РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 484 845** (13) **C2**

(51) МПК
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2010134360/15, 08.11.2008**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.11.2008

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
17.01.2008 EP 08075044.1

(43) Дата публикации заявки: **27.02.2012** Бюл. № 6

(45) Опубликовано: **20.06.2013** Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Charles F. Eisenbeis et al. "Combination immunotherapy of B-cell Non-Hodgkin s lymphoma with rituximab and interleukin-2: Apreclinical and Phase 1 study", Clinical Cancer Research, September 15, 2004, v.10, 6101-6110, PMID: 15447996 реферат. Carnemolla B et al. "Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to** (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **17.08.2010**

(86) Заявка PCT:
EP 2008/009441 (08.11.2008)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2009/089858 (23.07.2009)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. А.В.Мицу, рег.№ 364

(72) Автор(ы):
НЕРИ Дарио (CH),
МЕНССЕН Ханс Дитрих (DE),
МЕНРАД Андреас (GB),
ШЛИМАН Кристоф (CH)

(73) Патентообладатель(и):
ФИЛОДЖЕН С.П.А. (IT)

(54) КОМБИНАЦИЯ СЛИТОГО БЕЛКА АНТИТЕЛО ПРОТИВ EDb ФИБРОНЕКТИНА-IL-2 И МОЛЕКУЛЫ, СВЯЗЫВАЮЩЕЙСЯ С В-КЛЕТКАМИ, ПРЕДШЕСТВЕННИКАМИ В-КЛЕТОК И/ИЛИ ИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМ АНАЛОГОМ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области медицины, в частности к комбинации для лечения рака, содержащей по меньшей мере 1) слитый белок, содержащий часть, специфически распознающую EDb-фибронектин, представляющую собой антитело, и часть, представляющую интерлейкин-2 и 2) молекулу, связывающуюся с В-клетками, предшественниками В-клеток и/или их злокачественным аналогом, которая является антителом или фрагментом антитела, специфически связывающимся с CD-20. Заявлено также применение указанной

RU 2484845 C2

RU 2484845 C2

комбинации. Группа изобретений обеспечивает повышение эффективности в лечении опухоли.

2 н. и 21 з.п. ф-лы, 3 табл., 7 ил.

(56) (продолжение):
the tumor blood vessel extracellular matrix," Blood, 2002, Mar 1; 99(5):1659-65 PMID:11861281 реферат. Halin C et al, "Synergistic therapeutic effects of a tumor targeting antibody fragment, fused to interleukin 12 and to tumor necrosis factor alpha", Cancer Res. 2003, Jun 15; 63(12):3202-10, PMID: 12810649, реферат. А.П.Белозоров. Лекарственные препараты гуманизированных антител. - Провизор, 2007, вып.20. US 20060251617 A1, 09.11.2007.

RU 2484845 C2

RU 2484845 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 484 845** (13) **C2**

(51) Int. Cl.
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2010134360/15, 08.11.2008**

(24) Effective date for property rights:
08.11.2008

Priority:
(30) Convention priority:
17.01.2008 EP 08075044.1

(43) Application published: **27.02.2012** Bull. 6

(45) Date of publication: **20.06.2013 Bull. 17**

(85) Commencement of national phase: **17.08.2010**

(86) PCT application:
EP 2008/009441 (08.11.2008)

(87) PCT publication:
WO 2009/089858 (23.07.2009)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, str.3, OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery", pat.pov. A.V.Mitsu, reg.№ 364

(72) Inventor(s):
NERI Dario (CH),
MENSSEN Khans Ditrikh (DE),
MENRAD Andreas (GB),
ShLIMAN Kristof (CH)

(73) Proprietor(s):
FILODZhEN S.P.A. (IT)

RU 2484845 C2

RU 2484845 C2

(54) COMBINATION OF ANTI-EDb FIBRONECTIN ANTIBODY-IL-2 FUSION PROTEIN, AND MOLECULE BINDING TO B-CELLS, B-CELL PROGENITORS AND/OR THEIR CANCEROUS COUNTERPART

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

SUBSTANCE: group of inventions refers to medicine, particularly to a combination for treating cancer comprising at least 1) a fusion protein comprising a portion specifically recognizing EDb-fibronectin representing an antibody, and a portion representing interleukine-2 and 2) a molecule that binds to B-cells, B-cell precursors and/or their cancerous counterpart which is an antibody or antibody or an antibody fragment specifically binding to CD-20. What is also declared is the use of this combination.

EFFECT: group of inventions provides higher clinical effectiveness in treating a tumour.

23 cl, 1 tbl, 7 dwg

Настоящее изобретение относится к комбинации слитого белка антитело против EDb фибронектина-IL-2 и молекулы, связывающейся с B-клетками, предшественниками B-клеток и/или их злокачественным аналогом и их применению.

B-клеточная неходжкинская лимфома (B-NHL), группа гистопатологически и клинически отличающихся злокачественных новообразований, происходящих из клеток-предшественников B-лимфоцитов, является наиболее распространенной группой гематологических злокачественных новообразований. Соответственно, злокачественные лимфоциты у пациентов с B-NHL экспрессируют характерные маркеры B-клеток на их клеточной поверхности, такие как CD20, CD23 и другие. B-NHL составляет более чем 50000 впервые диагностированных случаев и 5% связанных со злокачественными опухолями смертельных случаев в Соединенных Штатах каждый год.

Ритуксимаб (Ритуксан®; R) представляет собой химерное моноклональное антитело IgG1, которое связывается непосредственно с эпитопом на клеточной поверхности CD20, постоянно экспрессирующимся на поверхности клетки злокачественной и нормальной популяциях B-клеток. При этом ритуксимаб (a) опосредует антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), (b) вызывает гибель клеток лимфомы посредством комплементзависимого лизиса клеток (CDC) и/или комплементзависимой клеточноопосредованной цитотоксичности и (c) непосредственно вызывает апоптоз после связывания CD20 ритуксимабом. Кроме того, (d) ритуксимаб возможно обладает вакцинным действием, осуществляющимся посредством перекрестного презентирования антигенов лимфомы от уничтоженных ритуксимабом злокачественных B-клеток антигенпрезентирующими клетками и примирования антиген-специфическими цитотоксическими T-клетками лимфомы (Selenko et al, 2001).

A) ADCC: Данный механизм включает связывание Fc-участка антитела с Fcγ-рецепторами, экспрессируемыми иммунными клетками с цитотоксическими способностями, такими как моноциты, естественные клетки-киллеры и гранулоциты, которые затем приводили бы к разрушению связанных с ритуксимабом B-клеток либо фагоцитозом, либо при высвобождении цитотоксических гранул, содержащихся в иммунных эффекторных клетках. ADCC, как полагают в настоящее время, является основным механизмом действия ритуксимаба.

B) CDC: поскольку Fc-участок ритуксимаба связывается с комплементом, гибель клеток лимфомы может осуществляться посредством CDC. Однако недавние полученные данные о том, что вызванное ритуксимабом уменьшение количества B-клеток все таки происходит у мышей, генетически лишенных факторов комплемента, умерили начальный энтузиазм по поводу данного механизма действия.

C) Индукция апоптоза: Исследования in vitro показали, что взаимодействие CD20 с ритуксимабом запускает каскад внутриклеточных сигнальных процессов и избирательную понижающую регуляцию антиапоптозных факторов. Он также перемещает CD20 в липидные рафты и активирует каспазу посредством повышенной мобилизации кальция (Janas et al, 2005). У пациентов при CLL было обнаружено, что у циркулирующих B-клеток проявляется активация расщепления некоторых каспаз и полимераз поли(ADP-рибозы) сразу же после вливания ритуксимаба задолго до того, как другие возможные механизмы, такие как ADCC, могли бы запускаться in vivo (Byrd et al, 2002).

D) Вакцинное действие/T-клеточная иммунная реакция: Клинические данные о том, что лечение ритуксимабом было связано с более длительной средней

продолжительностью реакции в качестве первоначального лечения, что имело место и у тех пациентов, которые отвечали на повторное лечение, противоопухолевое действие ритуксимаба сохранялось после того, как антитело было выведено из кровотока (Davis et al, 2000) убедительно указывает на определенный задействованный иммунологический механизм.

Лечение ритуксимабом в качестве единственного средства вызывает значительный, но средний и кратковременный по продолжительности ответ у пациентов почти с каждым подтипом В-клеточной лимфомы. Тем не менее, его наибольшее благоприятное действие замечено, когда его объединяли со схемами индукционной химиотерапии (Coiffier, 2006). Объединенный со стандартной химиотерапией, в особенности с CHOP (циклофосфамид, винкристин, адриамицин и преднизолон), ритуксимаб в дозе 375 мг/м^2 в виде внутривенного вливания в течение 90 минут в день 1 при каждом курсе химиотерапии увеличивает показатель эффективности лечения пациентов даже с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (DLBCL) приблизительно до 52% (Coiffier 2002, обновление данных OS GELA, ASH 2007) от 38% при одной только химиотерапии.

При медленно растущей лимфоме добавление ритуксимаба при каждой комбинации индукционной химиотерапии (FCM, CVP, CHOP, FND) приводило к значительному увеличению показателей суммарной эффективности терапии и полной ремиссии, а также задержку по времени прогрессирования заболевания (Marcus, 2005; Hiddemann 2005). Тем не менее, добавление ритуксимаба при химиотерапии не всегда приводит к улучшенным исходам заболевания. У пациентов с лимфомой мантийных клеток, лечение CHOP совместно с ритуксимабом приводило к похожей выживаемости без прогрессирования заболевания и общей выживаемости по сравнению с пациентами с одним только лечением CHOP (Lenz et al, 2005).

В дополнение к его установленной роли в качестве лечения для появления ремиссии (индукция ремиссии) у пациентов с B-NHL, монотерапию ритуксимабом также оценили в качестве поддерживающей терапии, чтобы объединить ответы или продлить ремиссию. Согласно предположению, что 25 мг ритуксимаба/мл являются самой низкой приемлемой концентрацией в сыворотке, доза ритуксимаба 375 мг/м^2, вводимая каждые 3 месяца, как обнаружили, была достаточной для поддерживающей терапии ритуксимабом в проспективном фармакокинетическом исследовании (Gordan, 2005). Хотя в некоторых исследованиях показано существенное клиническое благоприятное действие при применении поддерживающей терапии ритуксимабом после начальной стандартной химиотерапии с CVP (Hoechster, 2005) или CHOP (Habermann, 2006), все еще не ясно, обеспечивает ли поддерживающая терапия ритуксимабом дополнительное благоприятное действие для тех пациентов, у которых его использовали как часть индукционной химиотерапии (например, R-CHOP).

К сожалению и несмотря на неоспоримую клиническую эффективность ритуксимаба в комбинации с химиотерапией (например, R-CHOP), большинство пациентов с B-NHL все же умирает, в конечном счете, от прогрессирующего заболевания. В дополнение, несмотря на то, что он является эффективным средством при лечении B-NHL, приблизительно 50% пациентов с рецидивирующими/не поддающимися лечению CD20+ фолликулярными лимфомами не реагируют на первоначальное лечение ритуксимабом (врожденная устойчивость; McLaughlin et al 1998), и приблизительно 60% ранее реагирующих на ритуксимаб пациентов не получат благоприятного действия при повторном лечении ритуксимабом (приобретенная устойчивость; Davis et al, 2000). В настоящее время не ясно, являются ли эти формы

устойчивости к ритуксимабу следствием адаптивной способности злокачественных B-клеток или иммунного эффекторного механизма ослабленного организма-хозяина. Так или иначе устойчивость к ритуксимабу представляет собой существенное препятствие для иммунотерапии и иммунохимиотерапии B-NHL с точки зрения дальнейшего улучшенного исхода заболевания.

Хотя комбинацию ритуксимаб/химиотерапия анализировали, все еще существует большая и устойчивая необходимость в дальнейших усовершенствованиях терапии. В настоящее время придерживаются двух общих стратегий: a) конструирование новых антител против CD20 и b) создание моноклональных антител, которые нацелены на антигены B-клетки помимо CD20. Две категории новых моноклональных антител против CD20 в настоящее время подвергаются клинической оценке: a) антитела против CD20, проявляющие более высокую аффинность, чем ритуксимаб для Fc-рецептора FcγRIIIa (CD16), и b) антитела против CD20 с меньшей иммуногенностью (гуманизированные; Tbl 1). По-видимому, наиболее эффективное из данных антител, GA-101, гуманизированное антитело против CD20 с гликосконструированным фрагментом Fc и модифицированным шарнирным изгибом, приводит к 10-100-кратному увеличению ADCC в отношении клеточных линий NHL. В малочисленных исследованиях на I/II фазе с антителами против CD20 с более низкой иммуногенностью показана эффективность терапии приблизительно у 50% пациентов с рецидивирующей B-NHL (Coiffier, 2006; Hagenbeek, 2005; Morschhauser, 2005). Моноклональные антитела, направленные на поверхностные молекулы помимо CD20 при B-NHL, такие как люмиликсимаб (против CD23), эпратузумаб (против CD22), SGN-40 и HCD122 (и тот и другой против CD40), галиксимаб (против CD80), аполизумаб (Hu1D10), KRN848, 1D09C3 (все против HLA-DR), были перспективными при клинических испытаниях на ранних стадиях. Новые антитела против CD20 и антитела, направленные против не являющихся CD20 эпитопов B-клетки, должны продемонстрировать в значительной степени превосходящую эффективность по сравнению с ритуксимабом для того, чтобы считаться эффективными, однако клинические результаты на ранних стадиях с большинством из данных антител указывают только на постепенно возрастающее благоприятное действие.

Имели место попытки комбинировать ритуксимаб с неконъюгированным IL-2 (Eisenbeis et al., 2004; Gluck et al., 2004). Тем не менее, результаты недавнего испытания на II фазе указали, что «комбинированное лечение ритуксимабом совместно с rIL-2 было безопасно и, как правило, хорошо переносимо, но ответ был слабым» (Khan et al., 2006 Clin Cancer Res 2006; 12(23): 7046-7053). Также было обнаружено, что «rIL-2 увеличивает несущие FcR клеточные субпопуляции in vivo и увеличивает ADCC ритуксимаба in vitro». Однако авторы пришли к заключению, что данные результаты «напрямую не объясняют значительный клинический результат у пациентов с устойчивой к ритуксимабу NHL». Кроме того, авторы пришли к заключению, что «вероятно потребуется лучшее понимание механизма действия ритуксимаба in vivo до того, как можно будет осуществить дальнейшее усовершенствование благоприятной регуляции его противоопухолевой активности».

В дополнение к показанию к применению при злокачественном новообразовании антитела против B-клеток, в частности, ритуксимаб, разработаны для лечения аутоиммунных заболеваний, включающих ревматоидный артрит, болезнь Крона и аутоиммунную гемолитическую анемию (Assous et al., 2008).

Принимая во внимание стандартные способы лечения, а также новые варианты лечения, находящиеся в настоящее время на стадии клинической разработки, все же

существует острая медицинская потребность в создании более активного лечения пациентов с В-клеточной лимфомой, которые преимущественно приводят к полной ремиссии и/или применимы для лечения устойчивой к ритуксимабу лимфомы. Существует также острая медицинская потребность в обеспечении новыми лекарственными препаратами для лечения аутоиммунных заболеваний, в частности хронических аутоиммунных заболеваний.

Таблица 1
Антитела против CD20

Название антитела	Тип	ADCC	CDC (комплементзависимая цитотоксичность)	Непосредственные эффекты	Ссылка
Ритуксимаб	Химерный IgG1	++	++	+	Cragg et al
Окрелизумаб	Гуманизированный IgG1	+++	+/-	+	Vugmeyster et al
PRO131921	Сконструированный окрелизумаб	++++	++	+	
Велтузумаб	Гуманизированный IgG1	++	++	+	Stein et al
Офатумумаб	IgG1 человека	++	++++	+	Hagenbeck et al
AME-133	Гуманизированный IgG1	++++	++	++	Weiner et al
GA-101	Гуманизированный IgG1	+++++	-	++++	Umana et al

Таблица 2
Выбранные антитела против В-клетки в клинических испытаниях с пациентами с неходжкинской лимфомой

Название антитела	Тип	DLT	Частота объективных ответов (%, количество NHL)/ клинические данные	Ссылка
Ритуксимаб	Химерный IgG1	Нет	48, рецидивирующая FL	McLaughlin et al
Эпратузумаб (против CD22)	Гуманизированный IgG1	Нет	43, рецидивирующая FL	Leonard et al (a)
Эпратузумаб + ритуксимаб	Комбинация	Нет	67, рецидивирующая FL	Leonard et al (b)
Люмиликсимаб (против CD23)		Нет	Активен при CLL, когда объединяют с химиотерапией	
Галиксимаб (против CD80)	Гуманизированный IgG1	Нет	11, рецидивирующая FL	Czuczman et al
Галиксимаб + ритуксимаб	Комбинация	Нет	66, рецидивирующая FL	Leonard et al (c)
SGN-40, (против CD40)	Гуманизированный IgG1	Высвобождение цитокинов	0	Advani et al
HCD122 (против CD40)		Происходящий в настоящее время	Происходящий в настоящее время на I фазе	
Калихимицин против CD22 (CMC-544)	Гуманизированный IgG4	Тромбоцитопе-ния	69, рецидивирующая FL	Fayad et al
BL22 против CD-22, соединенный с экзотоксином синегнойной палочки		Гемолитикоуре-мический синдром	Ответы при лейкозе ворсистых клеток	

Экстрадомен В (EDB) фибронектина представляет собой один из наиболее хорошо охарактеризованных маркеров ангиогенеза, описанных на настоящий момент (Zardi et al., Embo J. 1987; 6:2337-2342; Kaspar et al., Int J Cancer. 2006; 118:1331-1339). Данный 91-аминокислотный гомологичный домен III типа может встраиваться в молекулу фибронектина во время активного реструктурирования ткани посредством

механизма альтернативного сплайсинга (Zardi et al., выше). EDB по существу не детектируется в здоровых тканях взрослых людей, но в высокой степени распространен в сосудистой сети множества агрессивных солидных опухолей. Возможность направленной доставки в область опухоли высокоаффинного антитела человека L19 (Pini et al., J Biol. Chem. 1998; 273:21769-21776), специфичного для EDB, была хорошо описана как в моделях злокачественных новообразований на животных (Tarli et al., Blood. 1999; 94:192-198; Borsi et al., Int J. Cancer. 2002; 102:75-85; Berndorff et al., J Nucl Med. 2006; 47:1707-1716; Berndorff et al., Clin Cancer Res. 2005; 11:7053s-7063s; Demartis et al., Eur J Nucl Med. 2001; 28:534-53), так и у пациентов с солидными опухолями (Santimaria et al., Clin Cancer Res. 2003; 9:571-579). Недавно, экспрессию ED-B также обнаружили в большинстве образцов тканей инфильтрирующей лимфомы различных пациентов с неходжкинской лимфомой (Sauer et al., 2006).

На основе существующих на сегодняшний момент знаний об основанном на антителах лечении злокачественных новообразований, в частности, при объединении с rIL-2 или похожими цитокинами, было удивительно обнаружить в экспериментах по комбинированному лечению у мышей, что комбинация ритуксимаба со слитым L19-IL2 вызывала полное уничтожение диагностированной лимфомы Рамоса у 4 из 5 мышей в группе, получавшей большую дозу L19-IL2 ($L19\text{-}IL2_{\text{большая доза}}$ по сравнению с физиологическим раствором: P<0,00001), причем 3 из 4 CR (полных ремиссий) достигали уже после 3 инъекций. Фактически, иммуноцитокин был заметно более активен, чем соответствующее эквимолярное количество неконъюгированного rIL-2 в сочетании с ритуксимабом ($L19\text{-}IL2_{\text{большая доза}}$ по сравнению с $rIL2_{\text{большая доза}}$: P<0,001). В особенности, даже при самой низкой дозе L19-IL2, комбинированный с ритуксимабом, все же проявлял превосходную терапевтическую активность ($L19\text{-}IL2_{\text{низкая доза}}$ по сравнению с физиологическим раствором: P<0,00001; $L19\text{-}IL2_{\text{низкая доза}}$ по сравнению с $rIL2_{\text{низкая доза}}$: P<0,00001), включая CR в 4 из 5 случаев после 4 курсов терапии, тогда как даже в трое большая доза ненаправленного цитокина, объединенного с ритуксимабом, была способна только замедлить рост опухоли ($L19\text{-}IL2_{\text{низкая доза}}$ по сравнению $rIL2_{\text{большая доза}}$: P<0,001).

Следовательно, в одном из вариантов осуществления изобретение относится к комбинации, включающей, по меньшей мере,

i) слитый белок, содержащий антитело-часть, специфически распознающую ED_b-фибронектин, и часть-интерлейкин-2 и

(ii) молекулу, связывающуюся с В-клетками, предшественниками В-клеток и/или их злокачественным аналогом.

В предпочтительном варианте осуществления молекула, связывающаяся с В-клетками, предшественниками В-клеток и/или их злокачественным аналогом, специфически связывается с CD20, CD23, CD22, CD40, CD80, HLA-DR или Hu1D10.

В предпочтительном варианте осуществления молекула, связывающаяся с В-клетками, предшественниками В-клеток и/или их злокачественным аналогом, выбрана из антитела, фрагмента антитела или миметика антитела.

Предпочтительной является молекула, специфически связывающаяся с CD20, CD23, CD22, CD40 или CD80, которая представляет собой полноразмерное антитело или фрагмент антитела или их слитый белок.

В особенно предпочтительном варианте осуществления антитело или фрагмент антитела или их слитый белок специфически связывается с CD20.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к комбинации, включающей по меньшей мере

(i) слитый белок, содержащий антитело-часть, специфически распознающую ED_b-фибронектин, и часть-интерлейкин-2 и

(ii) молекулу, специфически связывающуюся с CD20.

В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к комбинации, включающей по меньшей мере

(i) слитый белок, содержащий антитело-часть, специфически распознающую ED_b-фибронектин, и часть-интерлейкин-2 и

(ii) молекулу, специфически связывающуюся с клетками, экспрессирующими CD20.

В особенно предпочтительном варианте осуществления молекула, специфически связывающаяся с клетками, экспрессирующими CD20, и/или специфически связывающаяся с CD20, представляет собой антитело или фрагмент антитела, специфически связывающийся с CD20.

В предпочтительном варианте осуществления часть антитело (i) специфически связывается с EDb-доменом фибронектина (FN). Такие антитела известны из предшествующего уровня техники и описаны, например, в WO 97/45544.

В другом варианте осуществления антитело, специфически распознающее EDb-фибронектин, связывается со скрытым эпитопом. Примером такого антитела является антитело BC-1.

Предпочтительно, такое антитело, которое связывается с EDb-доменом фибронектина, проявляет высокую аффинность в отношении EDb-домена FN, в частности, антитело связывается с доменом EDb фибронектина с наномолярной или субнаномолярной аффинностью. Такие антитела известны из предшествующего уровня техники и описаны, например, в WO99/58570.

В особенности предпочтительным является антитело L19.

Часть антитела, специфически распознающего EDb фибронектина, в частности антитело L19, можно применять в различных видах антител. Предпочтительные форматы антител представляют собой форматы полноразмерного IgG, Fab, $(Fab')_2$, scFv, диатела, миниантитела или небольшого иммуноглобулина (SIP). Особенно предпочтительными являются форматы полноразмерного IgG, scFv и SIP для антитела L19. Наиболее предпочтительным является антитело L19 в формате scFv. Некоторые форматы иммуноглобулинов известны из предшествующего уровня техники, например, на основе домена CH3 или домена ε_{s2}-CH4 IgE. Предпочтительный формат SIP для L19 основан на домене ε_{s2}-CH4 IgE и L19 в формате полноразмерного IgG описаны, например, в WO03/076469.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления часть антитела содержит, по меньшей мере, одну последовательность CDR антитела L19.

В особенно предпочтительном варианте осуществления часть антитела содержит последовательности CDR антитела L19, в частности, она содержит последовательности согласно SEQ ID NO: 6-11.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления часть антитела содержит цепь VL и VH антитела L19. В предпочтительном варианте осуществления она содержит, по меньшей мере, одну цепь VH согласно SEQ ID NO: 1 или, по меньшей мере, одну цепь VL согласно SEQ ID NO: 2. В особенно предпочтительном варианте осуществления она содержит, по меньшей мере, одну цепь VH согласно SEQ ID NO: 1 и, по меньшей мере, одну цепь VL согласно SEQ ID NO: 2.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления часть антитела

содержит одну цепь VH согласно SEQ ID NO: 1 и одну цепь VL согласно SEQ ID NO: 2. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления часть антитела содержит две цепи VH согласно SEQ ID NO: 1 и две цепи VL согласно SEQ ID NO: 2.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления цепи VH и VL соединены линкером антитела.

В предпочтительном варианте осуществления линкер антитела содержит последовательность согласно SEQ ID NO: 3 или последовательность, содержащую, по меньшей мере, последовательность с 90% идентичностью согласно SEQ ID NO: 3.

Часть антитела, специфически связывающуюся с EDb-фибронектина, сливают с интерлейкином-2. Обе части можно сливать напрямую или их можно сливать посредством линкера, в частности посредством пептидного линкера слитого белка. Предпочтительно, линкер слитого белка содержит от 1 до 30 аминокислот в длину. В особенно предпочтительном варианте осуществления линкер слитого белка содержит последовательность согласно SEQ ID NO: 5.

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления интерлейкин-2 представляет собой интерлейкин-2 человека (IL-2 человека).

Интерлейкин-2 можно получать рекомбинантно или можно выделять из ткани человека, предпочтительно, его получают рекомбинантно (rIL-2). В особенно предпочтительном варианте осуществления часть-интерлейкин-2 содержит последовательность согласно SEQ ID NO: 4 или ее функциональный вариант.

Слитый белок может быть мономерным или многомерным, например димерным. Димерные или другие мономерные формы можно получать ковалентно или нековалентно. Например, L19(scFv)-IL2 может образовать нековалентные гомодимеры.

Слитные белки предпочтительно получают рекомбинантно, используя способы, известные специалисту в данной области. В частности, можно использовать прокариотические или эукариотические экспрессирующие системы, например дрожжевые экспрессирующие системы или экспрессирующие системы млекопитающих.

Комбинация по настоящему изобретению дополнительно содержит молекулу, связывающуюся с В-клетками, предшественниками В-клеток и/или их злокачественным аналогом.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения молекула, связывающаяся с В-клетками, предшественниками В-клеток и/или их злокачественным аналогом, является меченной, в частности радиоактивно меченной. Предпочтительно, мечение представляет собой ковалентное мечение.

В особенно предпочтительном варианте осуществления меченная молекула, связывающаяся с В-клетками, предшественниками В-клеток и/или их злокачественным аналогом, представляет собой радиоактивно меченное антитело против CD20. Различные радиоактивные метки используются в лекарственных препаратах.

Особенно пригодные радиоактивные изотопы для мечения антител и белков являются ^{90}Y, ^{111}In и ^{131}I-меченными. В особенно предпочтительном варианте осуществления антитело против CD20 метят при помощи ^{90}Y, ^{111}In и ^{131}I.

В особенно предпочтительном варианте осуществления радиоактивно меченное антитело против CD20 выбрано из Y-90-ибритумомаб-тиуксетана (Y90-Зевалин® или -Зевалин®) и I-131-тозитумомаба (Бексар®). Y-90-ибритумомаб-тиуксетан и его получение описано, например, в EP 0669836 в качестве Y2B8 (меченного иттрием-[90] 2B8-MX-DTPA).

В предпочтительном варианте осуществления комбинация по настоящему

изобретению дополнительно содержит молекулу, специфически связывающуюся с CD20. В особенно предпочтительном варианте осуществления данная молекула представляет собой антитело или фрагмент антитела или их слитый белок.

Особенно предпочтительными являются антитела против CD20, которые проявляют активность ADCC.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитело против CD20 выбрано из ритуксимаба, окрелизумаба, PRO131921, велтузумаба, офатумумаба, AME-133 и GA-101.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения антитела, специфически связывающиеся с CD20, находятся в форме полноразмерного IgG, Fab, $(Fab)_2$, scFv, диатела, миниантитела или небольшого иммуоглобулина (SIP).

Также антитело против CD20 может быть мономерным или многомерным, например димерным. Многомерные антитела могут быть гомомерными или гетеромерными. Например, можно использовать бивалентное антитело, где одна часть специфически связывается с CD20 и другая часть связывается с другой мишенью. Также молекула, специфически связывающаяся с CD20, может содержать дополнительные эффекторы, в частности, она может быть радиоактивно меченная. В данном варианте осуществления настоящего изобретения можно использовать Зевалин® или Бексар®, как описано выше.

Особенно предпочтительное антитело против CD20 представляет собой ритуксимаб, в частности Ритуксан® (также называемый MabThera® или IDEC-C2B8). Ритуксан® представляет собой генетически сконструированное химерное мышиное/человеческое моноклональное антитело, направленное против антигена CD20, обнаруженного на поверхности нормальных и злокачественных B-лимфоцитов. Антитело представляет собой иммуноглобулин IgG1-каппа, содержащий последовательности вариабельных областей легкой и тяжелой цепи мыши и последовательности константных областей человека. Ритуксимаб описан, например, в патентах США №№ 5843439, 5776456 и 5736137.

В более предпочтительном варианте осуществления комбинация содержит ритуксимаб и L19-IL2.

В еще более предпочтительном варианте осуществления антитело L19 находится в формате scFv.

Особенно предпочтительным является L19-IL2, как описано у Carnemolla et al., Blood. 2002; 99:1659-1665.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к комбинации, как описано выше, для применения в качестве лекарственного препарата.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к комбинации, как описано выше, для применения в качестве лекарственного препарата для лечения злокачественного новообразования.

В предпочтительном варианте осуществления злокачественное новообразование представляет собой лимфому, предпочтительно B-клеточную лимфому. Наиболее предпочтительным является применение комбинации по настоящему изобретению для лечения B-клеточной неходжкинской лимфомы (B-NHL).

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления B-клеточная лимфома представляет собой не поддающуюся лечению или рецидивирующую B-клеточную лимфому или лимфому, устойчивую к монотерапии ритуксимабом.

Изобретение дополнительно относится к способу лечения злокачественного новообразования, в котором комбинацию по настоящему изобретению вводят

пациенту со злокачественным новообразованием в терапевтически эффективном количестве. Предпочтительно, злокачественное новообразование представляет собой лимфому, предпочтительно В-клеточную лимфому, в частности NHL.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к комбинации, как описано выше, для применения в качестве лекарственного препарата для лечения аутоиммунных заболеваний, в частности хронических аутоиммунных заболеваний.

В предпочтительном варианте осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, болезнь Крона, язвенный колит или аутоиммунную гемолитическую анемию.

Пациент может представлять собой любое млекопитающее, предпочтительно, пациентом является человек.

Возможны различные способы введения, например внутривенное, подкожное или интраперитонеальное введение, где внутривенное введение является предпочтительным.

Также слитый белок, специфически распознающий EDb фибронектина, и молекулу, связывающуюся с В-клетками, предшественниками В-клеток и/или их злокачественным аналогом, можно вводить одновременно или в различные моменты времени. Кроме того, комбинацию можно вводить пациенту один или несколько раз. Также возможно, что один компонент комбинации вводят один раз и другой компонент вводят несколько раз.

Обычно, если ритуксимаб и L19-IL2 вводят в качестве комбинированного лечения, их можно вводить пациенту в одно и то же время, поскольку это позволяет упростить схемы введения. Для примеров, и ритуксимаб и L19-IL2 можно вводить в/в один или два раза в день с временными интервалами в диапазоне от нескольких дней до 3 месяцев. Также возможны один или несколько курсов лечения.

Кроме того, может изменяться вводимое количество. Например, ритуксимаб можно вводить в количестве приблизительно от 20 до 500 мг/м^2, предпочтительно в количестве приблизительно от 100 до 400 мг/м^2, в частности, приблизительно 375 мг/м^2 ритуксимаба на введение. Типично, ритуксимаб вводят в 1 день при 2-, 3-, или 4-недельной схеме лечения с применением 6-8 курсов лечения (индукция ремиссии), хотя возможны другие схемы введения.

Терапевтические препараты активных средств, применяемых в соответствии с настоящим изобретением, получают для хранения, смешивая активное средство, обладающее требуемой степенью чистоты с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в виде лиофилизированных препаратов или водных растворов.

Иллюстративные препараты антител против CD20 описаны в WO 98/56418. В данной публикации описан жидкий препарат для многократного приема, содержащий 40 мг/мл ритуксимаба, 25 мМ ацетата, 150 мМ трегалозы, 0,9% бензилового спирта, 0,02% полисорбата 20 при величине pH 5,0, который обладает минимальным сроком годности два года хранения при 2-8°С. Другой интересующий препарат против CD20 содержит 10 мг/мл ритуксимаба в 9,0 мг/мл хлорида натрия, 7,35 мг/мл цитрат натрия двуводный, 0,7 мг/мл полисорбат 80 и стерильную воду для инъекций, величина pH 6,5. Лиофилизированные препараты, адаптированные для подкожного введения, описаны в WO 97/04801. Такие лиофилизированные препараты можно восстанавливать при помощи подходящего разбавителя до высокой

концентрации белка и восстановленный препарат можно вводить подкожно пациенту, которого необходимо лечить, как описано в настоящем документе.

Также может меняться количество, которое необходимо вводить, в отношении слитого белка. Обычно, вводимое количество L19-IL2 при введении составляет приблизительно от 1 до 10×10^6 МЕ/м^2, в частности, приблизительно от 5 до 50×10^6 МЕ/м^2, особенно, приблизительно от 10 до 30×10^6 МЕ/м^2.

Также возможно, что вводимое количество меняется с течением времени; например, количество ритуксимаба и/или L19-IL2 можно увеличить или уменьшить в течение одного или нескольких курсов введения.

Также поддерживающая терапия, в частности, с одним только ритуксимабом или L19-IL2, может следовать за фазой комбинированного лечения.

Также возможно поддерживать при помощи лечения с L19-IL2 совместно с содержащими антитело способами комбинированного лечения B-NHL, в частности, химиоиммунотерапевтическими схемами (например, R-CHOP).

Линкер антитела представляет собой любой линкер, предпочтительно, пептидный линкер, который подходит для связывания доменов Vh и Vl. Подходящие линкеры описаны, например, в Bird et al, Science, 242, 423-426, 1988; Huston et al, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988, EP 0573551; EP 0623679 и EP 0318554, которые введены в качестве ссылки.

Линкеры слитого белка представляют собой линкеры, подходящие для связывания антитела или фрагмента антитела и второго биологически активного белка, предпочтительно, линкер является пептидным. Подходящие линкеры описаны в EP 0573551; EP 0623679 и EP 0318554, которые введены в качестве ссылки. В особенности, подходящие линкеры описаны в EP 0623679.

«Специфически связывающийся» или «специфически распознающий» в настоящем документе относится к связыванию соответствующей мишени. Обычно, связывающаяся молекула, антитело, фрагмент антитела или миметик антитела связывается с аффинностью, по меньшей мере, приблизительно 1×10^{-7} М, предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 1×10^{-9} М, и связывается с предварительно определенной мишенью с аффинностью, которая, по меньшей мере, в два раза больше, чем его аффинность для неспецифической мишени (например БСА, казеин) помимо предварительно определенной мишени и близко связанной мишени.

«Антитело» в настоящем документе охватывает полноразмерные антитела, включая нативные антитела, моноклональные антитела, поликлональные антитела и полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), антитела человека, гуманизированные антитела, химерные антитела и полноразмерные антитела IgG, а также фрагменты антител.

Термин «фрагмент антитела» относится к части полноразмерного антитела, в которой сохранена вариабельная область или функциональная активность, а именно специфическое связывание с мишенью. Примеры фрагментов антител включают в качестве неограничивающих примеров фрагмент Fab, Fab', F(ab')$_2$, Fd, Fv, scFv и scFv-Fc, диатело, линейное антитело, формы небольших имммуноглобулинов, одноцепочечное антитело, миниантитело, диатело, образованное из фрагментов антител, и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты антител обычно меньше, чем полноразмерные антитела. При этом фармакокинетика отличается и некоторые фрагменты антител содержат только одну полипептидную цепь, которая может облегчить получение. Однако такие слитные белки, содержащие фрагменты антител, часто подвержены пониженной устойчивости.

Предпочтительно, фрагмент антитела находится в формате scFv, (scFv)2 или небольшого иммунопротеина. Формат небольшого иммунопротеина может представлять собой формат на основе CH3-домена (например, описанный в патенте США № 5837821) или εS_2CH4-домена IgE человека (например, описанный в WO 03/076469).

Термин «моноклональное антитело» (mAb) относится к антителу, получаемому из популяции по существу гомогенных антител; т.е. отдельные антитела, содержащие популяцию, которая идентична, за исключением встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны, причем направлены против одной антигенной детерминанты, также обозначаемой как эпитоп. Модификатор «моноклональный» свидетельствует о гомогенной по существу популяции антител, направленных на идентичный эпитоп, и его не следует рассматривать как требование получения антитела никаким особым способом. Моноклональные антитела можно получить посредством любой методики или способом, известным в данной области; например, способ гибридомы, впервые описанный Koehler et al., 1975, Nature 256:495, или известные в данной области способы рекомбинантной ДНК (смотри, например, патент США № 4816567). В другом примере моноклональные антитела можно также выделить из фаговых библиотек антител, используя методики, описанные у Clackson et al., 1991, Nature 352: 624-628 и Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597.

В отличие от этого, антитела при получении поликлональных антител обычно представляют собой гетерогенную популяцию изотипов и/или классов иммуноглобулинов и также проявляют различную эпитопную специфичность.

Термин «химерное» антитело в настоящем документе обозначает тип моноклонального антитела, в котором часть или целая аминокислотная последовательность в одной или нескольких областях или доменах тяжелой и/или легкой цепи идентична, гомологична или является вариантом соответствующей последовательности в моноклональном антителе другого вида или принадлежащего к другому классу или изотипу иммуноглобулина или из консенсусной последовательности.

Определенные типы фрагментов антител можно получить при ферментативной обработке полноразмерного антитела. Расщепление папаином антитела приводит к получению двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, обозначаемых фрагменты «Fab», каждая с одним антигенсвязывающим участком, и оставшегося фрагмента «Fc», так называемого из-за его способности легко кристаллизоваться. Фрагмент Fab также константный домен легкой цепи и домен CH1 тяжелой цепи. Обработка пепсином приводит к образованию фрагмента $F(ab')_2$, который содержит два антигенсвязывающих участка и все же способен к перекрестному связыванию антигена.

Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab наличием нескольких дополнительных остатков на C-конце домена CH1, включающих один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Fab-SH в настоящем документе представляет собой обозначение для Fab', в котором остаток(остатки) цистеина константных доменов несут свободную тиоловую групу. Фрагменты антител $F(ab')_2$ представляют собой пары фрагментов Fab', соединенные посредством остатков цистеина в шарнирной области. Другие химические соединения фрагментов антител также известны.

«Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит

полный распознающий антиген и связывающий участок, состоящий из димера вариабельного домена одной тяжелой одной легкой цепи с прочной нековалентной связью. В данной конфигурации три CDR каждого вариабельного домена взаимодействует с определенным антигенсвязывающим участком на поверхности димера VH VL. Совместно шесть CDR придают антителу антигенсвязывающую специфичность.

«Одноцепочечный Fv» или «scFv» фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный вариант Fv, содержащий домены VH и VL антитела, в котором домены присутствуют в виде одной полипептидной цепи, и который способен распознавать и связывать антиген. Полипептид scFv необязательно содержит полипептидный линкер, расположенный между доменами VH и VL, который способствует образованию необходимой для связывания антигена трехмерной структуры scFv (смотри, например, Pluckthun, 1994, In The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315).

Термин «диатела» относится к небольшим фрагментам антител, содержащим два антигенсвязывающих участка. Каждый фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (VL). Применяя линкер, который слишком короток для того, чтобы позволить образование соединения между двумя доменами на одной и той же цепи, объединенные домены VH-VL вынуждены соединиться с комплементарными доменами другой цепи, образуя два антигенсвязывающих участка.

Диатела более подробно описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161; и у Hollinger et al., 1993, Proc. Nat. Acad. Sc. USA 90: 6444-6448.

Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела включает вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина, или его фрагмента, который способен связываться с предварительно определенным антигеном и который содержит одну или несколько каркасных областей (FR), содержащих по существу аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека и одну или несколько CDR, содержащих по существу аминокислотную последовательность не принадлежащего человеку иммуноглобулина. Данную не принадлежащую человеку аминокислотную последовательность обозначают в настоящем документе как «импортированная» последовательность, которая обычно взята из «импортированного» домена антитела, особенно, вариабельного домена. В основном, гуманизированное антитело включает в себя, по меньшей мере, CDR или HVL не принадлежащего человеку антитела, встроенных между FR вариабельного домена тяжелой или легкой цепи человека.

«Нативные антитела» определяют в настоящем документе как гетеротетрамерные гликопротеины, обычно приблизительно 150000 дальтон, состоящих из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь ковалентно связана с тяжелой цепью посредством одной дисульфидной связи, чтобы получить гетеродимер. Гетеротетрамер образуется посредством образования ковалентной дисульфидной связи между двумя идентичными тяжелыми цепями таких гетеродимеров. Хотя легкие и тяжелые цепи связываются вместе одной дисульфидной связью, количество связей между двумя тяжелыми цепями изменяется для изотипа иммуноглобулина. Каждая тяжелая и легкая цепь также содержит расположенные на равном расстоянии друг от друга межцепьевые дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь содержит на аминоконце вариабельный домен (VH), после которого следуют три или четыре константных домена (CH1, CH2, CH3 и CH4), а также

шарнирная область между CH1 и CH2. Каждая легкая цепь содержит два домена, аминоконцевой вариабельный домен (VL) и карбоксиконцевой константный домен (CL). Домен VL нековалентно связан с доменом VH, тогда как домен CL обычно ковалентно связан с доменом CH1 посредством дисульфидной связи. Определенные аминокислотные остатки, как полагают, образуют область контакта между вариабельными доменами легкой и тяжелой цепи (Chothia et al., 1985, J.Mol. Biol. 186:651-663.) Термин «гипервариабельный» относится к явлению, когда определенные последовательности в пределах вариабельных доменов значительно отличаются по последовательности среди антител и содержат остатки, которые напрямую обеспечивают связывание и специфичность каждого определенного антитела с его специфичной антигенной детерминанты. Гипервариабельность в вариабельных доменах как в легкой цепи, так и в тяжелой цепи сосредоточены в трех сегментах, известных как определяющие комплементарность области (CDR) или гипервариабельные петли (HVL). CDR определяются при сравнении последовательности по Kabat et al., 1991, In: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., тогда как HVL структурно определяют согласно трехмерной структуре вариабельного домена, как описано у Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917.

В тех случаях, когда данные способы приводят к слегка различным определениям CDR, структурное определение является предпочтительным. Как определено по Kabat, CDR-L1 расположен приблизительно в остатках 24-34, CDR-L2 приблизительно в остатках 50-56 и CDR-L3 приблизительно в остатках 89-97 вариабельного домена легкой цепи; CDR-H1 расположен приблизительно в остатках 31-35, CDR-H2 приблизительно в остатках 50-65 и CDR-H3 приблизительно в остатках 95-102 вариабельного домена тяжелой цепи.

Термин «метка» относится к поддающемуся определению соединению или композиции, которая связана напрямую или опосредовано с антителом. Метка может сама по себе поддаваться определению (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или, в случае ферментативных меток, можно катализировать химическое изменение субстратного соединения или композиции, которое поддается определению.

Хотя фибронектины (FN) являются продуктами одного гена FN, получающийся белок может существовать во множестве форм, которые - за исключением посттрансляционных модификаций - являются результатом альтернативного сплайсинга его исходного транскрипта РНК. Данный полиморфизм, который приводит к появлению до 20 различных изоформ FN у человека, тем самым приводя к образованию FN с различной растворимостью, клеточными адгезивными и лигандсвязывающими свойствами, обеспечивает появление клеток с возможностью модифицировать состав внеклеточного матрикса (ECM) тканеспецифичным образом. Альтернативный сплайсинг имеет место в трех областях исходного транскрипта РНК: частота использования или пропуск экзона приводит либо к встраиванию, либо отсутствию повторов III типа, экстрадомен B (EDB или ED-B, также называемый EIIIB или EDIII), который встраивается между повторами III типа III7 и III8 FN, или/и экстрадомен A (EDA, также называемый EIIIA или EDI), встраиваемый между повторами III типа III11 и III12 FN. Данный тип сплайсинга встречается у многих позвоночных, включающих в себя Xenopus, курицу, крысу, собаку и человека.

Под «доменом ED-B» подразумевают экстрадомен B фибронектина человека. Часто его обозначают как EDb, EIIIB или EDII.

Под «миметиками антител» подразумевают связывающие молекулы на основе белковых каркасов («остовы»), которые специфически связываются с мишенью и которые отличны от антител и фрагментов антител. Такие остовы описаны у Binz et al., 2005, Nat. Biotechnol. 23, 1257-1268. Миметики антител, специфически связывающиеся с ED-B фибронектина, описаны у Grabulovski et al., J. Biol. Chem., 2007, 282:3196-3204.

«Интерлейкин-2» по настоящему изобретению относится к интерлейкину-2 млекопитающих, предпочтительно интерлейкину-2 человека и его функциональным вариантам. Функциональные варианты интерлейкина-2 представляют собой варианты интерлейкина-2 человека, которые проявляют, по меньшей мере, 10%, но более предпочтительно, более чем 50%, и даже более предпочтительно, более чем 90% активности нативного интерлейкина-2 человека. Активности интерлейкина-2 представляют собой активности интерлейкина-2 в биохимических исследованиях или in vivo, в частности, активность интерлейкина-2 можно определить по эффекту пролиферации и/или дифференцировки активированных Т- и В-лимфоцитов и естественных клеток-киллеров и/или индукции активности цитотоксической Т-клетки и/или противоопухолевую активность NK/лимфокин-активированного киллера (LAK) (Meazza R, Marciano S, Sforzini S, et al. Analysis of IL-2 receptor expression and of the biological effects of IL-2 gene transfection in small-cell lung cancer. Br. J. Cancer. 1996; 74: 788-795). В частности, функциональные варианты представляют собой мутеины интерлейкина-2 по цистеину-125, как описано в EP 0109748, и другие мутеины, включающие цистеиновые мутеины, как описано в EP136489, в частности, серин 125-интерлейкин-2. Также, N-конец вариантов hIL.2 можно изменять, не влияя на активность в значительной степени, в частности, N-концевые аминокислоты 1-5, особенно предпочтительно, N-концевой аланин, можно удалить или заменить, предпочтительно, удалить. Кроме того, интерлейкин-2 может содержать измененные посттрансляционные модификации или не иметь их, в частности, можно изменить или убрать характерные участки гликозилирования. Отличающееся гликозилирование или его отсутствие можно осуществить либо при помощи мутации последовательности, или посредством экспрессии слитого белка в соответствующем организме-хозяине. Например, алдеслейкин, который одобрен для метастатической RCC, представляет собой негликозилированный дезаланин-1, серин-125-интерлейкин-2 человека, получаемый в E. coli.

Описание фигур

Фиг.1. Иммуногистохимия с антителом L19 выявила экспрессию EDB в ксенотрансплантате В-клеточной лимфомы. При иммуногистохимическом окрашивании с использованием антитела L19, специфичного для EDB фибронектина, выявлена значительная экспрессия данной изоформы фибронектина с заметным сосудистым рисунком окрашивания в ксенотрансплантатах лимфомы Рамоса (левая панель). Окрашивание похоже на паттерн окрашивания L19 в солидных опухолях, как проиллюстрировано с использованием ксенотрансплантата глиобластомы U87 (правая панель). Для отрицательного контроля первичное антитело исключали. Масштабные полоски, 100 мкм.

Фиг.2. Эксперименты по местоположению in vivo: иммунофлуоресценция ex vivo (A) и количественные исследования биораспределения (B). Эффективность направленной доставки in vivo антитела L19 проверяли на модели подкожной лимфомы SCID/Рамоса. (A) Мышам, несущим лимфому, вводили L19-SIP, химически меченный флуорофором Cy3. На фигуре показано 2-цветное изображение с флуоресцентного

микроскопа среза лимфомы через 24 ч после введения, подтверждающее местоположение антитела (красный) в сосудистых структурах опухоли. Антитело против CD31 применяли ex vivo, чтобы обозначить эндотелиальные клетки, и его определяли при помощи антитела против Ig крысы с Alexa Fluor 488 G (зеленый). Масштабные полоски, 100 мкм. (B) Результаты количественного биораспределения получали через 24 ч и 48 ч после введения меченого радиоактивным изотопом ^{125}I L19-SIP несущим лимфому животным ($n \geq 3$ для каждого момента времени). Средние результаты направленной доставки выражали как процент введенной дозы на грамм ткани (%МД/г ± SD). Через сорок восемь часов после введения селективное накопление и удерживание антитела в ткани лимфомы могли наблюдать при соотношениях опухоли и крови 4,8 и соотношениях опухоли и органов в диапазоне от 3,8 до 17,3.

Фиг.3. Эффект единичного средства L19-IL2, неконъюгированного IL-2 и ритуксимаба на рост лимфомы. Мышам SCID, несущим прижившиеся п/к ксенотрансплантаты лимфомы Рамоса, вводили в/в либо направленный на сосудистые структуры слитый белок L19-IL2 (■; 20 мкг), либо соответствующую дозу ненацелленного rIL-2 (▲; 6,6 мкг), либо ритуксимаб (●; 200 мкг) или контрольный физиологический раствор (×) на 8, 11, 14 и 17 день после имплантации опухолевой клетки. Как единичное средство L19-IL2, так и единичное средство ритуксимаб в значительной степени замедляли рост опухоли (P=0,024 и P=0,004, соответственно). В отличие от этого неконъюгированный rIL-2 не проявлял значительной терапевтической активности (P=0,383), указывая на вклад направленной доставки IL-2 в терапевтический эффект (L19-IL2 по сравнению с IL-2: P=0,044).

Фиг.4. Терапевтический эффект L19-IL2 и неконъюгированного IL-2 в сочетании с ритуксимабом. Мышам SCID, несущим прижившиеся п/к ксенотрансплантаты лимфомы, вводили в/в либо физиологический раствор (×), либо 200 мкг ритуксимаба + низкую дозу неконъюгированного IL-2 (Δ; 2,2 мкг), либо 200 мкг ритуксимаба + большую дозу неконъюгированного IL-2 (▲; 6,6 мкг), либо 200 мкг ритуксимаба + низкую дозу L19-IL2 (□; 6,6 мкг, соответствующую 2,2 мкг IL-2), либо 200 мкг ритуксимаба + высокую дозу L19-IL2 (■; 20 мкг, соответствующую 6,6 мкг IL-2) на 8, 11, 14 и 17 день. L19-IL2 в сочетании с ритуксимабом был очень эффективным, указывая на полную ремиссию у 4 из 5 мышей при низкой дозе, а также в группе, получавшей большую дозу L19-IL2. В отличие от этого, неконъюгированный rIL-2 в сочетании с ритуксимабом не вызывал регрессии опухоли и все опухоли продолжали расти. Все мыши с CR оставались без опухолей в течение периода, по меньшей мере, 42 дней.

Фиг.5. Терапевтический эффект L19-IL2, IL-2 и ритуксимаба при монотерапии и способах комбинированного лечения в модели диссеминированной лимфомы. Мышам SCID ($n \geq 6$) в/в вводили 2×10^6 клеток лимфомы Рамоса и обрабатывали 8 дней спустя согласно следующим ниже схемам: ненаправленный IL-2 (6,6 мкг), L19-IL2 (20 мкг), ритуксимаб (200 мкг), ритуксимаб (200 мкг) + IL-2 (6,6 мкг), ритуксимаб (200 мкг) + L19-IL2 (20 мкг), или контрольный физиологический раствор (более подробно, для моделирования системного заболевания, мышам SCID вводили в/в 2×10^6 клеток лимфомы Рамоса, ресуспендированных в 200 мкл PBS. Распространение и рост В-клеточной лимфомы делали возможным в течение 8 дней до начала лечения. Мышей случайным образом делили на 6 групп (≥ 6 мышей в группе) и в/в вводили им либо физиологический раствор, либо 20 мкг L19-IL2, либо 6,6 мкг неконъюгированного rIL-2 либо 200 мкг ритуксимаба (группы монотерапии), или 200 мкг ритуксимаба в

сочетании с 20 мкг L19-IL2 либо 200 мкг ритуксимаба в сочетании с 6,6 мкг неконъюгированного rIL-2 (группы комбинированного лечения) на 8, 11, 14 и 17 день (Q3Dx4). За мышами ежедневно наблюдали на предмет наличия паралича задней конечности или признаков ухудшающегося состояния, после чего мышей умерщвляли и оценивали в качестве мертвых. Выживаемость регистрировали при анализе терапевтической эффективности.

Фиг.6. Подтверждение наличия мишени в образцах лимфомы человека. EDB, как было обнаружено, экспрессируется в неоваскулярных структурах форм В-клеточной лимфомы человека, включающих в себя часто встречающиеся подтипы диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы и лимфомы Беркитта. Масштабные полоски, 100 мкм.

Фиг.7. В то время как слитый белок L19-IL2 воспроизводимо ингибирует рост лимфомы (P=0,031), эквимолярные количества очищенного L19 в формате SIP или IgG были терапевтически неактивны при введении по отдельности или в сочетании со свободным rIL-2.

ПРИМЕРЫ

Материалы и способ

Животные и клеточные линии

Самок мышей CB17/lcr SCID в возрасте 6-8 недель получали из Charles River Laboratories (Sulzfeld, Германия). Всех мышей размещали в блоках микроизолятора и обеспечивали их стерильной едой и водой ad libitum на всем протяжении исследований. Не имеющую EBV клеточную линию В-клеточной лимфомы человека Ramos[44] приобретали в американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Вирджиния). Клетки поддерживали в лог-фазе роста в среде RPMI 1640, адаптированной для содержания 2 мМ L-глутамина, 10 мМ HEPES, 1 мМ пирувата натрия, 4,5 г/л глюкозы, 1,5 г/л бикарбонатов, 10% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 100 Е/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клеточную линию фолликулярной лимфомы человека DoHH-2 получали из German Resource Centre for Biological Material (DSMZ, Braunschweig, Германия).

Антитела и реагенты

L19 представляет собой нацеленное на сосудистые структуры антитело, направленное против домена EDB фибронектина. Экспрессия, очистка и характеристика L19 в формате SIP (небольшой иммуноглобулин) и слитого белка L19-IL2 ранее описана у Borsi et al. (Int J. Cancer. 2002; 102:75-85) и Camemolla et al. (Blood. 2002; 99:1659-1665). Рекомбинантный IL-2 человека (пролейкин, 18×10^6 МЕ) получали в Prorero Pharma (Листаль, Швейцария) и химерное моноклональное антитело человека IgG1 против CD20 ритуксимаб (MabThera) в Roche (Райнах, Швейцария).

Иммуногистохимия

Для иммуногистохимии ксенотрансплантатных опухолей Рамоса криостатные срезы размером 10 мкм замороженных образцов фиксировали в ледяном ацетоне, регидратированном в TBS (50 ммоль/л Tris, 100 ммоль/л NaCl pH 7,4), и блокировали 20% FCS (Invitrogen, Базель, Швейцария). L19-SIP добавляли к срезам в конечной концентрации 10 мкг/мл. Связывание первичного антитела определяли при помощи кроличьего антитела против IgE человека (Dako, Глоструп, Дания), после чего следовало использование биотинилированного козьего антитела против IgG кролика (Biospa, Милан, Италия) и комплекса кострептавидин-щелочная фосфатаза (Biospa). Fast Red TRSalt (Sigma) использовали в качестве субстрата

фосфатазы. Иммуногистохимический анализ экспрессии EDB в образцах лимфомы человека проводили с использованием биотинилированного L19-SIP и стрептавидин-щелочной фосфатазы (SAP). Срезы контрастно окрашивали при помощи гематоксилина, приготавливали для исследования при помощи среды для заключения ткани Glycergel (Dako) и анализировали микроскопом Axiovert S100 TV (Zeiss, Фельдбах, Швейцария).

Иммуногистохимию образцов лимфомы человека проводили, как и ксенотрансплантатов лимфомы, однако биотинилированный L19-SIP использовали в качестве первичного антитела и определяли при помощи комплекса стрептавидин-щелочная фосфатаза (Biospa).

Эксперименты с флуоресценцией ex vivo

L19-SIP метили при помощи сложного эфира Cy3-NHS, флуоресцентного цианинового соединения, следуя рекомендациям производителя (Amersham Pharmacia, Дюбендорф, Швейцария). 120 мкг конъюгата L19-Cy3 вводили внутривенно (в/в) в латеральную хвостовую вену мышам, несущим лимфому. Мышей умерщвляли через 24 ч после введения и опухоли оперативно удаляли, окружали криогерметизирующим соединением (Microm, Вальдорф, Германия) и хранили при -80°C. Срезы размером 10 мкм нарезали, высушивали при 37°C в течение 15 мин и фиксировали 4% пара-формальдегидом в течение 15 мин при комнатной температуре. Антитело крысы против CD31 (BD Pharmingen) применяли для обозначения эндотелиальных клеток, используя кроличье антитело против IgG крысы с Alexa Fluor 488 в качестве вторичного антитела (Invitrogen). Изображения получали на микроскопе Axioskop 2 Mot plus, оборудованном камерой AxioCam MRc (Zeiss).

Количественное биораспределение

Для того чтобы количественно оценить осуществление направленной доставки in vivo, анализ биораспределения, используя меченные радиоизотопом препараты антител, проводили, как описано ранее (Camemolla et al., 2002). В кратком изложении, очищенный SIP(L19) метили радиоактивным йодом ^{125}I и в/в вводили мышам SCID, несущим п/к имплантированные ксенотрансплантаты лимфомы Рамоса, или мышам Balb/c, несущим системные изогенные лимфомы A20 (10 мкг, 12,2 мкКи на мышь). Мышей умерщвляли либо через 24 ч, либо 48 ч после введения, по меньшей мере трех животных использовали для каждого момента времени. Органы оценивали и радиоактивность определяли, используя γ-счетчик Cobra (Packard, Мериден, Коннектикут). Величину радиоактивности репрезентативных органов выражали как дозу, введенную на грамм ткани (% МД/г ± SE).

Модель ксенотрансплантата локализованной лимфомы

1×10^7 клеток лимфомы Рамоса или лимфомы DoHH-2 (1×10^7) вводили п/к в бок самкам мышей CB17/lcr SCID в возрасте 6-8 недель в день 0. Когда опухоли приживались и явно прощупывались (50-100 $мм^3$, день 8 после инъекции), мышей разделяли с максимальной однородностью среди групп и вводили им в латеральную хвостовую вену либо 20 мкг L19-IL2 (соответствующие 6,6 мкг или 118000 МЕ rIL-2), либо 6,6 мкг ненаправленного rIL-2, либо 200 мкг ритуксимаба, либо контрольный физиологический раствор в объеме 100 мкл на 8, 11, 14 и 17 день (Q3Dx4). Для исследований комбинированного лечения L19-IL2 (6,6 и 20 мкг, соответствующие 2,2 и 6,6 мкг «свободного» несвязанного rIL-2, соответственно), или неконъюгированного rIL-2 (2,2 и 6,6 мкг) вводили в сочетании с ритуксимабом (200 мкг) посредством отдельных в/в инъекций на 8, 11, 14 и 17 день. Для того чтобы проверить, будет ли одно только антитело L19 терапевтически активно, мышам

давали эквимолярные количества L19 в формате SIP (x.x мкг) или IgG (x.x мкг), отдельно или в сочетании со свободным rIL-2 (6,6 мкг). Схема лечения для всех средств (при монотерапии и способах комбинированного лечения) представляла собой четыре (Рамос) или три (DoHH-2) инъекции на каждый третий день в целом (Q3Dx4 или Q3Dx3, соответственно).

За мышами наблюдали ежедневно и измеряли рост опухоли по меньшей мере 3 раза в неделю цифровым штангенциркулем, используя следующую ниже формулу: объем = длина × ширина^2 × 0,5. Ответные реакции определяли в качестве полной ремиссии (CR, отсутствие видимой опухоли) или частичной ремиссии (PR, по меньшей мере, 50% снижения объема опухоли). Животных умерщвляли, когда объем опухоли достигал > 2000 мм^3 или у животных появлялись признаки заболевания. Все эксперименты на животных проводили по проектной лицензии «Tumor Targeting», изданной D.N. Kantonales Veterinaramt des Kantons Zurich (Bewilligung 198/2005).

Модель ксенотрансплантата диссеминированной лимфомы

Для того чтобы смоделировать системное заболевание, мышам SCID в/в вводили 2×10^6 клеток лимфомы Рамоса, ресуспендированных в 200 мкл PBS. Распределение и рост В-клеточной лимфомы обеспечивали в течение 8 дней до начала лечения. Мышей случайным образом делили на 6 групп ($n \geq 6$) и в/в вводили им либо 20 мкг L19-IL2, либо 6,6 мкг неконъюгированного rIL-2, либо 200 мкг ритуксимаба (группы монотерапии), или 200 мкг ритуксимаба в сочетании с 20 мкг L19-IL2, 200 мкг ритуксимаба в сочетании с 6,6 мкг неконъюгированного IL-2 (комбинированное лечение) или физиологический раствор в дни 8, 11, 14 и 17 (Q3Dx4). За мышами ежедневно наблюдали на предмет наличия паралича задней лапы или признаков ухудшающегося состояния, после чего мышей умерщвляли. Начало паралича или смерть устанавливали в качестве конечных точек, и выживание мышей регистрировали для анализа терапевтической эффективности. Эксперименты на животных, используя модель диссеминированной лимфомы, были сделаны в соответствии с поправкой 1 к лицензии по проекту "Tumor Targeting".

Статистический анализ

Данные выражали как среднее значение ± SE. Различия в объемах опухоли между различными группами мышей сравнивали, используя двухсторонний критерий Стьюдента. Кривые выживаемости Каплана-Мейера получали, чтобы продемонстрировать терапевтическую эффективность в модели диссеминированной лимфомы, и сравнения проводили, используя логарифмический ранговый критерий. Двухсторонние P-значения < 0,05 считали значимыми.

Результаты

Локализация in vitro: иммуногистохимия ксенотрансплантатных опухолей

Иммуногистохимические анализы срезов ксенотрансплантатов лимфомы Рамоса проводили, используя антитело L19, специфичное для домена EDB фибронектина. Как показано на Фиг.1 (левая панель), специфическое окрашивание сосудистых структур в ткани лимфомы можно было наблюдать для L19, похожее на их паттерн окрашивания в солидных опухолях, как проиллюстрировано с использованием ксенотрансплантата глиобластомы человека U87 (правая панель). Паттерн экспрессии EDB в ксенотрансплантатах лимфомы указывает на то, что данная изоформа может служить в качестве мишени для избирательной доставки биоактивных соединений к участку лимфомы in vivo.

Осуществление направленной доставки in vivo: флуоресценция и количественное биораспределение ex vivo

На следующей стадии исследовали, доступен ли экспрессирующийся в ксенотрансплантатах лимфомы EDB фибронектина для антитела L19 из кровотока in vivo. С этой целью, мышам, несущим подкожные опухоли лимфомы Рамоса, вводили в/в L19-SIP, химически меченный при помощи флуорофора Cy3. Через 24 ч животных умерщвляли и срезы опухолей обрабатывали, как описано в разделе «материалы и способы». На Фиг.2a показано 2-цветное изображение среза лимфомы с флуоресцентного микроскопа, подтверждающего локализацию в сосудистых структурах опухоли.

Для того чтобы оценить накопление антитела количественно, мышам, несущим п/к имплантированные ксенотрансплантаты лимфомы Рамоса, вводили в/в меченные радиоактивным йодом препараты L19-SIP. Как показано на Фиг.2b, для L19 проиллюстрировано накопление в ткани лимфомы при абсолютных величинах накопления опухоли 4,7% МД/г через 24 ч после введения, но только умеренные соотношения опухли и крови 2,1 в данный момент времени (соотношения опухоли и органа в диапазоне от 2,7 до 7,1). Однако через 48 ч антитело исчезало из нормальных органов более быстро, приводя к увеличению соотношений опухоли и крови (4,8) и опухоли и органа (до 17,3) и демонстрируя специфическое накопление и удерживание антитела в опухолевом участке.

Терапевтическая активность единичного средства L19-IL2 и единичного средства ритуксимаба в отношении локализованных ксенотрансплантатов лимфомы

Ранее было показано, что слитый белок антитело-цитокин L19-IL2 проявляет значительную противораковую активность в различных моделях солидных опухолей (Menrad et al. (Expert Opin Ther Targets. 2005; 9:491-500), Carnemolla et al. (Blood. 2002; 99:1659-1665)). Для того чтобы оценить эффективность монотерапии L19-IL2 в отношении В-клеточной лимфомы, мышам SCID вводили п/к 1×10^7 клеток Рамоса. На 8 день после имплантации опухолевой клетки, когда опухоль достигала размера 50-100 $мм^3$, мышам ($n \geq 4$) вводили в/в либо 20 мкг L19-IL2 (соответствующих 6,6 мкг rIL-2), либо 6,6 мкг неконъюгированного rIL-2, либо 200 мкг ритуксимаба, либо физиологический раствор (Q3Dx4). На Фиг.3 показано, что единичное средство L19-IL2 и единичное средство ритуксимаб в значительной степени ингибирует рост лимфомы по сравнению с контрольными мышами, получавшими физиологический раствор (P=0,024 и P=0,004, соответственно). В отличие от этого, эквимолярные количества неконъюгированного rIL-2 не проявляли никакого значительного терапевтического эффекта (P=0,383), подобно тому, о чем ранее сообщали для моделей солидных злокачественных новообразований на животных, и демонстрирующие вклад опосредованной антителом направленной доставки в сосудистые структуры цитокина в терапевтический эффект (L19-IL2 по сравнению с IL-2: P = 0,044). Однако и L19-IL2, и ритуксимаб только замедляли рост опухоли, когда их применяли в качестве монотерпии, и у всех животных проявлялось прогрессирующее заболевание в данном эксперименте. В то время как слитый белок L19-IL2 воспроизводимо ингибировал рост лимфомы (P=0,031), эквимолярные количества очищенного L19 в формате SIP или IgG были терапевтически не активны при введении по отдельности или в сочетании со свободным rIL-2, дополнительно аргументируя концепцию, что терапевтическая активность L19-IL2 обусловлена направленной доставкой цитокина к участку лимфомы (Фиг.7).

Для того чтобы получить информацию о связанной с лечением токсичности, измеряли массу тела животных по меньшей мере 3 раза в неделю. Не наблюдали никаких свидетельств токсичности, поскольку ни в одной из групп, получавшей

лечение, мыши не теряли более чем 3% массы тела на всем протяжении периода исследования.

Терапевтическая активность L19-IL2 и ритуксимаба в комбинации в отношении локализованных ксенотрансплантатов лимфомы

Сообщалось о множестве способов увеличить клиническую эффективность ритуксимаба, включая введение rIL-2 для усиления опосредованного ADCC уничтожения клеток лимфомы (Cartron et al., Blood. 2004; 104:2635-2642). Таким образом, авторы изобретения задались вопросом, будет ли комбинация направленного в сосудистые структуры IL-2 и терапии против CD20 терапевтически более эффективна, чем любой терапевтический подход в отдельности, и, в частности, превысило ли бы опосредованное антителом накопление IL-2 в ткани лимфомы эффективность комбинации неконъюгированного цитокина и ритуксимаба. С этой целью эксперимент по комбинированному лечению проводили согласно следующей ниже схеме (≥ 5 мышей в группе): 200 мкг ритуксимаба + 2,2 мкг неконъюгированного rIL-2 («низкая доза»), 200 мкг ритуксимаба + 6,6 мкг неконъюгированного rIL-2 («большая доза»), 200 мкг ритуксимаба + 6,6 мкг L19-IL2 («низкая доза», соответствующая 2,2 мкг rIL-2), 200 мкг ритуксимаба + 20 мкг L19-IL2 («большая доза», соответствующая 6,6 мкг rIL-2) или контрольный физиологический раствор. По аналогии с экспериментом с монотерапией инъекции начинали вводить на 8 день после инокуляции опухолевой клетки, когда образовывались прощупываемые п/к ксенотрансплантаты, и повторялись каждый третий день до достижения 4 инъекций в целом.

Как показано на Фиг.4, ритуксимаб в сочетании с неконъюгированным rIL-2 вызывает значительное замедление роста опухоли по сравнению с контролями (rIL-$2_{\text{низкая и большая дозы}}$ по сравнению с физиологическим раствором: P<0,001). Большая доза rIL-2 была немного более эффективна при увеличении эффективности ритуксимаба, чем низкая доза rIL-2 (P=0,038), однако не наблюдали никакой регрессии опухоли и все опухоли продолжали расти. В отличие от этого, комбинация ритуксимаба со слитым белком L19-IL2 показала значительно более высокую активность против лимфомы и вызвала полное уничтожение прижившейся лимфомы Рамоса у 4 из 5 мышей группы, получавшей большую дозу L19-IL2 (L19-$IL2_{\text{большая дозы}}$ по сравнению с физиологическим раствором: P<0,00001), причем 3 из 4 CR (полных ремиссий) достигали уже через 3 инъекции. Фактически, иммуноцитокин значительно более эффективен, чем соответствующее эквимолярное количество неконъюгированного rIL-2 в сочетании с ритуксимабом (L19-$IL2_{\text{большая доза}}$ по сравнению с rIL-$2_{\text{большая доза}}$: P<0,001). Примечательно, L19-IL2 даже при самом низком уровне дозы при комбинировании с ритуксимабом все же проявляет превосходную терапевтическую активность (L19-$IL2_{\text{низкая доза}}$ по сравнению с физиологическим раствором: P<0,00001; L19-$IL2_{\text{низкая доза}}$ по сравнению с rIL-$2_{\text{низкая доза}}$: P<0,00001), включая CR в 4 из 5 случаев после 4 курсов терапии, тогда как даже трехкратно более высокая доза ненаправленного цитокина, комбинированного с ритуксимабом, позволяла только замедлить рост опухоли (L19-$IL2_{\text{низкая доза}}$ по сравнению с $rIL2_{\text{большая доза}}$: P<0,001). В то время как животные, достигшие CR из группы, получавшей низкую дозу L19-IL2, с течением времени рецидивировали после периода ремиссии 21, 48, 50 и 81 дней, соответственно, все CR в группах, получавших более высокие дозы L19-IL2, были продолжительны и у всех мышей не было опухоли в течение периода наблюдения один год. Две мыши (одна из группы, получавшей низкую дозу, и одна из группы, получавшей большую дозу L19-IL2) не достигли CR,

но размер опухоли уменьшился до менее чем 20 мм^3.

Для того чтобы исследовать, может ли терапевтическое действие L19-IL2 в отдельности или в комбинации воспроизводиться на модели вторичной лимфомы, мышей SCID, несущих локализованные ксенотрансплантаты фолликулярной лимфомы DoHH-2, лечили при схожих условиях, как указано выше. По аналогии с моделью Рамоса L19-IL2 был эффективен в качестве единственного средства при ингибировании роста лимфомы ($P<0,0001$), все же не вызывая регресс опухоли, в то время как сумма его компонентов (очищенный L19 и rIL-2) в эквивалентных дозах не показала значительной терапевтической активности. При комбинировании с ритуксимабом L19-IL2 воспроизводимо приводит к полному уничтожению опухоли во всех случаях (5/5) без наличия свидетельств рецидива на 41 день и был значительно более эффективен, чем единственное средство ритуксимаб или комбинация ритуксимаба и ненаправленного rIL-2 (и очищенного L19) ($P<0,01$), даже при том, что CR наблюдали в обеих группах.

Терапевтическая активность всех средств, используемых против локализованных ксенотрансплантатов Рамоса и DoHH-2 при монотерапии и способах комбинированного лечения, приведена в таблице 1.

Важно, терапевтическое действие комбинированного лечения не связано с дополнительной токсичностью. Мыши не демонстрировали значительной потери массы тела в любой момент времени в период лечения (< 3%), указывая также на то, что схемы комбинированного лечения были хорошо переносимы.

Таблица 1

Активность rIL-2, L19-IL2 и ритуксимаба в отдельности и в комбинации против локализованных ксенотрансплантатов лимфомы

Обработка	PR	CR	Рецидив после CR
Рамос			
Физиологический раствор	0/9	0/9	–
rIL-2 (6.6 мкг)	0/4	0/4	–
L19-IL2 (20 мкг)	0/4	0/4	–
Ритуксимаб (200 мкг)	0/4	0/4	–

Ритуксимаб (200 мкг) + rIL-2 (2.2 мкг)	0/5	0/5	–
Ритуксимаб (200 мкг) + rIL-2 (6.6 мкг)	0/5	0/5	–
Ритуксимаб (200 мкг) + L19-IL2 (6.6 мкг)	1/5	4/5	4/4
Ритуксимаб (200 мкг) + L19-IL2 (20 мкг)	1/5	4/5	0/4
DoHH-2			
Физиологический раствор	0/5	0/5	–
rIL-2 (6.6 мкг) [+ SIP(L19)]	0/5	0/5	–
L19-IL2 (20 мкг)	0/5	0/5	–
Ритуксимаб (200 мкг)	2/5	2/5	1/2
Ритуксимаб (200 мкг) + rIL-2 (6.6 мкг) [+ SIP(L19)]	3/5	2/5	1/2
Ритуксимаб (200 мкг) + L19-IL2 (20 мкг)	0/5	5/5	0/5

Мышей SCID, несущих прижившиеся подкожные ксенотрансплантаты лимфомы Рамоса или DoHH-2, обрабатывали по указанным схемам лечения. Ответы определяли в качестве частичной ремиссии (PR, по меньшей мере, 50% снижения объема опухоли) или полной ремиссии (CR, отсутствие видимой или прощупываемой опухоли). Данные указывают число ответа/общее число в группе обработки. – не установлено.

Терапевтическая активность в модели диссеминированной лимфомы

Терапевтическая активность L19-IL2 в качестве единичного средства и в сочетании с ритуксимабом против ксенотрансплантатов диссеминированной лимфомы

NHL в прогрессирующей стадии у людей в основном развивается как диссеминированное заболевание. Для того чтобы исследовать активность L19-IL2 против системной лимфомы, авторы изобретения выбрали модель диссеминированной лимфомы SCID/Рамос. Мыши SCID, инокулированные в/в клетками лимфомы, регулярно страдают от паралича задних конечностей, происходящего из-за проявлений лимфомы в спинном мозге и указывая на последнюю фазу заболевания. В соответствии с опубликованными наблюдениями, в/в инъекция клеток Рамоса приводила к развитию паралича задней конечности на 26 день во всех случаях в предварительном эксперименте, указывая на сроки приживления трансплантата 100% (данные, не показаны). Поскольку паралич предшествовал смерти в каждом случае, появление паралича задней конечности установили в качестве конечной точки для исследований выживаемости. Начало лечения отодвигали на 8 дней для того, чтобы гарантировать приживление и рост клеток лимфомы. Дозирование и схемы приема средств были идентичны используемым в модели локализованной лимфомы Рамоса и активности как при монотерапии (rIL-2, L19-IL2, ритуксимаб), так и способах комбинированного лечения (ритуксимаб совместно с rIL-2, ритуксимаб совместно с L19-IL2) оценивали в данном эксперименте одновременно.

Кривые выживаемости Каплана-Мейера показаны на фигуре 5. На 25 день все получавшие физиологический раствор контрольные мыши становились жертвами заболевания при среднем времени выживаемости 24 дня. При введении одного только неконъюгированного rIL-2 не наблюдается значительного терапевтического благоприятного действия (среднее время выживаемости 24 дня; P=0,518, логранговый критерий). В отличие от этого соответствующая доза единственного средства L19-IL2

(20 мкг) увеличивала среднее время выживаемости до 29 дней (P < 0,010, по сравнению с ненаправленным rIL-2) и была в равной степени эффективна, как ритуксимаб, при задержке проявления заболевания по сравнению с получавшими физиологический раствор контролями (среднее время выживаемости 29 и 30 дней, соответственно, по сравнению с 24 днями; P < 0,001 для обоих средств). При способах комбинированного лечения добавление rIL-2 к ритуксимабу задерживало проявления заболевания весьма незначительно по сравнению с одним только ритуксимабом, не достигая статистической значимости (34 по сравнению с 30 днями; P = 0,180). Примечательно, в то время как у всех мышей, получавших единичное средство, а также всех мышей, получавших комбинацию ритуксимаба и ненаправленного rIL-2, в конечном счете, развивался терминальный паралич, 6 из 6 мышей, получавших L19-IL2 и ритуксимаб в комбинации, выживали в течение более чем 60 дней, не демонстрируя клинические проявления заболевания. На 62 день одну мышь необходимо было убить из-за потери в весе и выделений из глаз вследствие инфекции без свидетельств проявлений паралича или лимфомы при вскрытии трупа. Двух дополнительных мышей необходимо было умертвить на 73 и 79 день, соответственно, вследствие развития лимфомы в подмышечном лимфатическом узле, все же без паралича задней конечности. Три оставшиеся мыши все еще оставались без заболевания через 310 дней после инокуляции опухолевой клетки.

Подтверждение экспрессии мишени в образцах лимфомы человека

В заключение, иммуногистохимические анализы подтвердили наличие и сосудистый профиль экспрессии EDB фибронектина в В-клеточных злокачественных опухолях человека, включающих в себя диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому и лимфому Беркитта (Фиг.6).

Ссылки

Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with rituximab alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med 2002; 346:235-242.

Marcus R, Imrie K, Belch A, et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. Blood 2005; 105:1417-1423.

Hiddemann W, kneba M, Dreyling M, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. Blood 2005; 106:3725-3732.

Coiffier B. Treatment of non-Hodgkin's lymphoma: a look over the past decade. Clin Lymphoma Myeloma 2006; 7:S7-13.

Gordan L N, Grow W B, Pusateri A, et al. Phase II trial of individualized rituximab dosing for patients with CD20-positive lymphoproliferative disorders. J Clin Oncol 2005; 23:1096-1102.

Hoechster H S, Weller E, Gascoyne R, et al. Maintenance rituximab after CVP results in superior clinical outcome in advanced follicular lymphoma (FL): results of the E1496 Phase III Trial from the Eastern Cooperative Oncology Group and the Cancer and Leukemia Group B (abstract). Blood 2005; 106: No 349.

Habermann T M, Weller E A, Morrison V A, et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older

patients with diffus large B-cell lymphoma. J Clin Oncol 2006; 24:3121-3127.

Cragg M S, Gleannie M J. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagent. Blood 2004; 103:2738-2743.

Vugmeyster Y, Beyer J, Howell K, et al. Depletion of B cells by a humanized anti CD20 antibody PRO70769 in Macaca fascicularis. J Immunother 2005; 28:212-219.

Stein R, Qu Z, Chen S, et al. Characterization of a new humanized anti-CD20, IMMU-106, and its use in combination with the humanized abti-CD22 antibody, epratuzumab, for the therapy of non-Hodgkin's lymphoma. Clin Cancer Res 2004; 10:2868-2878.

Hagenbeek A, Plesner T, Johnson P et al. HuMax-CD20, a novel fully human anti-CD20 monoclonal antibody: results of a phase I/II trial in relapsed or refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma (abstract). Blood 2005; 106:4760a.

Weiner G J, Bowles J A, Link B K, et al. Anti-CD20 monoclonal antibody (mAb) with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab (abstract). Blood 2005; 106:348a.

Umana P, Mossner E, Brueckner P, et al. Novel 3rd generation humanized type II CD20 antibody with glycoengineered Fc and modified elbow hinge for enhanced ADCC and superior apoptosis induction (abstract). Blood 2006; 108:229a.

McLaughlin P, Grillo-Lopez A J, Link B K et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose

treatment program. J Clin Oncol 1998; 16:2825-2833.

Leonard J P, Coleman M, Ketas J C, et al. Phase I/II trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) in indolent non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol 2003; 21:3051-3059.

Leonard J P, Coleman M, Ketas J C, et al. Combination antibody therapy with epratuzumab and rituximab in relapsed of refractory non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol 2005; 23:5044-5051.

Leonard J P, Friedbereg J, Younes A, et al. A phase I/II study of galiximab (an anti-CD80 monoclonal antibody) in combination with rituximab for relapsed or refractory follicular lymphoma. Ann Oncol 2007; 18:1216-1223.

Fayad L, Patel H, Verhoef G et al., Clinical activity of the immunoconjugate CMC-544 in B-cell malignancies: preliminary report of the expanded maximum tolerated dose (MTD) coghort of phase 1 study (abstract). Blood 2006; 108:2711a.

Czuczman M S, THall A, Witzig T E, et al. Phase I/II study of galiximab, an anti-CD80 monoclonal antibody, for relapsed or refractory, follicular lymphoma. J Clin Oncol 2005:23:4390-4398.

Advani R, Forero-Torres A, Furmann R R, et al. SGN-40 (anti-huCD40 mAb) monotherapy induces durable objective responses in patients with relapsed aggressive non-Hodgkins's lymphoma: evidence of antitumor activity from a phase I study (abstract) Blood 2006; 108:695a.

Sauer S, Hoffmann J, Menrad A, Durkop H, Menssen H D. Expression of ED-B Fibronectin in Tissues from Human Hematologic Malignancies (abstract) Blood 2006; 108.

Assous N, Gossec L, Dieude P et al. Rituximab therapy in rheumatoid arthritis in daily practice. J. Rheumatol. 2008; 35:31-4.

Eisenbeis C F, Grainger A, Fischer B, Baiocchi R A, Carrodeguas L, Roychowdhury S, Chen L, Banks A L, Davis T, Young D, Kelbick N, Stephens J, Byrd J C, Grever M R, Caligiuri M A, Porcu P. Combination immunotherapy of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with rituximab and interleukin-2: a preclinical and phase I study. Clin. Cancer Res 2004; 10: 6101-6110;

W. L. Gluck, D. Hurst, A. Yuen, A. M. Levine, M. A. Dayton, J. P. Gockerman, J. Lucas, K. Denis-Mize, B. Tong, D. Navis, et al. Phase I Studies of Interleukin (IL)-2 and Rituximab in B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: IL-2 Mediated Natural Killer Cell Expansion Correlations with Clinical Response Clin. Cancer Res, 2004; 10: 2253-2264.

Формула изобретения

1. Комбинация для лечения рака, содержащая по меньшей мере

i) слитый белок, содержащий часть специфически распознающую EDb фибронектин, представляющую собой антитело, и часть, представляющую интерлейкин-2 и

ii) молекулу, связывающуюся с В-клетками, предшественниками В-клеток и/или их злокачественным аналогом, которая является антителом или фрагментом антитела, специфически связывающимся с CD20.

2. Комбинация по п.1, в которой часть, представляющая собой антитело (i), распознает домен EB_b фибронектина.

3. Комбинация по п.1 или 2, в которой слитый белок имеет линкер слитого белка, соединяющий часть, представляющую собой антитело, и часть, представляющую собой интерлейкин-2.

4. Комбинация по п.1 или 2, в которой часть, представляющая собой антитело, специфически связывается с доменом ED_b онкоэмбрионального фибронектина с субнаномолярной или наномолярной аффинностью.

5. Комбинация по п.1 или 2, в которой часть, представляющая собой антитело, содержит по меньшей мере одну последовательность CDR антитела L19.

6. Комбинация по п.1 или 2, в которой часть, представляющая собой антитело, содержит последовательности согласно SEQ ID NO:6-11.

7. Комбинация по п.1 или 2, в которой часть, представляющая собой антитело, содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь V согласно SEQ ID NO:1 или по

меньшей мере одну легкую цепь V согласно SEQ ID NO:2.

8. Комбинация по п.1 или 2, в которой часть, представляющая собой антитело, содержит одну тяжелую цепь V согласно SEQ ID NO:1 и одну легкую цепь V согласно SEQ ID NO:2.

9. Комбинация по п.1 или 2, в которой тяжелая и легкая цепи соединены линкером антитела.

10. Комбинация по п.1 или 2, в которой линкер антитела содержит последовательность согласно SEQ ID NO:3 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с последовательностью согласно SEQ ID NO:3.

11. Комбинация по п.1 или 2, в которой частью, представляющей собой интерлейкин-2, является интерлейкин-2 человека или его функциональный вариант.

12. Комбинация по п.1 или 2, в которой часть, представляющая собой интерлейкин-2, содержит последовательность согласно SEQ ID NO:4.

13. Комбинация по п.1 или 2, в которой линкер слитого белка соединяет часть, представляющую собой антитело, и часть, представляющую собой интерлейкин-2.

14. Комбинация по п.13, в которой линкер слитого белка имеет от 1 до 30 аминокислот в длину.

15. Комбинация по п.13, в которой линкер слитого белка содержит последовательность согласно SEQ ID NO:5.

16. Комбинация по п.1, в которой антитело против CD20 проявляет активность ADCC.

17. Комбинация по п.1 или 16, в которой антитело против CD20 выбрано из ритуксимаба, окрелизумаба, PR0 131921, велтузумаба, офатумумаба, AME-133 и GA-101.

18. Комбинация по п.1 или 2, в которой молекула, связывающаяся с В-клетками, предшественниками В-клеток и/или их злокачественным аналогом, является меченной, в частности радиоактивно меченной.

19. Комбинация по п.18, в которой меченная молекула, связывающаяся с В-клетками, предшественниками В-клеток и/или их злокачественным аналогом, представляет собой радиоактивно меченное антитело против CD20.

20. Комбинация по п.19, в которой радиоактивно меченное антитело против CD20 выбрано из антитела против CD20 меченного ^{90}Y, ^{111}In и ^{131}I.

21. Применение комбинации по пп.1-20 для получения лекарственного средства для лечения рака.

22. Применение по п.21, где раком является лимфома.

23. Применение по п.22, где лимфомой является В-клеточная лимфома, в частности неходжкинская лимфома (NHL).

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft

<120> Комбинация слитого белка антитело против EDb фибронектина-IL-2 и молекулы, связывающейся с B-клетками, предшественниками B-клеток и/или их злокачественным аналогом

<130> 53379AEP

<160> 11

<170> PatentIn версия 3.1

<210> 1

<211> 116

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Vh L19

<400> 1

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 Phe
20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr 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
85 90 95

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 108

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Vl L19

<400> 2

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 Ser Ser Ser
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser 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 Thr Gly Arg Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 3

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Линкер

<400> 3

Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser
1 5 10

<210> 4

<211> 133

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 5

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Линкер слитого белка

<400> 5

Glu Phe Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser
1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 Vh

<400> 6

Ser Phe Ser Met Ser
1 5

<210> 7

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 Vh

<400> 7

Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 Vh

<400> 8

Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 Vl

<400> 9

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 Vl

<400> 10

Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

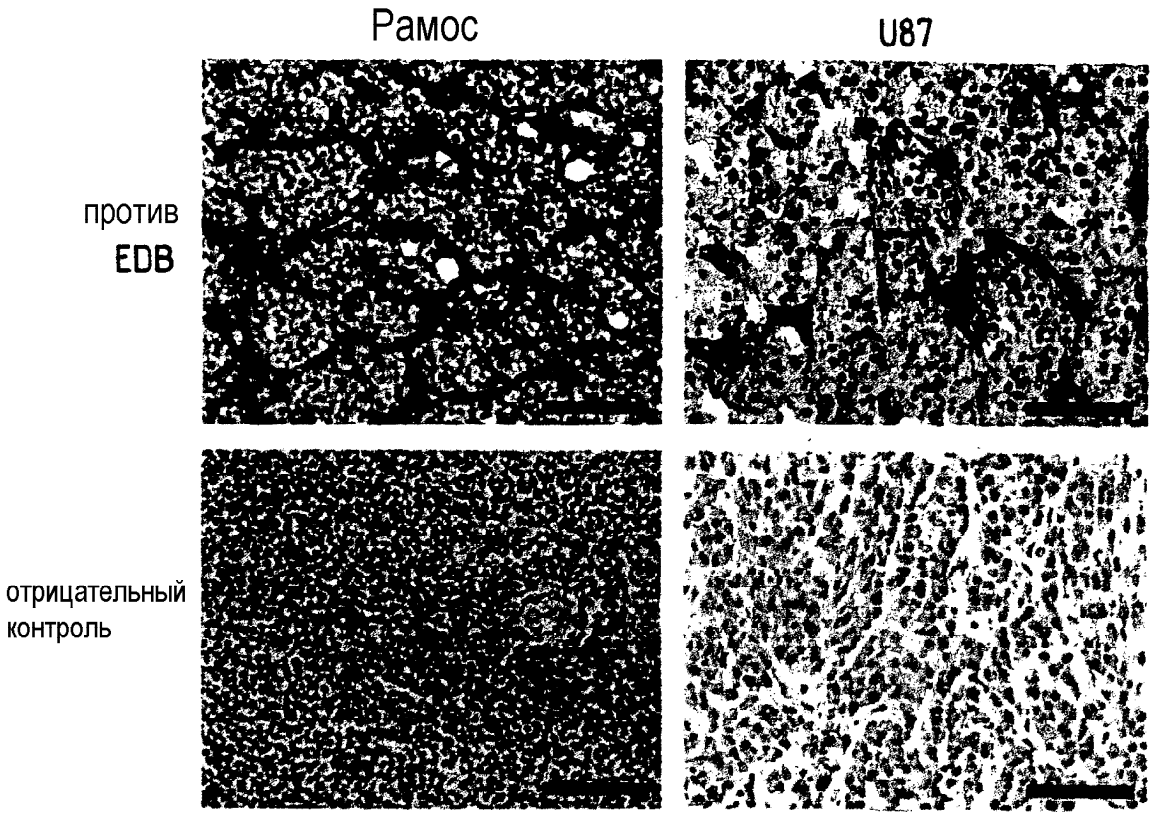
<220>

<223> CDR3 Vl

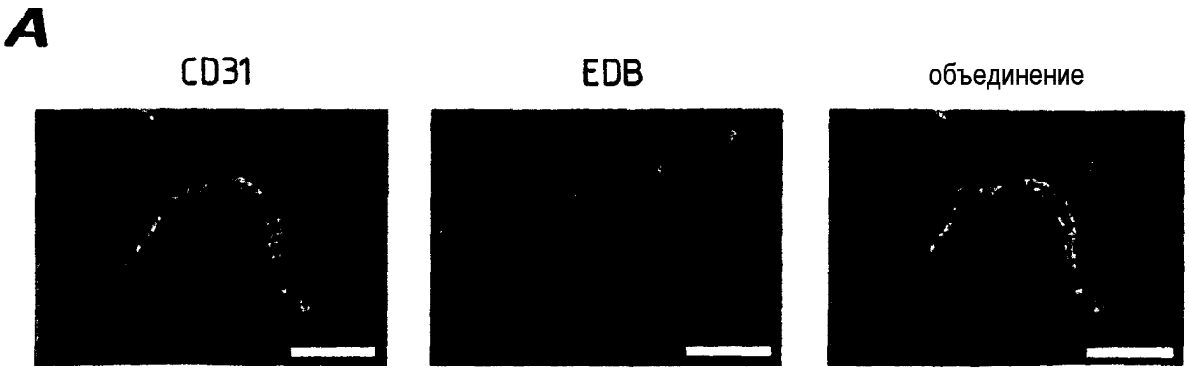
<400> 11

Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr

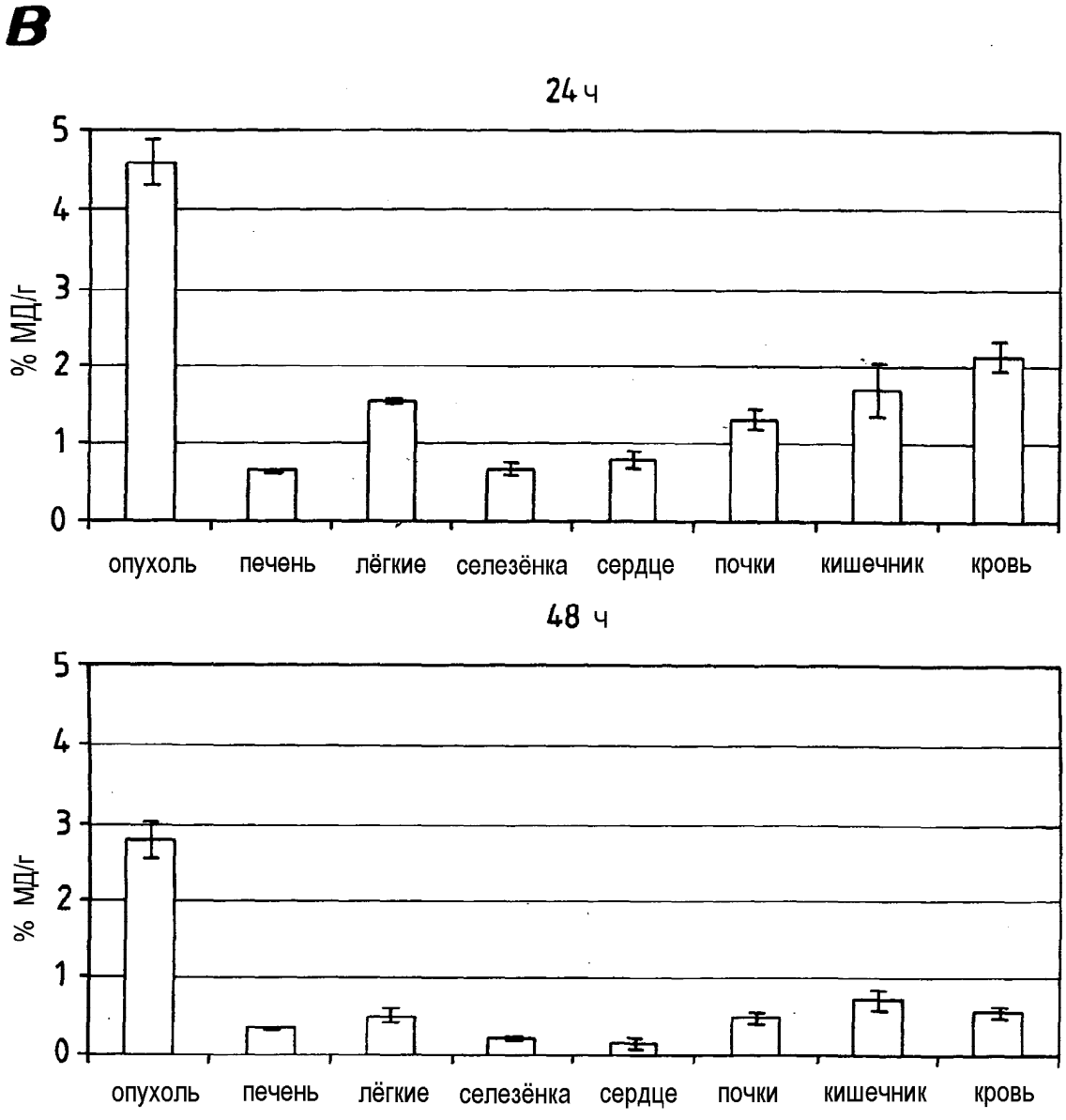
1 5



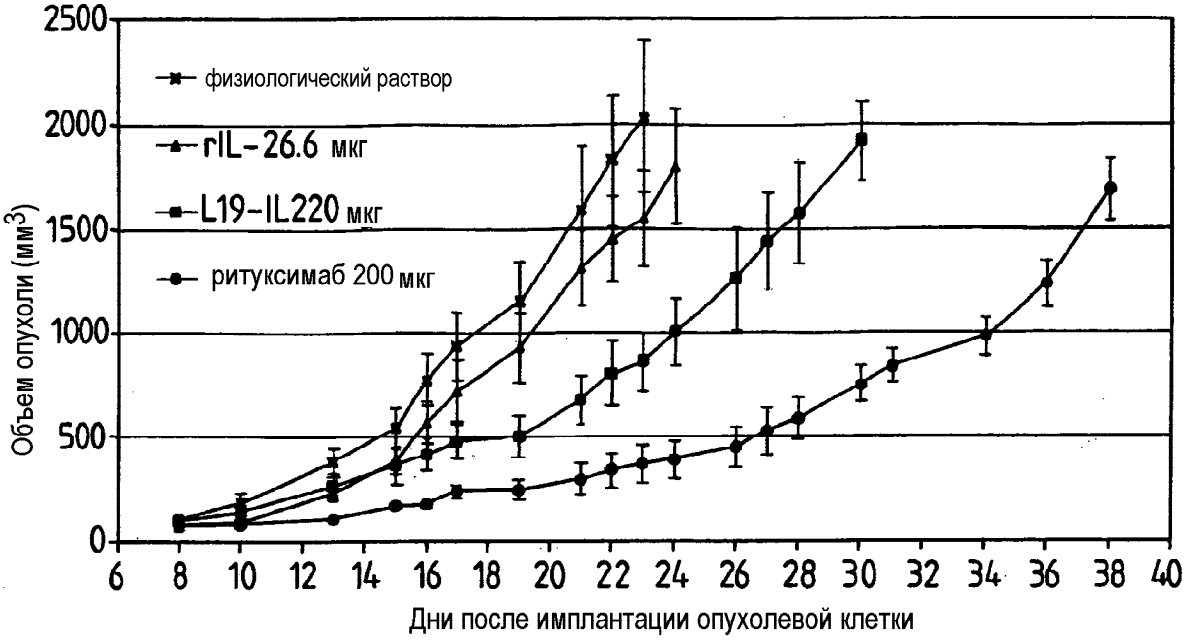
Фиг. 1


A
CD31
EDB
объединение

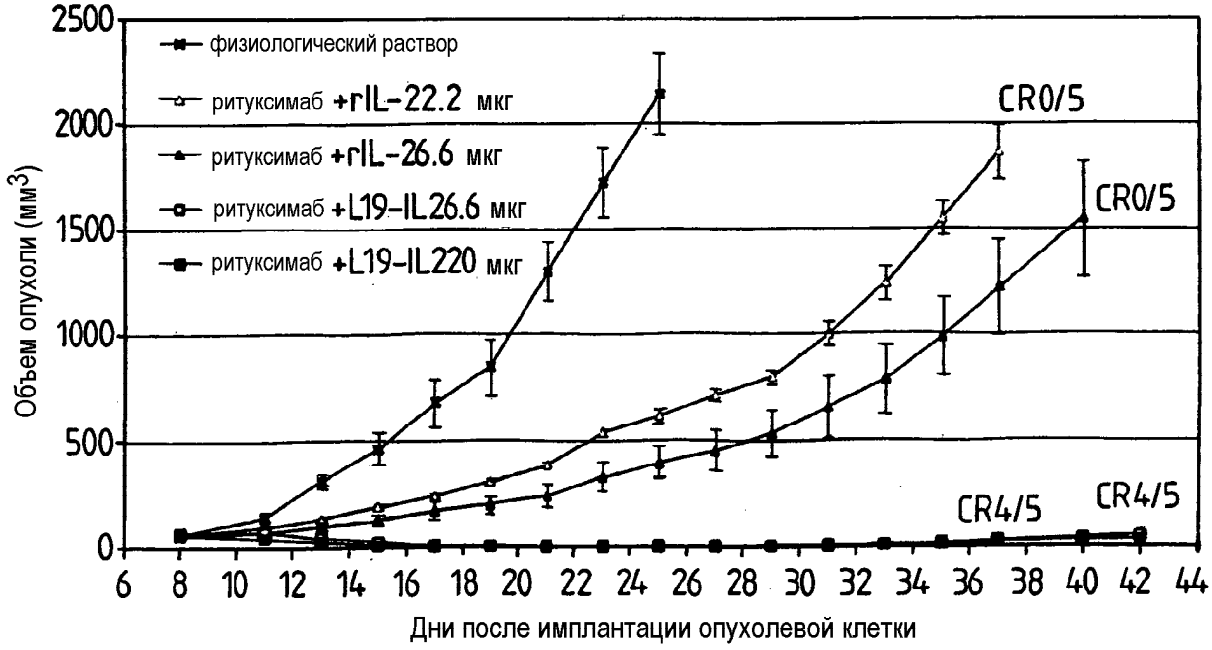
Фиг. 2


B
24 ч
% МД/г
0
1
2
3
4
5
опухоль
печень
лёгкие
селезёнка
сердце
почки
кишечник
кровь
48 ч
% МД/г
0
1
2
3
4
5
опухоль
печень
лёгкие
селезёнка
сердце
почки
кишечник
кровь

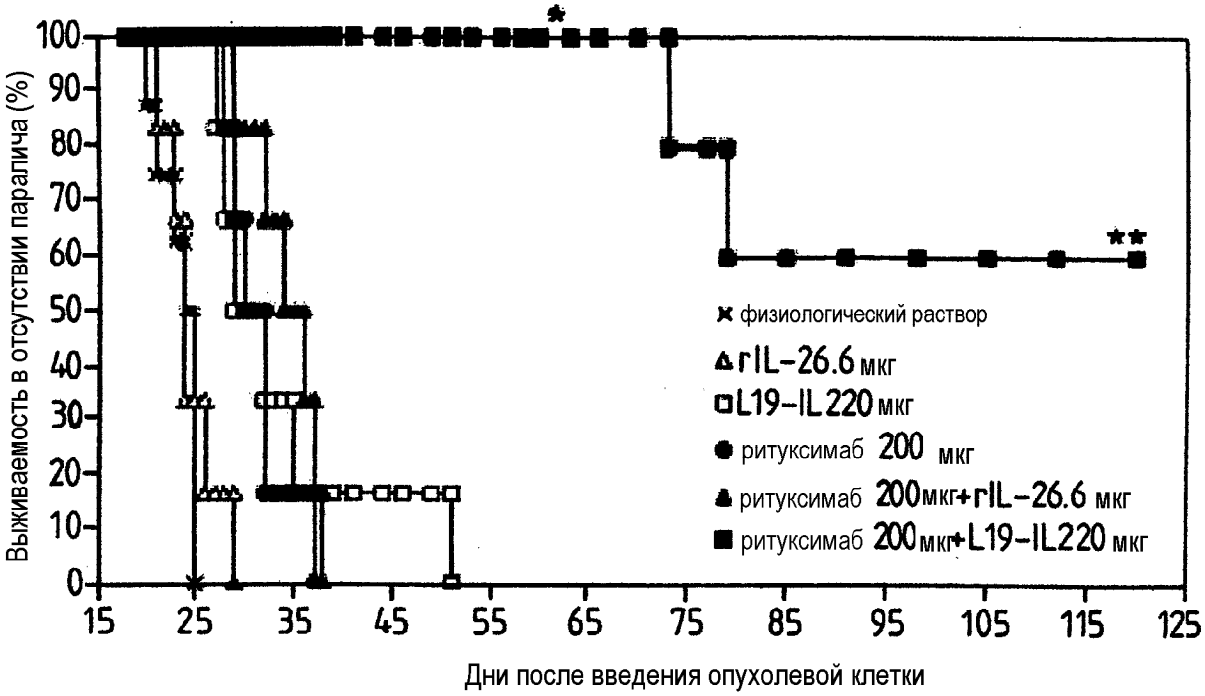
Фиг. 2


физиологический раствор
rIL-26.6 мкг
L19-IL220 мкг
ритуксимаб 200 мкг
Объем опухоли (мм3)
Дни после имплантации опухолевой клетки

Фиг. 3


физиологический раствор
ритуксимаб +rIL-22.2 мкг
ритуксимаб +rIL-26.6 мкг
ритуксимаб +L19-IL26.6 мкг
ритуксимаб +L19-IL220 мкг
CR0/5
CR0/5
CR4/5
CR4/5
Объем опухоли (мм3)
Дни после имплантации опухолевой клетки

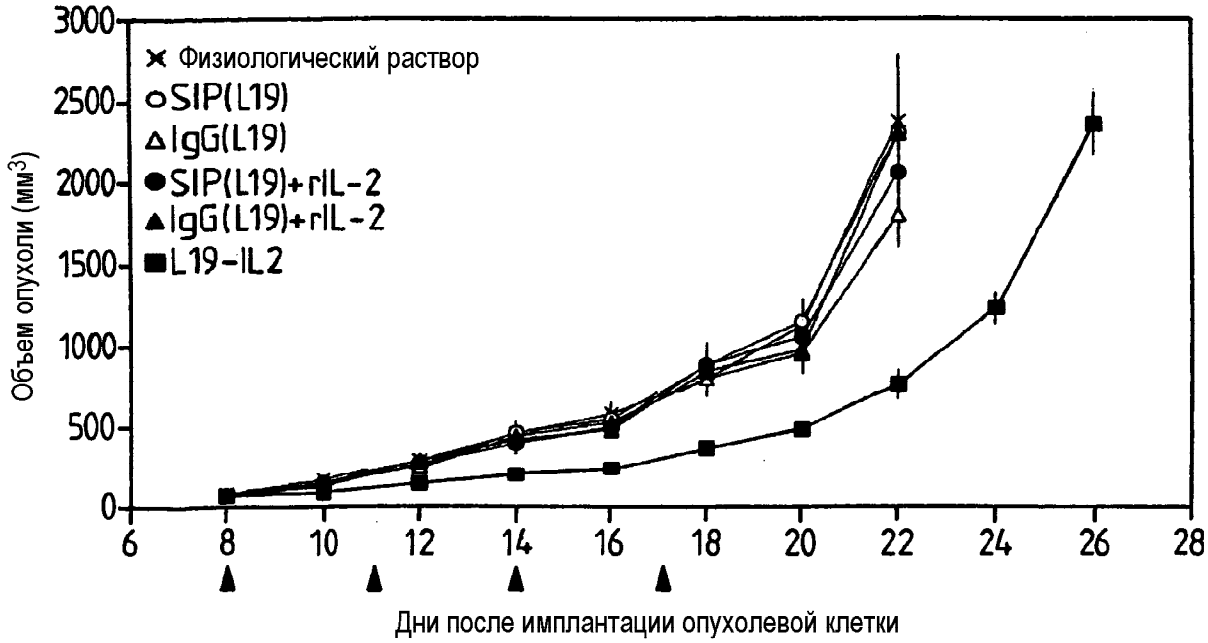
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7