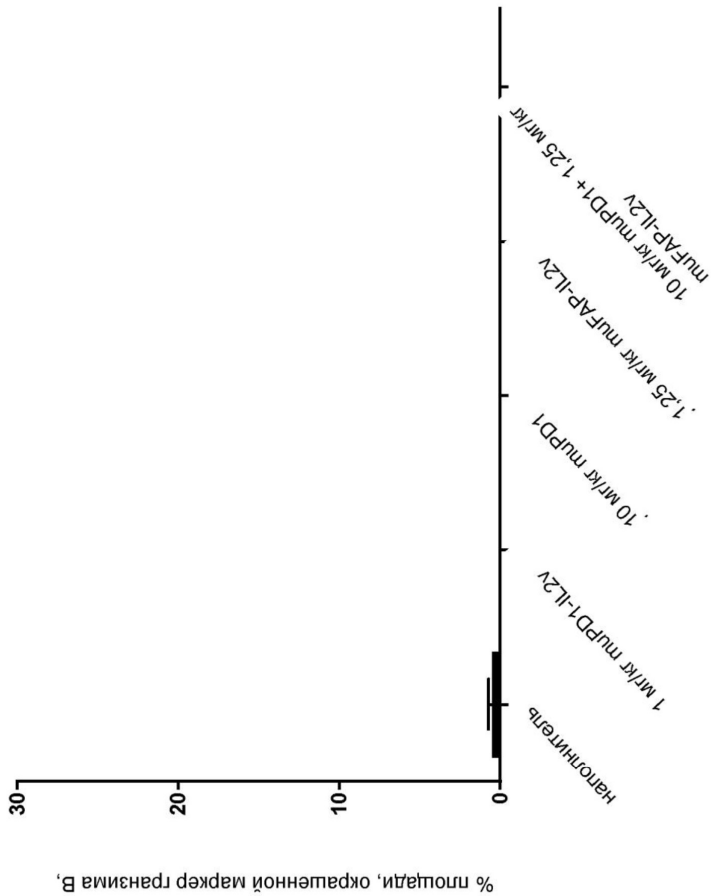
Фиг. 24Б

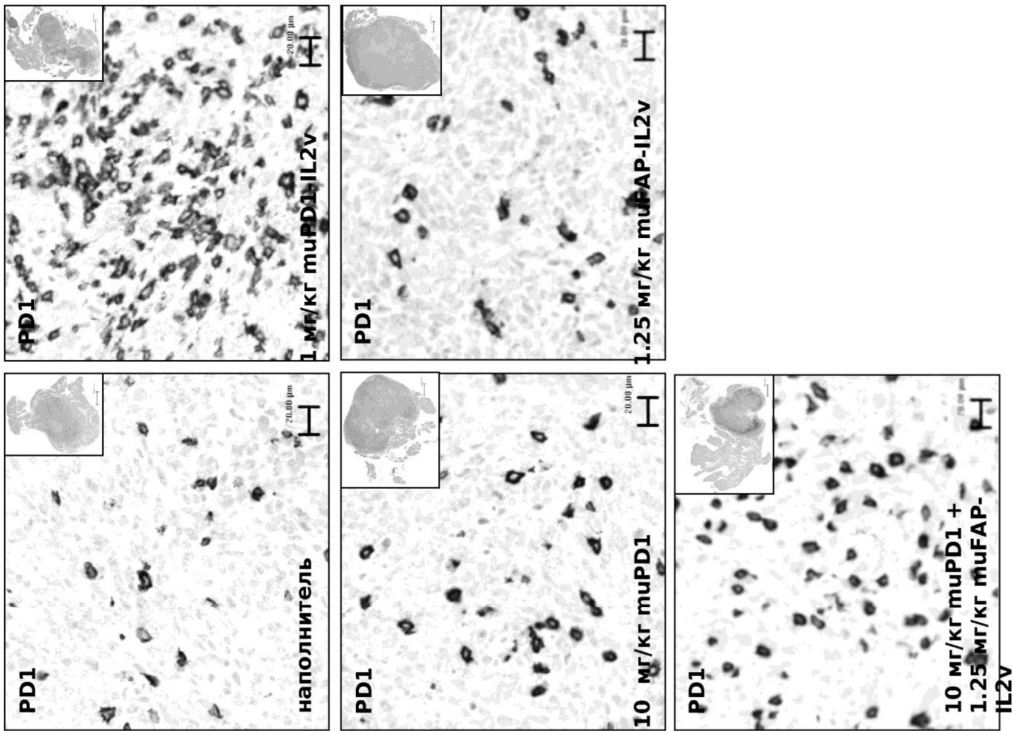


Фиг. 25А



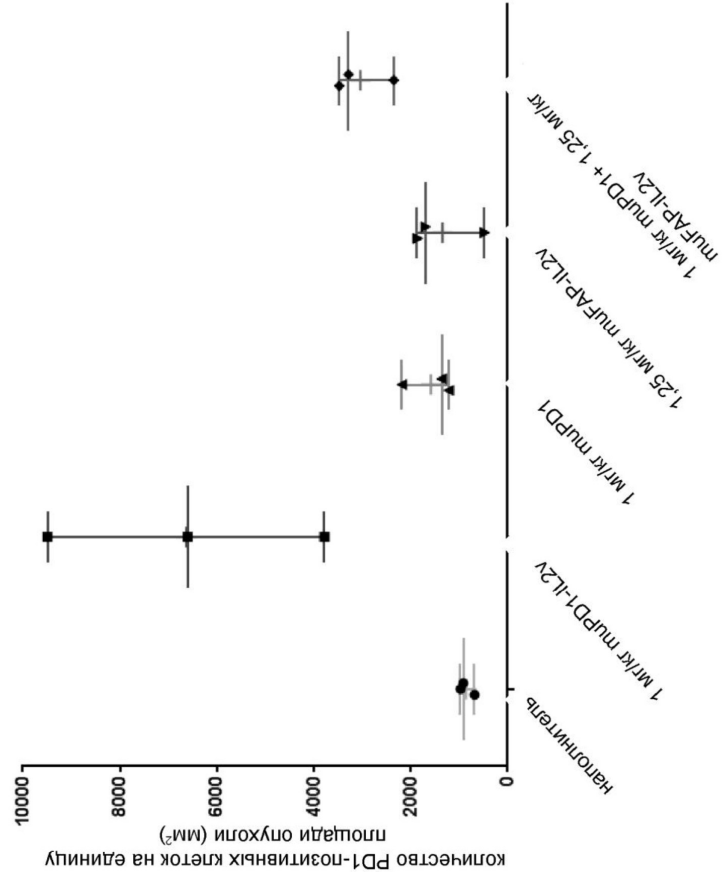
Фиг. 25Б



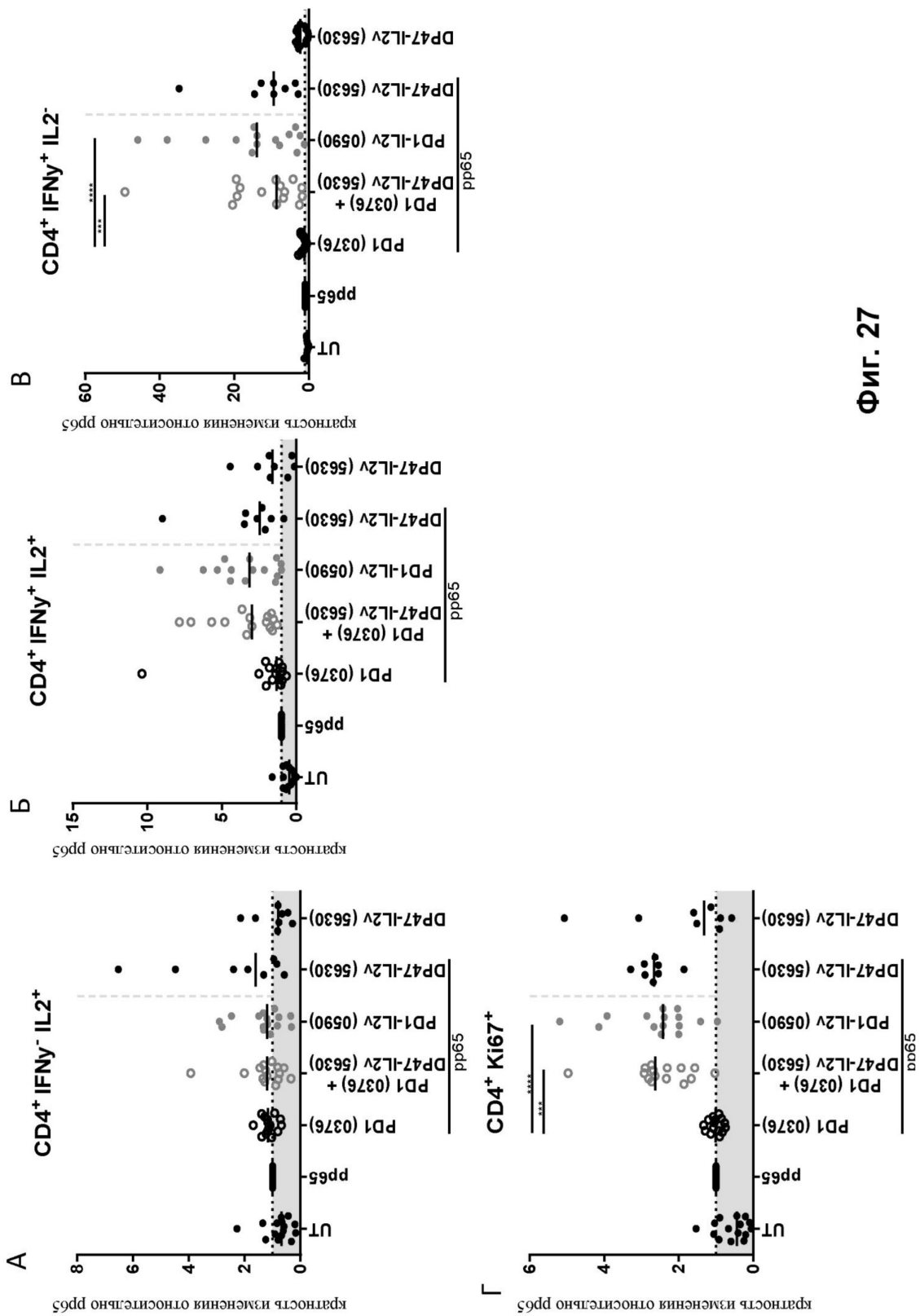


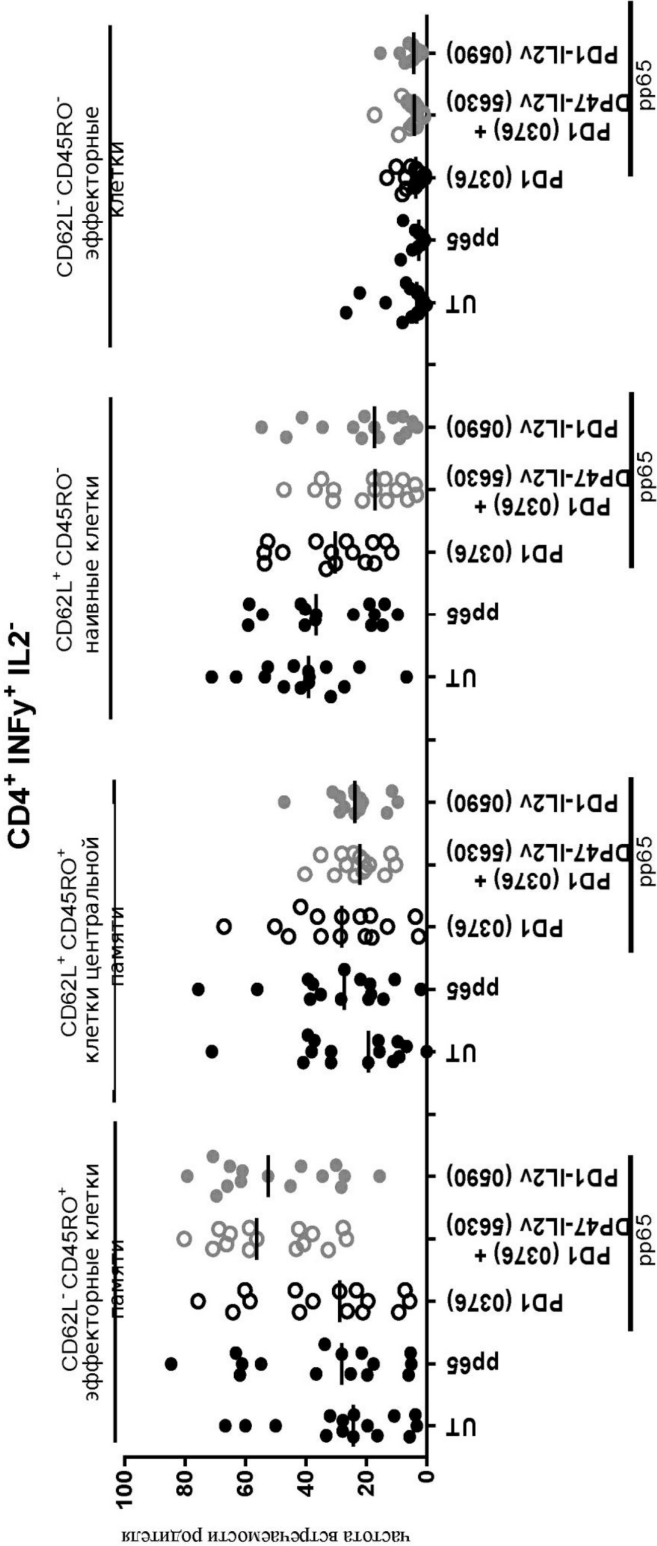
Фиг. 26А

Фиг. 26Б



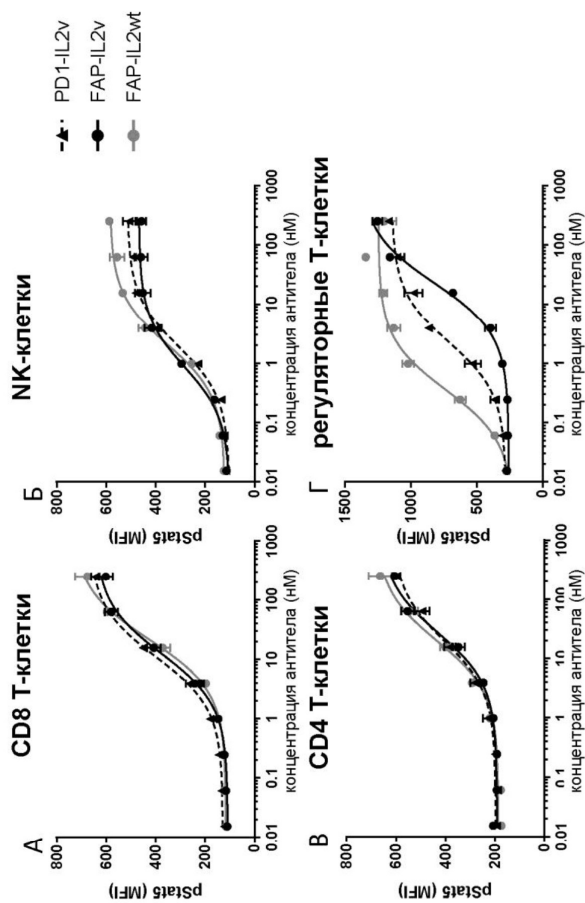
Фиг. 27



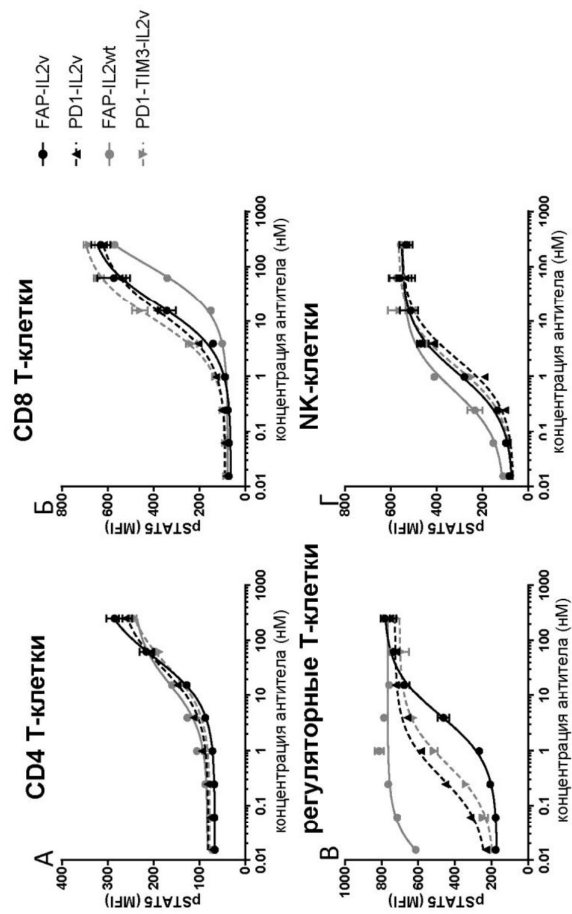


Фиг. 28

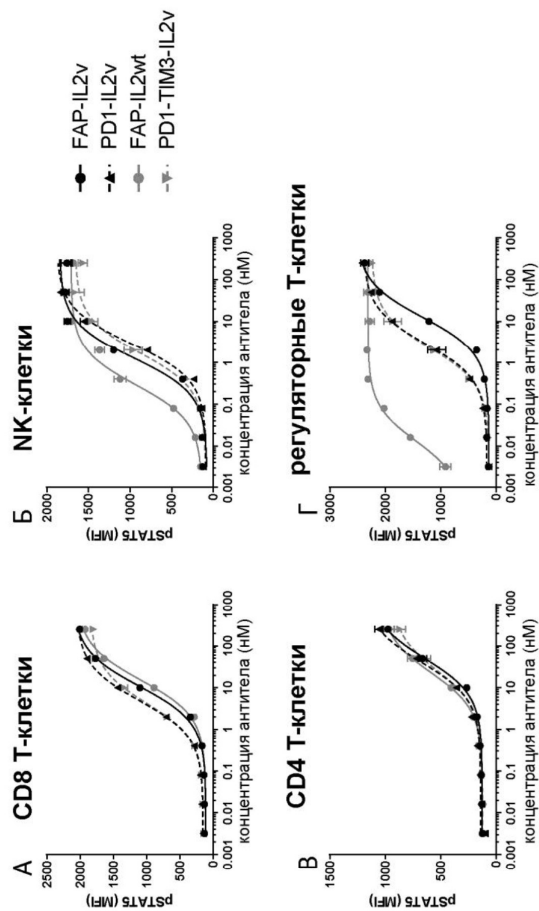
Фиг. 29

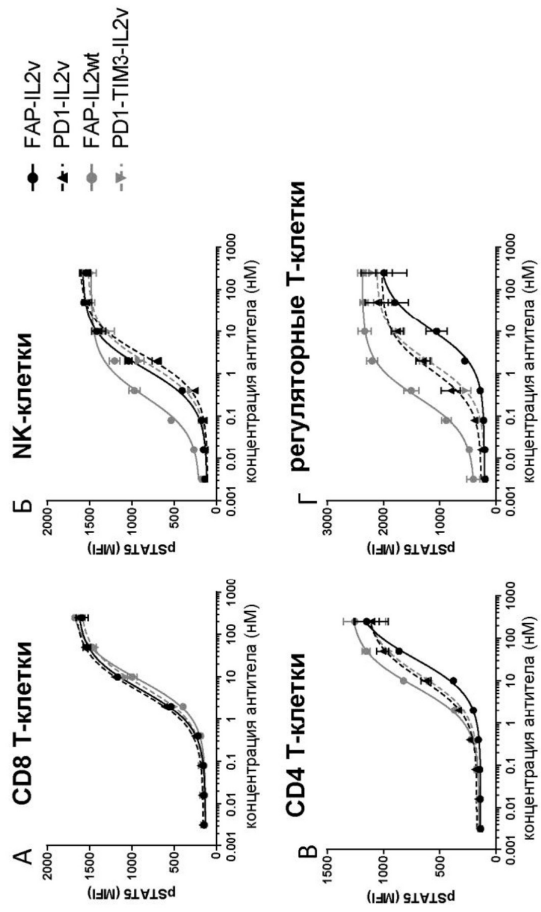


Фиг. 30



Фиг. 31





Фиг. 32