

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 031080

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2018.11.30

(21) Номер заявки

201690333

(22) Дата подачи заявки

2014.08.08

(51) Int. Cl. C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

### (54) МОДУЛОКИНЫ НА ОСНОВЕ ДОМЕНА SUSHI IL-15 И IL-15R $\alpha$

(31) 13003963.9

(32) 2013.08.08

(33) ЕР

(43) 2016.06.30

(86) РСТ/ЕР2014/002181

(87) WO 2015/018528 2015.02.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
СИТЮН ФАРМА; УНИВЕРСИТЕ  
ПАРИ ДЕКАРТ; АССИСТАНС  
ПЮБЛИК - ОПИТО ДЕ ПАРИ;  
ЭНСТИТЮ НАСЬОНАЛЬ ДЕ  
ЛЯ САНТЕ Э ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ  
МЕДИКАЛЬ (ЭНСЕРМ) (FR)

(72) Изобретатель:

Жен Аллен, Тартур Эрик, Бешар Давид  
(FR)

(74) Представитель:

Носырева Е.Л. (RU)

(56) WO-A1-2012175222

JASON C. STEEL ET AL.: "Interleukin-15  
biology and its therapeutic implications in cancer",  
TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES,  
vol. 33, no. 1, January 2012 (2012-01), pages 35-41,  
XP028441944, ISSN: 0165-6147, DOI:10.1016/  
J.TIPS.2011.09.004 [retrieved on 2011-09-30] page  
38, column 2, paragraph 3

CARSON W.E.: "Braking Bad: Blockade  
of Inhibitory Pathways Improves Interleukin-15  
Therapy", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol.  
16, no. 24, 29 October 2010 (2010-10-29),  
pages 5917-5919, XP055150942, ISSN:  
1078-0432, DOI:10.1158/1078-0432.CCR-10-2658  
abstract; figure 1

(57) Настоящее изобретение относится к иммуноцитокину, содержащему (a) конъюгат и (b)  
иммуномодулирующее антитело или его фрагмент, напрямую или опосредованно связанные  
ковалентной связью с указанным конъюгатом, где указанный конъюгат содержит (i) полипептид,  
содержащий аминокислотную последовательность интерлейкина-15 или его производных, и (шиш)  
полипептид, содержащий аминокислотную последовательность домена sushi IL-15R $\alpha$  или его  
производных; и вариантам их применения.

B1

031080

031080 B1

Настоящая международная заявка на патент испрашивает приоритет европейской заявки на патент ЕР 13003963.9, поданной 8 августа 2013 г., которая включена в данный документ с помощью ссылки.

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к новым иммуноцитокинам, называемым в данном документе модулокинами, и их применению в качестве лекарственного препарата, в частности, для лечения рака, путем активации проникающих в опухоль лимфицитов (TIL).

### Предпосылки изобретения

Иммунная система позвоночных требует взаимодействий многих молекул и клеток для того, чтобы достичь оптимальных иммунных ответов против рака.

В настоящее время на противоопухолевый иммунитет хозяина влияют главным образом TIL (GALON et al., *Science*, vol. 313, p. 1960-1964, 2006). Действительно, многочисленные факты указали на то, что TIL подвержены ингибирующей регуляции посредством опухолевых клеток.

Для того чтобы "реактивировать" упомянутые TIL, были рассмотрены многие стратегии и мишени. Эти стратегии основаны либо на i) ингибировании иммуносупрессорных рецепторов TIL (например, CTL-A4, PD-1, BTLA, LAG3 HAVCR2, ADORA2A или ингибирующих KIR) для стимуляции иммунной активации путем предупреждения деактивирующих сигналов; либо на ii) стимуляции костимулирующих рецепторов TIL (например, CD40, 4-1BB, OX-40 или индуцированного глюкокортикоидами TNFR-связанного белка (GITR)) для стимуляции активации Т- и/или NK-клеток.

Хотя упомянутые виды терапии уже дали некоторые обнадеживающие результаты, по-видимому, эффективность этих стратегий ограничена. Большой частью лишь небольшой процент когорт демонстрирует восстановленный ответ TIL.

Для того чтобы получить усиленную эффективность, в настоящее время рассмотрено комбинирование этих стратегий с другими лекарственными средствами или модулятором.

В связи с этим, авторы пытаются комбинировать эти стратегии с антителом к PD1 с модулятором, раскрытым в заявке на патент WO 2007/046006.

Результаты показали, что данное комбинирование не смогло восстановить значительную часть, т.е. приблизительно 20%, TIL, выделенных из пациентов с гипернефрой (RCC).

### Краткое описание изобретения

Ниже авторы также испытывали другую комбинацию, в которой такой же модулятор сливался с таким же антителом, представляя новый тип иммуноцитокинов, который они назвали "модулокины". Неожиданным образом и по сравнению с предыдущей комбинацией эта комбинация обеспечивала выраженные реактивации TIL, при этом реактивация наблюдалась для большинства TIL, т.е. приблизительно 80%.

Эта выраженная синергия позволяет рассмотреть новые виды терапии.

Соответственно, настоящее изобретение относится к иммуноцитокину, содержащему:

А) коньюгат и

Б) иммуномодулирующее антитело или его фрагмент, напрямую или опосредовано связанный ковалентной связью с упомянутым коньюгатом,

где упомянутый коньюгат содержит:

(i) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность интерлейкина 15 или его производных, и

(ii) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность домена sushi IL-15R $\alpha$  или его производных.

В втором аспекте настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующй иммуноцитокин, как описано выше.

В третьем аспекте настоящее изобретение представляет вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, как описано выше.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, полученной способами генетической инженерии с использованием полинуклеотида или с использованием вектора, описанного ранее. Настоящее изобретение также относится к способу получения клетки-хозяина, полученной способами генетической инженерии, экспрессирующей иммуноцитокин в соответствии с настоящим изобретением, при этом упомянутый способ включает этапы: (i) введения *in vitro* или *ex vivo* нуклеиновой кислоты или вектора, как описано выше, в клетку-хозяин, (ii) культивирования *in vitro* или *ex vivo* рекомбинантной клетки-хозяин, полученной способами генетической инженерии, и (iii) необязательно отбора клеток, которые экспрессируют и/или секретируют упомянутый иммуноцитокин.

В предпочтительном варианте осуществления упомянутой клеткой-хозяином, полученной способами генетической инженерии, является животная клетка и предпочтительно клетка СНО.

В четвертом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую иммуноцитокин, описанный выше, кодирующую его нуклеиновую кислоту или вектор нуклеиновой кислоты, содержащий упомянутую нуклеиновую кислоту, впоследствии связанные с фармацевтически приемлемым носителем.

В предпочтительном варианте осуществления упомянутая композиция содержит дополнительное

терапевтическое средство, которым предпочтительно является противоопухолевое средство.

В шестом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, описанной ранее, для лечения рака у субъекта.

В седьмом аспекте настоящее изобретение относится к продуктам, содержащим:

(i) иммуноцитокин, как описано выше, последовательность кодирующей его нуклеиновой кислоты или вектор, содержащий такую последовательность нуклеиновой кислоты, и

(ii) терапевтическое средство, предпочтительно противоопухолевое средство,

в виде комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения для лечения рака у субъекта.

В восьмом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему этап введения упомянутому субъекту фармацевтической композиции, как упомянуто ранее.

В последнем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака, включающему этап одновременного, раздельного или последовательного введения субъекту, испытывающему потребность в этом, терапевтически эффективного количества

(i) иммуноцитокина, как описано выше, последовательности кодирующей его нуклеиновой кислоты или вектора, содержащего такую последовательность нуклеиновой кислоты, и

(ii) терапевтического средства, предпочтительно противоопухолевого средства.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 представлена экспрессия PD-1, Tim-3 и IL-15R $\alpha$  в TIL от пациента А (A) и у пациента В (B).

На фиг. 2 представлена реактивация проникающих в опухоль лимфоцитов (TIL), индуцированных антителом к PD1 (HBAT), RLI, комбинацией RLI и HBAT (RLI + HBAT) или модулокином согласно настоящему изобретению (HBAT - RLI).

#### **Подробное описание**

Термин "иммуноцитокин" относится к молекуле, содержащей антитело или его фрагменты, напрямую или опосредованно связанные ковалентной связью с питокином или его производными. Упомянутое антитело и цитокин могут быть связаны линкерным пептидом.

Конъюгат иммуноцитокина согласно настоящему изобретению.

Термин "интерлейкин 15" в его общем значении в данной области относится к цитокину со структурным сходством с IL-2 (GRABSTEIN et al., Science, vol. 264(5161), p. 965-968, 1994). Этот цитокин также известен как IL-15, IL15 или MGC9721. Этот цитокин и IL-2 обладают многими общими видами биологической активности и, как было обнаружено, связываются с одинаковыми субъединицами рецептора гематопоэтина. Таким образом, они могут конкурировать за один и тот же рецептор, отрицательно регулируя активность друг друга. Было установлено, что IL-15 регулирует активацию и пролиферацию Т-клеток и естественных клеток-киллеров и что число клеток памяти CD8+, как показано, контролируется балансом между этим цитокином и IL-2. Активность IL-15 можно измерить с помощью определения его индукции пролиферации на линии клеток kit225 (HORI et al., Blood, vol. 70(4), p. 1069-72, 1987), как раскрыто в примерах.

Упомянутый IL-15 или его производные имеют по меньшей мере 10% активности интерлейкина-15 человека в отношении индукции пролиферации линии клеток kit225, предпочтительно по меньшей мере 25% и более предпочтительно по меньшей мере 50%.

Упомянутый интерлейкин 15 представляет собой интерлейкин-15 млекопитающих, предпочтительно интерлейкин-15 приматов и более предпочтительно интерлейкин-15 человека.

Интерлейкин-15 млекопитающих может быть легко идентифицирован специалистом в данной области. В качестве примера можно привести интерлейкин-15 *Sus scrofa* (номер доступа ABF82250), *Rattus norvegicus* (номер доступа NP\_037261), *Mus musculus* (номер доступа NP\_032383), *Bos Taurus* (номер доступа NP\_776515), *Oryctolagus cuniculus* (номер доступа NP\_001075685), *Ovis aries* (номер доступа NP\_001009734), *Felis catus* (номер доступа NP\_001009207), *Macaca fascicularis* (номер доступа BAA19149), *Homo sapiens* (номер доступа NP\_000576), *Macaca Mulatta* (номер доступа NP\_001038196), *Cavia porcellus* (номер доступа NP\_001166300) или *Chlorocebus sabaeus* (номер доступа ACI289).

Используемый в данном документе термин "интерлейкин-15 млекопитающих" относится к консенсусной последовательности SEQ ID NO: 1.

Интерлейкин-15 приматов может быть легко идентифицирован специалистом в данной области. В качестве примера можно привести интерлейкин-15 *Sus scrofa* (номер доступа ABF82250), *Oryctolagus cuniculus* (номер доступа NP\_001075685), *Macaca fascicularis* (номер доступа BAA19149), *Homo sapiens* (номер доступа NP\_000576), *Macaca Mulatto*, (номер доступа NP\_001038196) или *Chlorocebus sabaeus* (номер доступа ACI289).

Используемый в данном документе термин "интерлейкин-15 приматов" относится к консенсусной последовательности SEQ ID NO: 2.

Интерлейкин-15 человека может быть легко идентифицирован специалистом и относится к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

Используемый в данном документе термин "производные интерлейкина-15" относится к аминокис-

лотной последовательности, имеющей процент идентичности по меньшей мере 92,5% (т.е. соответствующий приблизительно 10 аминокислотным заменам) по отношению к аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, предпочтительно по меньшей мере 96% (т.е. соответствующий приблизительно 5 аминокислотным заменам) и более предпочтительно по меньшей мере 98,5% (т.е. соответствующий приблизительно 2 аминокислотным заменам) или по меньшей мере 99% (т.е. соответствующий приблизительно 1 аминокислотной замене). Такие производные могут быть легко идентифицированы специалистом в данной области исходя из его личных знаний и идеи настоящей заявки на патент. В качестве примера таких производных можно привести таковые, описанные в международной заявке на патент PCT WO 2009/135031. Также будет понятно, что встречающиеся в природе аминокислоты могут быть замещены химически модифицированными аминокислотами. Обычно такие химически модифицированные аминокислоты повышают время полужизни полипептида.

Используемый в данном документе "процент идентичности" между двумя аминокислотными последовательностями означает процент идентичных аминокислот между двумя последовательностями, подлежащими сравнению, полученный с наилучшим выравниванием упомянутых последовательностей, при этом этот процент является чисто статистическим и различия между этими двумя последовательностями случайно распределяются в аминокислотных последовательностях. Как используется в данном документе, "наилучшее выравнивание" или "оптимальное выравнивание" означает выравнивание, для которого определенный процент идентичности (см. ниже) является наивысшим. Сравнение последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями обычно осуществляют с помощью сравнения этих последовательностей, которые ранее были выравнены в соответствии с наилучшим выравниванием; это сравнение осуществляют на сегментах сравнения для того, чтобы идентифицировать и сравнить локальные участки сходства. Наилучшее выравнивание последовательностей, подлежащих сравнению, можно осуществить, помимо ручного способа, с помощью алгоритма локальной гомологии, разработанного SMITH и WATERMAN (Ad. App. Math., vol. 2, p. 482, 1981), с помощью алгоритма глобальной гомологии, разработанного NEDDELMAN и WUNSCH (J. Mol. Biol., vol. 48, p. 443, 1970), с помощью способа сходства, разработанного PEARSON и LIPMAN (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 85, p. 2444, 1988), с помощью компьютерных программ, использующих такие алгоритмы (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Мадисон, Висконсин, США), с помощью алгоритмов множественного выравнивания MUSCLE (Edgar, Robert C., Nucleic Acids Research, vol. 32, p. 1792, 2004) или с помощью CLUSTAL (GOUJON et al., Nucleic acids research, vol. 38, W695-9, 2010).

Чтобы получить наилучшее локальное выравнивание, предпочтительно можно использовать программное обеспечение BLAST с матрицей BLOSUM 62. Процент идентичности между двумя последовательностями аминокислот определяют путем сравнения этих двух оптимально выравненных последовательностей, при этом для того, чтобы получить оптимальное выравнивание между этими двумя последовательностями, аминокислотные последовательности могут охватывать добавления или делеции в отношении эталонной последовательности. Процент идентичности рассчитывают с помощью определения числа идентичных положений между этими двумя последовательностями и деления этого числа на общее число сравниваемых положений, а затем умножения полученного результата на 100 для того, чтобы получить процент идентичности между этими двумя последовательностями.

Предпочтительно производными интерлейкина 15 являются агонист или суперагонист IL-15. Специалист в данной области может легко идентифицировать агонист или суперагонист IL-15. В качестве примера агониста или суперагониста IL-15 можно привести таковые, раскрытие в международной заявке на патент WO 2005/085282 или в ZHU et al. (J. Immunol, vol. 183(6), p. 3598-607, 2009).

Еще более предпочтительно упомянутый агонист или суперагонист IL-15 выбирают в группе, включающей/состоящей из L45D, L45E, S51D, L52D, N72D, N72E, N72A, N72S, N72Y и N72P (в отношении последовательности IL-15 человека, SEQ ID NO: 3).

Используемый в данном документе термин "домен sushi IL-15R $\alpha$ " имеет свое обычное значение в данной области и относится к домену, начинающемуся в первом остатке цистеина (C1) после сигнального пептида IL-15R $\alpha$  и заканчивающемуся в четвертом остатке цистеина (C4) после упомянутого сигнального пептида. Упомянутый домен sushi, соответствующий части внеклеточной области IL-15R $\alpha$ , необходим для его связывания с IL-15 (WEI et al., J. Immunol, vol. 167(1), p. 277-282, 2001).

Упомянутый домен sushi IL-15R $\alpha$  или его производные характеризуется по меньшей мере 10% связывающей активностью домена sushi IL-15R $\alpha$  человека с интерлейкином-15 человека, предпочтительно по меньшей мере 25% и более предпочтительно по меньшей мере 50%. Упомянутая связывающая активность может быть легко определена с помощью способа, раскрытоого в WEI et al. (упомянутого выше, 2001).

Упомянутый домен sushi IL-15R $\alpha$  представляет собой домен sushi IL-15R $\alpha$  млекопитающих, предпочтительно домен sushi IL-15R $\alpha$  приматов и более предпочтительно домен sushi IL-15R $\alpha$  человека.

Домен sushi IL-15R $\alpha$  млекопитающих может быть легко идентифицирован специалистом в данной

области. В качестве примера можно привести домен sushi IL-15R $\alpha$  Rattus norvegicus (номер доступа XP\_002728555), Mus musculus (номер доступа EDL08026), Bos Taurus (номер доступа XP\_002692113), Oryctolagus cuniculus (номер доступа XP\_002723298), Macaca fascicularis (номер доступа ACI42785), Macaca nemestrina (номер доступа ACI42783), Homo sapiens (номер доступа Q13261.1), Macaca Mulatta (номер доступа NP\_001166315), Pongo abelii (номер доступа XP\_002820541), Cercocebus torquatus (номер доступа ACI42784), Callithrix jacchus (номер доступа XP\_002750073) или Cavia porcellus (номер доступа NP\_001166314).

Используемый в данном документе термин "домен sushi IL-15R $\alpha$  млекопитающих" относится к консенсусной последовательности SEQ ID NO: 4.

Предпочтительно полипептид, содержащий аминокислотную последовательность домена sushi IL-15R $\alpha$  млекопитающих, относится к консенсусной последовательности SEQ ID NO: 5.

Домен sushi IL-15R $\alpha$  приматов может быть легко идентифицирован специалистом в данной области. В качестве примера можно привести домены sushi IL-15R $\alpha$  Oryctolagus cuniculus, Macaca fascicularis, Macaca nemestrina, Homo sapiens, Macaca Mulatta, Pongo abelii, Cercocebus torquatus или Callithrix jacchus.

Используемый в данном документе термин "домен sushi IL-15R $\alpha$  приматов" относится к консенсусной последовательности SEQ ID NO: 6.

Предпочтительно полипептид, содержащий аминокислотную последовательность домена sushi IL-15R $\alpha$  приматов, относится к консенсусной последовательности SEQ ID NO: 7.

Домен sushi IL-15R $\alpha$  человека может быть легко идентифицирован специалистом и относится к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

Предпочтительно полипептид, содержащий аминокислотную последовательность домена sushi IL-15R $\alpha$  человека, относится к SEQ ID NO: 9.

Используемый в данном документе термин "производные домена sushi IL-15R $\alpha$ " относится к аминокислотной последовательности, имеющей процент идентичности по меньшей мере 92% (т.е. соответствующий приблизительно 5 аминокислотным заменам) в отношении аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, предпочтительно по меньшей мере 96% (т.е. соответствующий приблизительно 2 аминокислотным заменам) и более предпочтительно по меньшей мере 98% (т.е. соответствующий приблизительно 1 аминокислотной замене). Такие производные содержат четыре остатка цистеина домена sushi L-15R $\alpha$  и могут быть легко идентифицированы специалистом в данной области исходя из его/ее общих знаний и идеи настоящей заявки на патент. Также будет понятно, что встречающиеся в природе аминокислоты могут быть замещены химически модифицированными аминокислотами. Обычно такие химически модифицированные аминокислоты способны повышать время полужизни полипептида.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления коньюгат содержит (ii) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность домена sushi и шарнирного домена IL-15R $\alpha$  или его производных.

Шарнирный домен IL-15R $\alpha$  определяют как аминокислотную последовательность, которая начинается в первом аминокислотном остатке после домена sushi и которая заканчивается в последнем аминокислотном остатке перед первым потенциальным сайтом гликозилирования. В IL-15R $\alpha$  человека аминокислотная последовательность шарнирного участка состоит из четырнадцати аминокислот, которые расположены после домена sushi этого IL-15R $\alpha$ , в С-концевом положении по отношению к упомянутому домену sushi, т.е. упомянутый шарнирный участок IL-15R $\alpha$  начинается в первой аминокислоте после упомянутого (C4) остатка цистеина и заканчивается в четырнадцатой аминокислоте (счет в стандартной "N-концевой - С-концевой" ориентации).

Упомянутый домен sushi и шарнирный домен IL-15R $\alpha$  представляют собой домен sushi и шарнирный домен IL-15R $\alpha$  млекопитающих, предпочтительно домен sushi и шарнирный домен IL-15R $\alpha$  приматов и более предпочтительно домен sushi и шарнирный домен IL-15R $\alpha$  человека.

Аминокислотная последовательность домена sushi и шарнирного домена IL-15R $\alpha$  млекопитающих может быть легко идентифицирована специалистом в данной области. Используемый в данном документе термин "домен sushi и шарнирный домен IL-15R $\alpha$  млекопитающих" относится к консенсусной последовательности SEQ ID NO: 10.

Аминокислотная последовательность домена sushi и шарнирного домена IL-15R $\alpha$  приматов может быть легко идентифицирована специалистом в данной области. Используемый в данном документе термин "домен sushi и шарнирный домен IL-15R $\alpha$  приматов" относится к консенсусной последовательности SEQ ID NO: 11.

Аминокислотная последовательность домена sushi и шарнирного домена IL-15R $\alpha$  человека может быть легко идентифицирована специалистом в данной области. Используемый в данном документе термин "домен sushi и шарнирный домен IL-15R $\alpha$  человека" относится к консенсусной последовательности SEQ ID NO: 12.

Используемый в данном документе термин "производные домена sushi и шарнирного домена IL-

$15R\alpha$ " относится к аминокислотной последовательности, имеющей процент идентичности по меньшей мере 93% (т.е. соответствующий приблизительно 5 аминокислотным заменам) в отношении аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, предпочтительно по меньшей мере 97% (т.е. соответствующий приблизительно 2 аминокислотным заменам) и более предпочтительно по меньшей мере 98% (т.е. соответствующий приблизительно 1 аминокислотной замене). Такие производные содержат четыре остатка цистеина домена sushi  $L-15R\alpha$  и могут быть легко идентифицированы специалистом в данной области исходя из его общих знаний и идеи настоящей заявки на патент. Также будет понятно, что встречающиеся в природе аминокислоты могут быть замещены химически модифицированными аминокислотами. Обычно такие химически модифицированные аминокислоты способны повышать время полужизни полипептида.

Оба полипептида i) и ii) конъюгата могут быть связаны нековалентной связью, такой как в комплексе, раскрытом в патенте US 8124084 B2. Упомянутый конъюгат или комплекс может быть легко получен путем обеспечения подходящего количества полипептида i), обеспечения подходящего количества полипептида ii), смешивания обоих полипептидов при подходящем pH и ионных условиях в течение времени, достаточного для получения комплекса (т.е. конъюгата), и необязательно концентрирования и очистки упомянутого комплекса. Полипептиды комплекса (т.е. конъюгата) могут быть образованы, например, с помощью синтезатора пептидов в соответствии со стандартными способами; с помощью экспрессии каждого полипептида отдельно в клетке или клеточном экстракте, затем выделения и очистки полипептида. Необязательно терапевтический полипептидный комплекс в соответствии с настоящим изобретением может быть получен с помощью экспрессии обоих полипептидов i) и ii) в одной и той же клетке или клеточном экстракте, затем выделения и очистки комплексов, например, с помощью хроматографических методик, таких как аффинная хроматография с антителами к части лимфокина, части рецептора лимфокина или к комплексу.

Оба полипептида i) и ii) конъюгата могут быть также ковалентно связаны с помощью бифункциональных белок-связывающих агентов или в слитом белке.

Бифункциональные белок-связывающие агенты хорошо известны специалисту в данной области, в том числе способы их использования, и включают, в качестве примеров, N-сукцинимидил(2-пиридинилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол).

Термин "слитый белок" относится к белку, полученному путем объединения двух или более генов, которые изначально кодировали отдельные белки. Он также известен как химерный белок. Трансляция этого слитого гена приводит к образованию одного полипептида с функциональными свойствами, полученными от каждого из исходных белков. Рекомбинантные слитые белки получают искусственным путем с помощью технологии рекомбинантных ДНК для использования в биологических исследованиях или терапии. Рекомбинантный слитый белок представляет собой белок, полученный в процессе генетической инженерии из слитого гена. Это обычно включает удаление стоп-кодона из последовательности кДНК, кодирующй первый белок, затем прибавление последовательности кДНК второго белка в рамке путем опосредованной лигированием ПЦР или ПЦР с перекрывающимися праймерами. Эта последовательность ДНК будет затем экспрессироваться клеткой в виде одного белка. Белок может быть сконструирован генетически таким образом, чтобы включать полную последовательность обоих исходных белков или только часть каждого.

В предпочтительном варианте осуществления конъюгат является слитым белком.

Аминокислотная последовательность интерлейкина 15 или его производных может располагаться в С-концевом или в N-концевом положении по отношению к аминокислотной последовательности домена sushi  $IL-15R\alpha$  или его производных. Предпочтительно аминокислотная последовательность интерлейкина 15 или его производных расположена в С-концевом положении по отношению к аминокислотной последовательности домена sushi  $IL-15R\alpha$  или его производных.

Аминокислотная последовательность интерлейкина 15 или его производных и аминокислотная последовательность домена sushi  $IL-15R\alpha$  или его производных могут быть отделены первой "линкерной" аминокислотной последовательностью. Упомянутая первая "линкерная" аминокислотная последовательность может быть равной длине, достаточной для обеспечения того, чтобы слитый белок формировал надлежащие вторичные и третичные структуры.

Длина первой линкерной аминокислотной последовательности может варьировать без значительного влияния на биологическую активность слитого белка. Обычно первая линкерная аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере одну, но менее 30 аминокислот, например линкер из 2-30 аминокислот, предпочтительно из 10-30 аминокислот, более предпочтительно из 15-30 аминокислот, еще более предпочтительно из 15-25 аминокислот, наиболее предпочтительно из 18-22 аминокислот.

Предпочтительными линкерными аминокислотными последовательностями являются таковые, которые способствуют тому, что коньюгат принимает надлежащую конформацию (т.е. конформацию, способствующую надлежащей активности проведения сигнала по сигнальному пути IL-15R $\beta/\gamma$ ).

Наиболее подходящие линкерные аминокислотные последовательности (1) будут принимать гибкую растянутую конформацию, (2) не будут склонны к образованию упорядоченной вторичной структуры, которая могла бы взаимодействовать с функциональными доменами слитых белков, и (3) будут иметь минимальную гидрофобную характеристику или характеристику заряда, которая способствовала бы взаимодействию с функциональными доменами белка.

Предпочтительно первая линкерная аминокислотная последовательность содержит близкие к нейтральным аминокислоты, выбранные из группы, включающей Gly (G), Asn (N), Ser (S), Thr (T), Ala (A), Leu (L) и Gln (Q), более предпочтительно из группы, включающей Gly (G), Asn (N) и Ser (S).

Примеры линкерных последовательностей описаны в патентных документах США № 5073627 и № 5108910.

Иллюстративные гибкие линкеры, которые являются, в частности, подходящими для настоящего изобретения, включают таковые, кодируемые последовательностями SEQ ID NO: 13 (SGGSGGGSGGSGGGSQLQ), SEQ ID NO: 14 (SGGSGGGSGGGSGGGSGG) или SEQ ID NO: 15 (SGGGSGGGSGGGSGGGSQLQ).

Предпочтительно коньюгат имеет последовательность SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19.

Антитело иммуноцитокина согласно настоящему изобретению.

Термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, соответствующей тетрамеру, содержащему четыре полипептидные цепи, две идентичные тяжелые (H) цепи (приблизительно 50-70 кДа при полной длине) и две идентичные легкие (L) цепи (приблизительно 25 кДа при полной длине), соединенные между собой дисульфидными связями. Легкие цепи классифицируются как каппа и лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон и определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. Каждая тяжелая цепь состоит из N-концевого вариабельного участка тяжелой цепи (сокращен в данном документе как HCVR) и константного участка тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи состоит из трех доменов (CH1, CH2 и CH3) для IgG, IgD и IgA и 4 доменов (CH1, CH2, CH3 и CH4) для IgM и IgE. Каждая легкая цепь состоит из N-концевого вариабельного участка легкой цепи (сокращен в данном документе как LCVR) и константного участка легкой цепи. Константный участок легкой цепи состоит из одного домена, CL. Участки HCVR и LCVR далее могут подразделяться на участки гипервариабельности, называемые участками, определяющими комплементарность (CDR), расположеннымными между участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками (FR). Каждый HCVR и LCVR состоит из трех CDR и четырех FR, упорядоченных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Распределение аминокислот по каждому домену соответствует хорошо известным условиям. Функциональная способность антитела связываться с определенным антигеном зависит от вариабельных участков каждой пары легкой/тяжелой цепи и, главным образом, определяется CDR.

Термин "антитело", используемый в данном документе, относится к моноклональному антителу как таковому. Моноклональным антителом может быть антитело человека, химерное антитело и/или гуманизированное антитело.

Преимущественно выражение антитело относится к IgG, такому как IgG1, IgG2 (IgG2a или IgG2b), IgG3 и IgG4. Предпочтительно выражение антитело относится к IgG1 или IgG2 и более предпочтительно к IgG2a.

"Химерное антитело" означает антитело, которое состоит из вариабельных участков мышного иммуноглобулина и константных участков иммуноглобулина человека. Это изменение состоит просто из замещения константного участка антитела человека константным участком мыши, приводя, таким образом, к химере человек/мышь, которая может иметь достаточно низкую иммуногенность для того, чтобы быть приемлемой для фармацевтического использования. Ряд способов получения таких химерных антител уже были описаны с формированием, таким образом, части общих знаний специалиста в данной области (см., например, патент США № 5225539).

"Гуманизированное антитело" означает антитело, которое состоит частично или полностью из аминокислотных последовательностей, полученных из зародышевой линии антител человека путем изменения последовательности антитела, имеющего участки, определяющие комплементарность, не принадлежащие человеку (CDR). Эту гуманизацию вариабельного участка антитела и в конечном итоге CDR выполняют с помощью методик, которые в настоящее время хорошо известны в данной области. В качестве примера британская заявка на патент GB 2188638A и патент США № 5585089 раскрывают способы, в которых получают рекомбинантные антитела, где единственной частью, которую замещают, является участок, определяющий комплементарность, или "CDR". Методика пересадки CDR используется для получения антител, которые состоят из мышных CDR, каркаса вариабельного участка и константных участков человека (см., например, RIECHMANN et al., Nature, vol. 332, p. 323-327, 1988). Эти антитела сохраняют константные участки человека, которые необходимы для Fc-зависимой эффекторной функ-

ции, однако с намного меньшей вероятностью вызовут иммунный ответ к антителу. В качестве примера каркасные участки вариабельных участков замещают соответствующими каркасными участками человека, оставляя CDR, не принадлежащий человеку, фактически интактным, или даже замещая CDR последовательностями, полученными из генома человека. Антитела, полностью принадлежащие человеку, получают в генетически модифицированных мышах, иммунные системы которых были изменены таким образом, чтобы соответствовать иммунным системам человека. Как упомянуто выше, для использования в способах согласно настоящему изобретению достаточно применять иммунологически специфический фрагмент антитела, включающий фрагменты, соответствующие одноцепочечным формам.

Гуманизированное антитело снова относится к антителу, содержащему каркас человека, по меньшей мере один CDR от антитела, не принадлежащего человеку, и в котором любой присутствующий константный участок фактически идентичен константному участку иммуноглобулина человека, т.е. идентичен по меньшей мере на приблизительно 85 или 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%. Таким образом, все части гуманизированного антитела, кроме, возможно, CDR, фактически идентичны соответствующим частям одного или нескольких нативных последовательностей иммуноглобулинов человека. Например, гуманизированный иммуноглобулин обычно не будет охватывать химерное антитело с вариабельным участком мыши/константным участком человека. В качестве примера разработку гуманизированных иммуноглобулинов можно осуществлять следующим образом: когда аминокислота попадает под следующую категорию, каркасную аминокислоту иммуноглобулина человека, подлежащую использованию (акцепторного иммуноглобулина), замещают каркасной аминокислотой из иммуноглобулина, представляющего CDR, не принадлежащего человеку (донорного иммуноглобулина): (а) аминокислота в каркасном участке человека акцепторного иммуноглобулина является необычной для иммуноглобулина человека в этом положении, где соответствующая аминокислота в донорном иммуноглобулине является типичной для иммуноглобулина человека в этом положении; (б) положение аминокислоты является непосредственно прилежащим к одному из CDR; или (с) любой атом боковой цепи каркасной аминокислоты расположен в пределах приблизительно 5-6 Å (от центра к центру) от любого атома аминокислоты CDR в трехмерной модели иммуноглобулина (QUEEN et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, p. 2869, 1991). Если каждая из аминокислот в каркасном участке человека акцепторного иммуноглобулина и соответствующая аминокислота в донорном иммуноглобулине является необычной для иммуноглобулина человека в этом положении, такую аминокислоту замещают аминокислотой, типичной для иммуноглобулина человека в этом положении.

Термин "фрагмент антитела", используемый в данном документе, относится к фрагменту антитела, способному к реакции с тем же самым антигеном, что и его аналог антитела. Такие фрагменты могут быть легко идентифицированы специалистом в данной области и содержат, в качестве примера, фрагмент  $F_{ab}$  (например, в результате расщепления папаином), фрагмент  $F_{ab}'$  (например, в результате расщепления пепсином и частичного восстановления), фрагмент  $F_{(ab')}_2$  (например, в результате расщепления пепсином),  $F_{acb}$  (например, в результате расщепления плаズмином),  $F_d$  (например, в результате расщепления пепсином, частичного восстановления и реагрегации), а также фрагмент  $scF_v$  (одноцепочечный  $F_v$ ; например, в результате методик молекулярной биологии), охваченные настоящим изобретением.

Такие фрагменты можно получить с помощью ферментативного расщепления, синтетических или рекомбинантных методик, как известно в данной области и/или как описано в данном документе. Антитела также можно получить в ряде усеченных форм с использованием генов антител, в которых один или более стоп-кодонов были введены в обратном направлении от встречающегося в природе сайта стоп-кодона. Например, комбинированный ген, кодирующий часть тяжелой цепи  $F_{(ab')}_2$ , может быть разработан таким образом, чтобы включать последовательности ДНК, кодирующие домен  $CH_1$  и/или шарнирный участок тяжелой цепи. Различные части антител можно соединить вместе химическим путем с помощью традиционных методик или можно получить в виде непрерывного белка с помощью методик генетической инженерии.

Предпочтительно упомянутым фрагментом антитела является фрагмент  $scF_v$ .

Выражение "иммуномодулирующее антитело", как используется в данном документе, относится к антителу, действующему либо путем

1) ингибирования иммуносупрессорного рецептора, такого как CTL-A4, PD-1, BTLA, LAG3 HAVCR2, ADORA2A или ингибирующих KIR с помощью связывания или этого рецептора, или его лиганда, способствуя, таким образом, иммунной активации путем предупреждения деактивирующих сигналов; либо

2) стимулирования костимулирующего рецептора, такого как CD40, CD137, CD134 или TNFRSF18 (GITR), способствуя, таким образом, активации Т- и/или NK-клеток.

В первом предпочтительном варианте осуществления иммуномодулирующее антитело ингибирует иммуносупрессорный рецептор. В качестве примера иммуномодулирующих антител, ингибирующих иммуносупрессорные рецепторы, можно привести антагонисты CTL-A4, ингибирующих KIR, BTLA, LAG3 HAVCR2, ADORA2A и PD-1 и более предпочтительно антагонисты PD-1, выбранные среди антител к PD1 и к PD-L1.

CTL-A4 (антиген, ассоциированный с цитотоксическими лимфоцитами, также обозначаемый CD

152) был описан в 1987 г. (BRUNET et al., *Nature*, vol. 328, p. 267-270, 1987). Роль CTL-A4 заключается преимущественно в том, чтобы ингибиовать активацию Т-клеток, и это было показано у мышей с недостаточностью CTL-A4, страдающих массивной лимфопролиферацией (CHAMBERS et al., *Immunity*, vol. 7, p. 8855-8959, 1997). В настоящее время было показано, что блокада CTL-A4, усиливает ответы Т-клеток *in vitro* (WALUNAS et al., *Immunity*, vol. 1, p. 405-413, 1994) и *in vivo* (KEARNEY, J. *Immunol*, vol. 155, p. 1032-1036, 1995) и также усиливает противоопухолевый иммунитет (LEACH, *Science*, vol. 271, p. 1734-1736, 1996). В качестве примера антител, соответствующих антагонистам CTL-A4, можно привести ипилимумаб (также обозначаемый как MDX-010 и 10D1, доступный от MEDAREX и поставляемый на рынок компанией Bristol-Myers Squibb как YERVOY<sup>TM</sup>), раскрытый в WO 01/14424, тицилимумаб (также известный как 11.2.1 и CP-675206), раскрытый в WO 00/37504, а также антитела к CTL-A4, раскрытые в международных заявках на патент WO 98/42752, WO 01/14424, WO 2004/035607 и WO 2012/120125, в ЕР 1212422 и ЕР 1262193, в патентах США №№ 5811097, US 5855887, US 5977318, US 6051227, US 6207156, US 6682736, US 6984720, US 7109003 и US 7132281, которые включены в данный документ с помощью ссылки.

Белок запрограммированной клеточной смерти 1, также известный как PD-1 (также обозначаемый как PDCD1 или CD279), представляет собой мембранный гликопротеин типа I с массой ~55 кДа. PD-1 представляет собой рецептор семейства костимулирующего гена CD28, который умеренно экспрессируется на наивных Т-, В- и NK-клетках и активируется передачей сигнала на рецепторы Т/В-клеток на лимфоцитах, моноцитах и миелоидных клетках. PD-1 имеет два известных лиганда с различными профилими экспрессии, PD-L1 (B7-H1), который широко экспрессируется, т.е. на наивных лимфоцитах, на активированных В- и Т-клетках, моноцитах и дендритных клетках, и PD-L2 (B7-DC), экспрессия которого ограничена, т.е. на активированных дендритных клетках, макрофагах и моноцитах, а также на клетках эндотелия сосудов. В нескольких мышиных сингенных опухолевых моделях блокада либо PD-1, либо PD-L1 значительно ингибирировала опухолевый рост или индуцировала полную регрессию. Таким образом, PD-1 признают как важный фактор регуляции иммунной системы и поддержания периферической устойчивости. В качестве примера антител, соответствующих антагонистам PD-1, можно привести ниволумаб (также известный как BMS-936558 или MDX1106; антитело к PD-1, BRISTOL-MYERS SQUIBB), раскрытый в WO 2006/121168, Merck 3745 (также известный как MK-3475 или SCH-900475, представляет собой антитело к PD-1), раскрытый в WO 2009/114335, CT-011 (также известный как hBAT или hBAT-1, PD-1), раскрытый в WO 2009/101611, ламбролизумаб, раскрытый в WO 2008/156712, AMP514, который раскрыт в WO 2010/027423, WO 2010/027827, WO 2010/027828 и WO 2010/098788, а также антитела, раскрытые в международных заявках на патент WO 2004/056875, WO 2006/056875, WO 2008/083174, WO 2010/029434, WO 2010/029435, WO 2010/036959, WO 2010/089411, WO 2011/110604, WO 2012/135408 и WO 2012/145493. Упомянутый антагонист PD-1 может соответствовать антителу к PD-L1, такому как MDX-1105 (также известному как BMS-936559, антитело к PD-L1), раскрытыму в WO 2007/005874, или YW243.55.S70 (также известному как MPDL3280A или RG7446; антителу к PD-L1), раскрытыму в WO 2010/077634, которые включены в данный документ с помощью ссылки.

Иммуноглобулинподобные рецепторы клеток-киллеров (KIR) представляют собой семейство белков клеточной поверхности, обнаруженных на важных клетках иммунной системы, называемых естественными клетками-киллерами (NK). Они регулируют киллерную функцию данных клеток путем взаимодействия с молекулами МНС класса I, которые экспрессируются на всех типах клеток. Это взаимодействие позволяет им обнаруживать клетки, зараженные вирусом, или опухолевые клетки, которые имеют характерный низкий уровень МНС класса I на своей поверхности. Большинство KIR являются ингибирующими, означая, что распознавание МНС подавляет цитотоксическую активность их NK-клетки. Лишь ограниченное число KIR имеет способность активировать клетку.

Ингибирующие KIR имеют длинный цитоплазматический хвост, содержащий ингибирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITIM), который проводит ингибирующие сигналы к NK-клетке при соединении с их лигандами МНС класса I. Известные ингибирующие KIR включают представителей подсемейств KIR2DL и KIR3DL, включающих KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2 и KIR3DL3. В качестве примера антител, соответствующих антагонистам ингибирующих KIR, можно привести антитело 1-7F9, раскрытое в WO 2006/003179, который включен в данный документ с помощью ссылки.

BTLA (аттенюатор В- и Т-лимфоцитов), также известный как CD272, индуцируется во время активации Т-клеток и остается экспрессируемым на Th1-клетках, но не на Th2-клетках. BTLA проявляет ингибирование Т-клеток путем взаимодействия с фактором некроза опухоли (рецептором), представителем 14 (TNFRSF14), также известным как медиатор вхождения вируса герпеса (HVEM), TR2; ATAR; HVEA; CD270; LIGHTR. TNFRSF14 был идентифицирован как клеточный медиатор вхождения вируса простого герпеса (HSV). Было обнаружено, что цитоплазматический участок данного рецептора связывается с несколькими членами семейства TRAF, которые могут опосредовать пути проведения сигнала, которые активируют иммунный ответ. В конечном итоге комплексы BTLA/HVEM отрицательно регулируют иммунные ответы Т-клеток. В качестве примера антагониста BTLA/HVEM можно привести антитела, раскрытые в WO 2008/076560, WO 2010/106051 и WO 2011/014438.

LAG3 (ген активации лимфоцитов 3, также известный как CD223) принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов (Ig) и содержит 4 внеклеточных Ig-подобных домена. В качестве примера антагонистов LAG3 можно привести антитела, раскрытие которых описано в WO 2010/019570.

HAVCR2 (клеточный рецептор 2 вируса гепатита А, также известный как Tim-3, KIM-3; TIMD3; Tim-3 и TIMD-3) является Th1-специфическим белком клеточной поверхности, принадлежащим к суперсемейству иммуноглобулинов. HAVCR2 регулирует активацию макрофагов и ингибиторно влияет на Th1-опосредованные ауто- и аллоиммунные ответы, способствуя таким образом иммунологической устойчивости. В качестве примера антагонистов HAVCR2 можно привести антитела, раскрытие которых описано в WO 2013/006490A.

ADORA2A (рецептор аденозина A<sub>2A</sub>, также известный как A2aR, RDC8 или ADORA2) принадлежит к суперсемейству рецепторов, сопряженных с белком (G-белком), связывающим гуаниновый нуклеотид (GPCR), которое разделяют на классы и подтипы. Этот белок играет важную роль во многих биологических функциях, таких как сердечный ритм и кровообращение, мозговой и почечный кровоток, иммунная функция, регуляция боли и сна. Он был связан с патофизиологическими состояниями, такими как воспалительные заболевания и нейродегенеративные нарушения.

В втором предпочтительном варианте осуществления иммуномодулирующее антитело стимулирует костимулирующий рецептор.

В качестве примера иммуномодулирующих антител, стимулирующих костимулирующие рецепторы, можно привести агонисты CD40, CD137, CD134 и TNFRSF18.

CD40 является представителем суперсемейства TNF-рецептора, обнаруженного на APC, который требуется для их активации. Было обнаружено, что этот рецептор является необходимым в опосредовании широкого спектра иммунных и воспалительных ответов, включающих переключение класса зависимых от Т-клеток иммуноглобулинов и развитие В-клеток памяти.

В качестве примера антител, соответствующих агонистам CD40, можно привести такие, раскрытие которых описано в WO 03/040170, в WO 2005/063981, в WO 2005/063289 и в WO 2012/041635, которые включены в данный документ с помощью ссылки.

CD137 является представителем семейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF). Его альтернативными названиями являются представитель 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF9), 4-1BB и рецептор, индуцированный активацией лимфоцитов (ILA). CD137 может быть экспрессирован активированными Т-клетками, но в большей степени на Т-клетках CD8, чем на Т-клетках CD4. Кроме того, экспрессия CD137 встречается на дендритных клетках, фолликулярных дендритных клетках, естественных клетках-киллеров, гранулоцитах и клетках стенок кровеносных сосудов в местах воспаления. Наиболее описанной активностью CD137 является его костимулирующая активность в отношении активированных Т-клеток. Перекрестное сшивание CD137 усиливает пролиферацию Т-клеток, поддержание секреции и цитолитическую активность IL-2. Кроме того, оно может усиливать активность иммунной системы для того, чтобы уничтожить опухоли у мышей.

В качестве примера антител, соответствующих агонистам CD137, можно привести урелумаб (также известный как BMS-663513) и антитела, раскрытие которых описано в WO 03/040170, WO 2004/010947, в WO 2005/035584, WO 2006/126835 и в WO 2012/145183, которые включены в данный документ с помощью ссылки.

CD134, также известный как OX40, является представителем суперсемейства рецепторов TNFR. OX40 представляет собой костимулирующую молекулу, при этом экспрессия OX40 зависит от полной активации Т-клетки. OX40 связывается с рецепторами на Т-клетках, предотвращая их гибель и впоследствии повышая продукцию цитокинов. OX40 играет критическую роль в поддержании иммунного ответа после первых нескольких дней и далее до ответа памяти вследствие его способности повышать выживание.

В качестве примера антител, соответствующих агонистам CD134, можно привести антитела, раскрытие которых описано в WO 2009/079335, в WO 2012/027328, WO 2013/038191 и в WO 2013/028231, которые включены в данный документ с помощью ссылки.

Представитель 18 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF18), также известен как рецептор семейства TNFR, индуцируемый активацией (AITR), или TNFR-связанный белок, индуцируемый глюкокортикоидами (GITR), является представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF-R). Этот белок представляет собой поверхность рецепторную молекулу, которая, как было показано, участвует в ингибировании супрессорной активности Т-регуляторных клеток и увеличении выживаемости Т-эффекторных клеток.

В качестве примера антител, соответствующих агонистам TNFRSF18, можно привести антитела, раскрытие которых описано в WO 2006/105021 и в WO 2011/028683.

Как конъюгат, так и антитело или его фрагмент могут быть ковалентно связаны с помощью бифункциональных белоксвязывающих агентов или находиться в слитом белке.

Способы использования бифункциональных белоксвязывающих агентов хорошо известны специалисту в данной области и были раскрыты ранее. В качестве примера специалист в данной области может использовать способ, раскрытие которого описано в TILL et al. (Proc. Natl. Acad. U.S.A., vol. 86(6), p. 1987-91, 1989).

В предпочтительном варианте осуществления иммуноцитокин является слитым белком.

В другом предпочтительном варианте осуществления иммуноцитокин является комплексом, предпочтительно комплексом, содержащим коньюгат между полипептидами i) и ii), где полипептид i) или ii) слит с антителом или его фрагментом.

Полипептид i), полипептид ii) или коньюгат может находиться в С-концевом или в N-концевом положении по отношению к аминокислотной последовательности антитела или его фрагмента.

Предпочтительно коньюгат является слитым белком, и аминокислотная последовательность коньюгата находится в С-концевом положении по отношению к аминокислотной последовательности антитела или его фрагмента, более предпочтительно в С-концевом положении по отношению к аминокислотной последовательности по меньшей мере одного константного участка тяжелой цепи антитела или его фрагмента.

Аминокислотная последовательность коньюгата и аминокислотная последовательность антитела или его фрагмента может быть отделена или не отделена второй "линкерной" аминокислотной последовательностью.

В конкретном варианте осуществления иммуноцитокин согласно настоящему изобретению является слитым белком, где коньюгат и антитело или его фрагмент не отделены каким-либо линкером.

Как и в случае первой линкерной аминокислотной последовательности упомянутая вторая "линкерная" аминокислотная последовательность может иметь длину, достаточную для обеспечения того, чтобы слитый белок образовывал надлежащие вторичные и третичные структуры.

Длина первой линкерной аминокислотной последовательности может варьировать без значительно-го влияния на биологическую активность слитого белка. Обычно первая линкерная аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере одну, но менее 30 аминокислот, например линкер из 2-30 аминокислот, предпочтительно из 10-30 аминокислот, более предпочтительно из 15-30 аминокислот, наиболее предпочтительно из 15-25 аминокислот.

Как и в случае первой линкерной аминокислотной последовательности, наиболее подходящие вторые линкерные аминокислотные последовательности (1) будут принимать гибкую растянутую конформацию, (2) не будут предрасположены к образованию упорядоченной вторичной структуры, которая могла бы взаимодействовать с функциональными доменами слитых белков, и (3) будут иметь минимальную гидрофобную характеристику или характеристику заряда, которая способствовала бы взаимодействию с функциональными доменами белка.

Предпочтительно вторая линкерная аминокислотная последовательность содержит близкие к ней-тральным аминокислоты, выбранные из группы, включающей Gly (G), Asn (N), Ser (S), Thr (T), Ala (A), Leu (L) и Gln (Q), более предпочтительно из группы, включающей Gly (G), Asn (N) и Ser (S).

В качестве примера второй линкерной аминокислотной последовательности, которая является под-ходящей для настоящего изобретения, можно привести последовательность SEQ ID NO: 16 (SGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG) или SEQ ID NO: 17 (AAGGGSGGGSGGGSGGGSAA).

Нуклеиновые кислоты, векторы и рекомбинантные клетки-хозяева.

Во втором аспекте настояще изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей иммуно-цитокин, как описано выше, предпочтительно иммуноцитокин, соответствующий слитому белку.

Упомянутая нуклеиновая кислота соответствует РНК или ДНК, предпочтительно ДНК.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая иммуноцитокин согласно настоящему изобретению, функционально связана с последовательностью экспрессии гена, который направляет экспрессию нуклеиновой кислоты в прокариотической или эукариоти-ческой клетке, предпочтительно в эукариотической клетке. "Последовательность экспрессии гена" пред-ставляет собой любую регуляторную нуклеотидную последовательность, такую как промоторная после-довательность или комбинация промотор-энхансер, которая облегчает эффективную транскрипцию и трансляцию нуклеиновой кислоты иммуноцитокина, с которым она функционально связана. Последова-тельность экспрессии гена может представлять собой, например, промотор млекопитающих или вирусов, такой как конститутивный или индуцибельный промотор.

Конститутивные промоторы млекопитающих включают, но без ограничений, промоторы для сле-дующих генов: гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPTR), аденоzindezaminазы, пируваткиназы, промотора бета-актина, промотора мышечной креатинкиназы, промотора фактора элонгации человека и другие конститутивные промоторы. Иллюстративные промоторы вирусов, которые функционируют кон-ститутивно в эукариотических клетках, включают, например, промоторы вируса обезьян (например, SV40), вируса папилломы, аденонаруса, вируса иммунодефицита человека (HIV), цитомегаловируса (CMV), вируса саркомы Payса (RSV), вируса гепатита В (HBV), длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Молони и других ретровирусов и тимидинкиназный промотор вируса простого герпеса. Спе-циалистам в данной области известны другие конститутивные промоторы.

Промоторы, подходящие в качестве последовательностей экспрессии гена согласно настоящему изобретению, также включают индуцибельные промоторы. Индуцибельные промоторы экспрессируются в присутствии индуцирующего средства. Например, металлотион в промоторе индуцируется для актива-ции транскрипции и трансляции в присутствии некоторых ионов металлов. Специалистам в данном об-

ласти известны другие индуцибельные промоторы.

Как правило, последовательность экспрессии гена будет включать в качестве необходимости 5'-нетраскрибируемые и 5'-нетранслируемые последовательности, участвующие в инициации транскрипции и трансляции соответственно, такие как ТАТА-бокс, кэппинг-последовательность, последовательность СААТ и т.п. В частности, такие 5'-нетраскрибируемые последовательности будут включать промоторный участок, который включает промоторную последовательность для контроля транскрипции функционально соединенной нуклеиновой кислоты. Последовательности экспрессии гена необязательно включают энхансерные последовательности или при необходимости расположенные против хода транскрипции активирующие последовательности. Как используется в данном документе, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая иммуноцитокин согласно настоящему изобретению, и последовательность экспрессии гена считаются "функционально связанными", если они ковалентно связаны таким образом, чтобы экспрессия или транскрипция и/или трансляция кодирующей последовательности иммуноцитокина согласно настоящему изобретению находилась под влиянием или контролем последовательности экспрессии гена.

Две ДНК-последовательности считаются функционально связанными, если индукция промотора в 5' последовательности экспрессии гена приводит к транскрипции иммуноцитокина согласно настоящему изобретению и если природа связи между ДНК-последовательностями (1) не приводит к введению мутации по типу сдвига рамки, (2) не нарушает способность промоторного участка направлять транскрипцию иммуноцитокина согласно настоящему изобретению или (3) не нарушает способность соответствующего РНК-транскрипта транслироваться в белок. Таким образом, последовательность экспрессии гена была бы функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноцитокин согласно настоящему изобретению, если бы последовательность экспрессии гена могла влиять на транскрипцию этой последовательности нуклеиновой кислоты таким образом, чтобы полученный транскрипт транслировался в желаемый полипептид.

Преимущественно упомянутая последовательность нуклеиновой кислоты содержит инtron, поскольку, как часто было показано, молекулы пре-мРНК улучшают результаты продукции рекомбинантных молекул. Любые последовательности интрана могут быть сшиты, и в качестве примера можно привести таковые, раскрытые в ZAGO et al. (Biotechnol. Appl. Biochem., vol. 52 (Pt 3), p. 191-8, 2009) и в CAMPOS-DA-PAZ et al. (Mol. Biotechnol., vol. 39(2), p. 155-8, 2008).

Нуклеиновая кислота, кодирующая иммуноцитокин согласно настоящему изобретению, может быть доставлена *in vivo* отдельно или совместно с вектором.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, как описано выше.

В своем самом широком смысле "вектор" представляет собой любой переносчик, способный облегчить перенос нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноцитокин согласно настоящему изобретению, в клетки. Предпочтительно вектор транспортирует нуклеиновую кислоту в клетки со сниженным разрушением относительно степени разрушения, которая происходила бы при отсутствии вектора. Как правило, векторы, пригодные для настоящего изобретения, включают, но без ограничений, плазмиды, космиды, фагмиды, эпизомы, искусственные хромосомы, вирусы, другие переносчики, полученные из вирусных или бактериальных источников, которые были обработаны путем вставки или включения последовательностей нуклеиновой кислоты иммуноцитокина.

Плазмидные векторы являются предпочтительным типом вектора и были подробно описаны в данной области и хорошо известны специалистам в данной области. См., например, SANBROOK et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Неограничивающие примеры плазмид включают pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 и pBlueScript, а также другие плазмиды, хорошо известные специалистам в данной области. Кроме того, плазмиды могут быть разработаны в индивидуальном порядке с помощью ферментов рестрикции и реакций лigation для того, чтобы удалить и добавить специфические фрагменты ДНК.

Предпочтительно вектор нуклеиновой кислоты может включать селектируемые маркеры, которые активны как в бактериях, так и в клетках млекопитающих.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, полученной способами генетической инженерии с использованием нуклеиновой кислоты или с использованием вектора, описанного ранее.

Используемый в данном документе термин "клетка-хозяин, полученная способами генетической инженерии", относится к клеткам-хозяевам, которые были трансдуцированы, трансформированы или трансфицированы нуклеиновой кислотой или вектором, описанным ранее.

В качестве типичных примеров подходящих клеток-хозяев можно привести бактериальные клетки, такие как *E. coli*, клетки грибов, такие как дрожжи, клетки насекомых, такие как Sf9, животные клетки, такие как СНО или COS, растительные клетки и т.д. Считается, что выбор подходящего хозяина, находится в пределах компетенции специалистов в данной области исходя из идей, изложенных в данном документе.

Предпочтительно клеткой-хозяином, полученной способами генетической инженерии, является жи-

вотная клетка и наиболее предпочтительно клетка CHO-S (INVITROGEN, № по каталогу 11619-012).

Клетки яичников китайского хомячка (CHO) часто используются в биофармацевтической промышленности для получения биологических препаратов, таких как рекомбинантные белки, антитела, пептидные антитела и лиганды рецепторов. Одной из причин того, что клетки CHO часто используются, является то, что эти клетки хорошо зарекомендовали себя с точки зрения безопасности для получения биологических препаратов. Они считаются хорошо описанной линией клеток и, как следствие, требуемое испытание безопасности может быть менее тщательным в некоторых отношениях (например, ретровирусная безопасность), чем такое, которое требуется для других типов клеток. Несмотря на это, получение интерлейкина 15 является очень сложным, особенно в этой клетке.

Введение нуклеиновой кислоты или вектора, описанного ранее, в клетку-хозяин можно осуществлять с помощью способов, хорошо известных специалисту в данной области, таких как трансфекция с использованием фосфата кальция; трансфекция, опосредованная DEAE-декстраном, или электропорация.

Настоящее изобретение также относится к способу получения клетки-хозяина, полученной способами генетической инженерии, экспрессирующей иммуноцитокин в соответствии с настоящим изобретением, при этом упомянутый способ включает этапы: (i) введения *in vitro* или *ex vivo* нуклеиновой кислоты или вектора, как описано выше, в клетку-хозяин, (ii) культивирования *in vitro* или *ex vivo* рекомбинантной клетки-хозяина, полученной способами генетической инженерии, и (iii) необязательно отбора клеток, которые экспрессируют и/или секрецируют упомянутый иммуноцитокин. Такие рекомбинантные клетки-хозяева могут быть использованы для получения иммунокина согласно настоящему изобретению.

Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноцитокин согласно настоящему изобретению.

Дополнительная цель настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей иммуноцитокин, как описано выше, кодирующую его нуклеиновую кислоту или вектор, содержащий упомянутую нуклеиновую кислоту, впоследствии связанные с фармацевтически приемлемым носителем.

Выражение "фармацевтически приемлемый" относится к молекулярным частицам и композициям, которые являются физиологически переносимыми и обычно не вызывают аллергических или подобных нежелательных реакций, таких как расстройство желудка, головокружение и т.п.. при введении человеку. Предпочтительно используемое в данном документе выражение "фармацевтически приемлемый" означает разрешенный органом регулирования федерального правительства или правительства штата или указанный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных, и, в частности, у человека.

Термин "носитель" относится к растворителю, вспомагательному средству, вспомагательному веществу или переносчику, с которыми соединение вводят. Такими фармацевтическими носителями могут быть стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе таковые нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п.

Фармацевтическая композиция содержит "эффективное количество" иммуноцитокина согласно настоящему изобретению, эффективное количество которого достаточно, чтобы ингибировать рост раковых клеток, предпочтительно достаточно, чтобы индуцировать регрессию опухолевого роста. Дозы, используемые для введения, можно адаптировать в виде функции различных параметров, в частности, функции используемого режима введения, сопутствующей патологии или альтернативно желательной продолжительности лечения. Естественно, что форма фармацевтической композиции, путь введения, доза и режим, в норме зависят от состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания, возраста, веса и пола субъекта и т.д. Диапазоны эффективных доз, представленные ниже, не предполагают ограничивать настоящее изобретение и представляют предпочтительные диапазоны доз. Однако предпочтительная доза может быть адаптирована к отдельному субъекту, как понимается и определяется специалистом в данной области, без излишнего экспериментирования.

С точки зрения отмеченной эффективности иммуноцитокина согласно настоящему изобретению, специалист в данной области может планировать использовать очень малые дозы для лечения субъекта. В качестве неограничивающего примера иммуноцитокин согласно настоящему изобретению можно вводить с помощью инъекции в дозе, содержащей от 50 мг/кг до 5 мкг/кг субъекта, предпочтительно в дозе, содержащей от 10 мг/кг до 100 мкг/кг, и наиболее предпочтительно в дозе, содержащей от 2,5 мг/кг до 500 мкг/кг.

В качестве примера фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно разрабатывать в составах для местных, пероральных, интраназальных, внутриглазных, внутривенных, внутримышечных, внутриопухолевых или подкожных методов введения и т.п. Предпочтительно фармацевтическая композиция содержит переносчики, которые являются фармацевтически приемлемыми для состава, предназначенного для инъектирования. Они могут быть, в частности, изотоническими, стерильными, физиологическими растворами (мононатрийфосфат или динатрийфосфат, хлорид натрия, калия, кальция или магния и т.п. или смеси таких солей), или сухими, особенно лиофилизованными композициями, которые при добавлении, в зависимости от случая, стерильной воды или физиологического солевого раствора, обеспечивают состав инъектируемых растворов. Подходящие фармацевтические носители

описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" автора E.W. Martin.

Иммуноцитокин согласно настоящему изобретению, нуклеиновые кислоты, кодирующие его, или векторы нуклеиновых кислот, можно растворить в буфере или воде или включать в эмульсии, микро-эмульсии, гидрогели (например, гидрогели на основе триблочных сополимеров PLGA-PEG-PLGA), в микросферах, в наносферах, в микрочастицы, в наночастицы (например, сополимер молочной и гликоловой кислоты), микрочастицы (например, полимолочной кислоты (PLA); сополимер лактида и гликоловой кислоты (PLGA); полиглутаматные микросферах, наносферах, микрочастицы или наночастицы), в липосомы или другие галеновые составы. Во всех случаях составы должны быть стерильными и жидкими до степени приемлемой возможности введения с помощью шприца. Он должен быть стабильным в условиях производства и хранения и должен быть защищен от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы.

Растворы активных соединений в виде свободных оснований или фармацевтически приемлемых солей могут быть получены в воде, соответствующим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллулоза.

Также могут быть получены дисперсии в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях и в маслах. При обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант для предупреждения роста микроорганизмов.

Иммуноцитокины в соответствии с настоящим изобретением могут быть составлены в композиции в нейтральной форме или форме соли. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислоты (полученные с помощью свободных аминогрупп белка), которые образуются с участием неорганических кислот, таких как, например, соляная или фосфорная кислоты, или таких органических кислот, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и т.п. Соли, образованы с помощью свободных карбоксильных групп, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и т.п.

Носитель также может быть раствором или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и растительные масла. Иммуноцитокины согласно настоящему изобретению также могут быть модифицированы, например, пегилированием, таким образом, чтобы повысить их биодоступность. Если иммуноцитокин согласно настоящему изобретению имеет форму нуклеиновой кислоты, носителем также может быть вектор, такой как вирус (например, MVA, гAAV, лентивирус и т.п.).

Подходящая текучесть может поддерживаться, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, с помощью поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Предупреждение действия микроорганизмов может осуществляться с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях предпочтительным будет включение изотонических средств, например сахара или хлорида натрия.

Длительное всасывание инъецируемых композиций может осуществляться с помощью использования в композициях средств, задерживающих всасывание, например моностеарата алюминия, желатина, полиолов и повышающих период полужизни ковалентных и нековалентных составов.

Существуют многочисленные причины нестабильности или разрушения пептидов, в том числе гидролиз и денатурация. Гидрофобное взаимодействие может вызывать скопление молекул вместе (т.е. агрегацию). Можно добавлять стабилизаторы, чтобы уменьшить или предупредить такие проблемы.

Стабилизаторы включают циклодекстрин и его производные (см. патентный документ США № 5730969). Также можно добавлять подходящие консерванты, такие как сахароза, маннит, сорбит, трегалоза, декстран и глицерин, чтобы стабилизировать конечный состав. К составу можно добавлять стабилизатор, выбранный из ионных и неионных поверхностно-активных веществ, D-глюкозы, D-галактозы, D-ксилозы, D-галактуроновой кислоты, трегалозы, декстранов, гидроксиэтиловых крахмалов и их смесей. Добавление соли щелочных металлов, или хлорида магния может стабилизировать пептид. Пептид можно также стабилизировать путем его контактирования с сахаридом, выбранным из группы, включающей декстран, хондроитинсерную кислоту, крахмал, гликоген, декстрин и соли альгиновой кислоты. Другие сахара, которые могут быть добавлены, включают моносахариды, дисахариды, сахарные спирты и их смеси (например, глюкозу, маннозу, галактозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, маннит, ксилит). Полиолы могут стабилизировать пептид, а также являются смешивающимися с водой или водорасторимыми. Подходящими полиолами могут быть полигидроксиспирты, моносахариды и дисахариды, в том числе маннит, глицерин, этиленгликоль, пропиленгликоль, триметилгликоль, винилпирролидон, глюкоза, фруктоза, арабиноза, манноза, мальтоза, сахароза и их полимеры. Различные вспомогательные вещества также могут стабилизировать пептиды, в том числе, сывороточный альбумин, аминокислоты, гепарин, жирные кислоты и фосфолипиды, поверхностно-активные вещества, металлы, полиолы, восстанавливающие средства, металлохелатирующие средства, поливинилпирролидон, гидролизованный желатин и сульфат аммония.

Перспектива терапии цитокинами действительно исходит из выявления этих новых цитокинов, од-

нако, даже более фундаментально, эта область значительно выигрывает от непрерывно растущего количества доклинических данных, которые убедительно показывают синергические и/или новые биологические эффекты, которые могут быть достигнуты путем использования нескольких комбинаций цитокинов с дополняющими иммуностимулирующими свойствами. Потенциальные комбинации терапевтических активных средств с иммуноцитокинами на основе RLI включают, например, химиотерапевтические средства, антиангиогенные средства или иммуномодулирующие средства.

В предпочтительном варианте осуществления композиция согласно настоящему изобретению может содержать дополнительное терапевтическое активное средство, такое как химиотерапевтические средства, антиангиогенные средства или иммуномодулирующие средства.

Для химиотерапевтических средств было показано, что их терапевтические эффекты могут быть опосредованы частично непрямым влиянием на иммунные ответы, путем индукции иммуногенной клеточной гибели, уравновешивания иммуносупрессорного окружения, сокращения первичной крупной опухоли и затем облегчения иммунной атаки или путем индукции временной лимфопении с последующей гомеостатической лимфопролиферацией. Многие из них хорошо известны специалисту в данной области и в качестве примера химиотерапевтического средства, которое может быть объединено с иммуноцитокином согласно настоящему изобретению, можно привести флударабин, гемцитабин, капецитабин, метотрексат, таксол, таксотер, меркаптопурин, тиогуанин, гидроксимочевину, цитарабин, циклофосфамид, ифосфамид, нитрозомочевину, комплексы платины, такие как цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин, митомицин, дакарбазин, прокарбизин, этопозид, тенипозид, кампацины, блеомицин, доксорубицин, идарубицин, даунорубицин, дактиномицин, пликамицин, митоксантрон, L-аспарагиназу, доксорубицин, эпимицин, 5-фторурацил, таксаны, такие как доцетаксел и паклитаксел, лейковорин, левамизол, иринотекан, эстрамустин, этопозид, азотистые иприты, BCNU, нитрозомочевины, такие как кармустин и ломустин, алкалоиды барвинка, такие как винбластин, винクリстин и винорелбин, иматиниба мезилат, гексаметиленамин, топотекан, ингибиторы киназы, ингибиторы фосфатазы, ингибиторы АТФазы, тирфостини, ингибиторы протеазы, ингибиторы гербимицина А, генистейн, эрбстатин и лавендустин А.

Для антиангиогенных средств было показано, что они оказывали нецелевые эффекты на иммунную систему и затем могли облегчать опухолевые иммунные ответы. В качестве примера антиангиогенного средства, которое может быть объединено с иммуноцитокином согласно настоящему изобретению, можно привести лекарственные средства, направленные на рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) с помощью его тирозинкиназы, такие как сорафениб, сунитиниб и пазопаниб, или мишень ракамицина млекопитающих (mTOR), такую как темсиролимус и эверолимус.

В качестве иммуномодулирующих средств, которые могут быть объединены с иммуноцитокином настоящего изобретения, можно привести цитокины (IL-2, IL-7, IL-15, IL-12, IL18, IL-21, GM-CSF, G-CSF, IFN $\alpha$ , ...), хемокины/антиангиогенные цитокины (IP10, Mig, SDF-1, RANTES, ...), агонисты TLR и иммунорегуляторные антитела (антитело к CTLA4, антитело к PD1, антитело к TGF $\beta$ , агонист антитела к CD40, ...).

Терапевтические способы и варианты их использования.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, как описано ранее, для лечения рака у субъекта, предпочтительно фармацевтической композиции, содержащей иммуноцитокин, как описано ранее.

Используемый в данном документе термин "субъект" означает млекопитающего, такого как грызун, представитель кошачьих, представитель псовых или примат и наиболее предпочтительно человек.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к продуктам, содержащим:

(i) иммуноцитокин, как описано выше, последовательность кодирующей его нуклеиновой кислоты или вектор, содержащий такую последовательность нуклеиновой кислоты, и

(ii) терапевтическое средство, предпочтительно противоопухолевое средство,

в виде комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения для лечения рака у субъекта.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему этап введения указанному субъекту фармацевтической композиции, описанной ранее.

В последнем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака, включающему этап одновременного, раздельного или последовательного введения субъекту, испытывающему потребность в этом, терапевтически эффективного количества

(i) иммуноцитокина, описанного выше, последовательности кодирующей его нуклеиновой кислоты или вектора, содержащего такую последовательность нуклеиновой кислоты, и

(ii) терапевтического средства, предпочтительно противоопухолевого средства.

В контексте настоящего изобретения термин "лечение", используемый в данном документе, означает обращение, ослабление, ингибирование прогрессирования или предупреждение нарушения или состояния, к которому такой термин применяется, или одного или нескольких симптомов такого нарушения или состояния. Выражение "лечение рака", используемое в данном документе, означает ингибирование роста раковых клеток. Предпочтительно такое лечение также приводит к регрессии опухолевого рос-

та, т.е. снижению размера измеряемой опухоли. Наиболее предпочтительно такое лечение приводит к полной регрессии опухоли.

Предпочтительно упомянутый рак представляет собой карциному или рак легких.

Более предпочтительно выражение "лечение рака" означает "лечение рака путем активации проникающих в опухоль лимфоцитов".

Соответственно, рак соответствует предпочтительно васкуляризованному раку.

Более предпочтительно указанным раком является рак с анергической популяцией TIL, при этом упомянутый рак соответствует поздней стадии рака, такого как гипернефрома (RCC).

Далее настоящее изобретение описано более подробно со ссылкой на аминокислотные последовательности, последовательности нуклеиновых кислот и примеры. Однако подробности примеров не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Наоборот, настоящее изобретение относится к любому варианту осуществления, который предусматривает подробности, которые не упоминаются явным образом в примерах в данном документе, однако которые специалист в данной области находит без излишних усилий.

#### Примеры

##### 1) Модулокины на основе RLI.

Конструирование иммуноцитокинов антитело к PD-1 (hBAT) с RLI.

Экспрессионная плазмида, кодирующая легкую цепь антитела к PD-1 (соответствующая одному из СТ-011 (hBAT или hBAT-1)). Последовательности тяжелой цепи антитела химерного IgG разрабатывали таким образом, чтобы они сливались на 3'-конце с линкером из 22 аминокислот (SEQ ID NO: 16) или без него с IL15 (SEQ ID NO: 3, где аминокислотой в положении 93 является K). Эти нуклеотидные последовательности синтезировали и клонировали в плазмidaх pcDNA3.1 с помощью GENEART. Полные последовательности легкой и тяжелой цепей антитела к PD-1 раскрыты в международной заявке на патент WO 2009/101611.

Получение плазмидной ДНК и реагента для трансфекции.

Линейный PEI из 40 кДа получали от POLYSCIENCE. 1 мг/мл маточного раствора получали растворением PEI в воде с нагреванием, нейтрализацией NaOH и стерилизацией с помощью фильтрации через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Маточный раствор разделяли на аликовты и хранили при -20°C.

Плазмидную ДНК для трансфекции очищали с помощью наборов для очистки плазмид в соответствии с протоколом производителя (MACHEREY-NAGEL) и стерилизовали с помощью фильтрации через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Получение и очистка иммуноцитокинов.

##### 1. Транзиентная трансфекция в супензии.

Поддерживаемые в стандартных условиях клетки CHO-S (INVITROGEN) высевали с плотностью  $1 \times 10^6$  клеток/мл в среду PowerCHO2 (LONZA) и культивировали в течение ночи при 37°C во встряхивателе-инкубаторе (100 об/мин) с 5% CO<sub>2</sub>. Для трансфекции клетки затем разводили до  $2 \times 10^6$  клеток/мл в среде CD-CHO (INVITROGEN). Трансфекционные комплексы получали в 10% объема культуры с использованием 150 мМ NaCl. ДНК экспрессионных конструкций (2,5 мг/л объема культуры, с использованием соотношения 1:2 плазмид, кодирующих тяжелую цепь, к плазмидам, кодирующими легкую цепь) смешивали с PEI, разведенным в NaCl (10 мг/л конечного объема культуры), и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре перед добавлением в культуру. Клетки культивировали во встряхивателе-инкубаторе (130 об/мин) при 37°C в течение 5 ч перед удвоением объема культуры с использованием среды PowerCHO2. Супернатант собирали через 5 дней после трансфекции.

##### 2. Стабильная трансфекция на адгезивных клетках.

Клетки CHO-K1 (ATCC № CCL-61) выращивали в DMEM с добавлением 1-глутамина, 10% FCS и пенициллина (100 ед./мл)/стрептомицина (100 мкг/мл) и трансфицировали каждым вектором с помощью реагента липофектамина 2000 (INVITROGEN), как рекомендуется производителем. Клоны селектировали с помощью предельного разведения средой, содержащей генетицин и гигромицин (0,5 мг/мл), или бластицин и гигромицин (5 мкг/мл и 100 мкг/мл) для ацетилированного ICK к GD2O и ICK к CD20 соответственно. Супернатант культуры каждого клона количественно определяли в отношении продуцирования бифункциональных белков с помощью ELISA. Для продукции ICK выбранные клоны амплифицировали в 25% среде DMEM и 75% среде AIM (INVITROGEN). Клетки затем поддерживали в 100% AIM и супернатант собирали и замещали каждые 2 дня в течение 10 дней.

##### 3. Очистка супернатанта.

Собранный супернатант центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 мин при 4°C, доводили до равновесия при pH 7,8 с помощью NaOH и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Кондиционированные среды очищали с помощью аффинной хроматографии с использованием колонки на основе белка A (GE) в соответствии с инструкциями производителя. Очищенные белки концентрировали с помощью 50 кДа единиц AMICON (MILLIPORE). Во время этого этапа элюирующий буфер замещали PBS. Очищенные белки окончательно количественно определяли с помощью ELISA и измерения поглощения при 280 нм. Чистоту оценивали с помощью электрофореза.

#### 4. Выявление компонента иммуноглобулина с помощью ELISA.

Плоскодонный микротитрационный планшет Maxisorp (NUNC) покрывали 100 мкл антитела козы к антителу человека (UP892370, INTERCHIM), разведенного в PBS до 1,5 мкг/мл в течение 1 ч при 4°C. Затем планшет блокировали 200 мкл блокирующего буфера (1% BSA+0,1% TWEEN 20 в PBS) в течение 1 ч при 37°C. Затем планшет промывали 3 раза отмывочным буфером (0,1% TWEEN 20 в PBS) и образец, разведенный в блокирующем буфере, добавляли и инкубировали в течение 30 мин при 37°C (100 мкл). После 3-го отмывания добавляли конъюгированное с пероксидазой антитело к IgG1 человека (109-036-003, JACKSON), разведенное 1:10000, и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Субстрат TMB (INTERCHIM) использовали для определения уровня белка и планшеты считывали при 450 нм. Очищенный ритуксимаб (ROCHE) использовали для получения стандартной кривой на планшете.

#### 5. Выявление компонента цитокина с помощью ELISA.

Плоскодонный микротитрационный планшет Maxisorp (NUNC) покрывали 100 мкл B-E29 к IL15 (DIACLONE), разведенного в карбонатном буфере до 2 мкг/мл в течение 16 ч при 4°C. Затем планшет блокировали 200 мкл блокирующего буфера (1% BSA в PBS) в течение 1 ч при 37°C. Затем планшет промывали 3 раза отмывочным буфером (0,05% Tween 20 в PBS). Образец, разведенный в TBS+0,05% BSA, добавляли и инкубировали 1 ч 30 мин при 37°C (100 мкл). После 3-го отмывания добавляли биотинилированное антитело BAM 247 к IL15 (R&D SYSTEM), разведенное до 200 нг/мл, и инкубировали в течение 1 ч 30 мин при 37°C. Планшет промывали 3 раза и добавляли конъюгированной пероксидазой стрептавидин при разведении 1:1000. Субстрат TMB (INTERCHIM) использовали для определения уровня белка и планшеты считывали при 450 нм. IL-15 (PEPROTECH) использовали для получения стандартной кривой на планшете.

#### Фенотипы TIL.

Проникающие в опухоль лимфоциты (TIL) получали из биоптатов или нефрэктомических тканей, полученных от 2 пациентов с гипернефромой после расщепления ДНКазой и коллагеназой. Эти TIL были большей частью анергическими, способствуя опухолевой прогрессии.

Фенотип этих TIL в отношении PD-1, Tim-3 и IL-15R $\alpha$  определяли с помощью иммунофлуоресценции.

На фиг. 1 показан полученный фенотип для пациента А (фиг. 1A) и для пациента В (фиг. 1B).

#### Связывающая активность иммуноцитокинов.

Специфическое связывание модулокина RLI к PD-1 оценивали с помощью проточной цитометрии. Способность модулокина связываться с рецептором IL-15 на эффекторных клетках тестирували на наборе Kit 225. Модулокин, покрывающий целевые клетки, выявляли с помощью PE-конъюгированного mAb козы к IgG человека (PN IM0550, BECKMAN COULTER) или с помощью биотинилированного антитела мыши к IL15 (BAM247, R&D SYSTEM), сопряженного с PE-стрептавидином (SIGMA-ALDRICH). Целевые клетки ( $1 \times 10^5$ ) инкубировали с каждым ICK в течение 1 ч при 4°C, отмывали и затем инкубировали с PE-конъюгатом в течение 1 ч при 4°C. Отмытые клетки в конечном итоге анализировали на FACSCALIBUR (BECTON DICKINSON).

Результаты показали, что модулокин связывается с рецептором IL-15, а также с PD-1.

#### Пролиферационная активность иммуноцитокинов.

Опосредованную интерлейкином-15 пролиферационную активность полученного модулокина тестирували и сравнивали с RLI. Пролиферативные ответы клеток набора Kit 225 и 32D $\beta$  на ICK измеряли по включению тимидина [ $^3$ H]. Клетки поддерживали в среде для культивирования в течение 3 дней, дважды промывали и истощали в среде без цитокина в течение 24 ч или 4 ч для набора 225 и 32D $\beta$  соответственно. Затем их высевали в многолучевые планшеты при 10 клетках/лунку в 100 мкл и культивировали в течение 48 ч в среде с добавлением возрастающей концентрации образца. rIL-15 и RLI человека использовали в качестве калибровочного стандарта. Клетки сенсибилизировали в течение 16 ч с использованием 0,5 мКи/лунку [ $^3$ H] тимидина, собирали на фильтры из стекловолокна и измеряли связанную с клетками радиоактивность. Результаты подтвердили, что пролиферационная активность модулокина была сопоставимой с одним из RLI.

#### Мощная реактивация TIL модулокином RLI.

Проникающие в опухоль лимфоциты (TIL) получали из биоптатов или нефрэктомических тканей, полученных от 25 пациентов с гипернефромой после расщепления ДНКазой и коллагеназой. Эти TIL были большей частью анергическими, способствуя опухолевой прогрессии.

Реактивацию TIL от 25 пациентов тестирували с помощью инкубации упомянутых TIL при отсутствие и при присутствии одинаковой молярности RLI, HBAT (CT011 = антитело к PD1), HBAT-RLI (модулокин) или комбинации HBAT и RLI каждого пациента. RLI использовали при 1 г/мл для пациентов 1-8 и затем при 300 нг/мл для пациентов 9-25.

Супернатанты собирали через 48 ч после стимуляции и реактивацию определяли измерением с помощью ELISA концентрации IFN $\gamma$  в супернатанте.

Первичные данные из 25 TIL, полученных от пациентов с гипернефромой, представлены в таблице, за исключением нестимулированных TIL, которые всегда секретировали менее 20 пг/мл IFN $\gamma$ .

## Комбинирование

Пациент	пг/мл IFN $\gamma$ .			
	RLI	HBAT	HBAT-	HBAT+RLI
1	44	0	<b>107</b>	н.о.
2	26	0	<b>338</b>	н.о.
3	36	28	<b>200</b>	377
4	15	92	<b>228</b>	1500
5	29	н.о	<b>770</b>	2900
6	57	80	<b>970</b>	700
7	0	0	0	0
8	15	15	32	25
9	32	17	<b>157</b>	360
10	24	0	<b>635</b>	245
11	26	32	<b>200</b>	1490
12	31	22	<b>110</b>	360
13	17	16	<b>360</b>	1800
14	0	9	50	0
15	84	27	<b>250</b>	1000
16	15	73	0	50
17	0	0	0	0
18	12	55	<b>800</b>	230
19	17	0	<b>450</b>	0
20	0	33	<b>330</b>	0
21	80	0	<b>395</b>	0
22	12	65	<b>150</b>	1000
23	0	0	0	0
24	30	65	<b>250</b>	540
25	39	н.о	<b>360</b>	н.о.

На фиг. 2 представлены среднее значение и медиана IFN $\gamma$ , продуцируемого из TIL, активированных RLI, HBAT, HBAT-RLI и HBAT+RLI (\* $p < 0,05$ ).

Результаты показывают, что практически никакой активации TIL не было получено только при отдельном использовании антитела к PD-1. Некоторая активация TIL была получена при отдельном использовании RLI или в комбинации с антителом к PD1. В данный момент и неожиданным образом выраженная и общая активация по сравнению с RLI и также RLI+HBAT была получена при использовании иммуноцитокина согласно настоящему изобретению (таблица и фиг. 2).

Эти результаты позволяют рассмотреть новые виды терапии.

Определение эффективности модулокина в экспериментальной опухолевой модели карциномы СТ26.

СТ26 представляет собой линию клеток индуцированной н-нитрозо-е-метилуретаном (NNMU) не-дифференцированной карциномы кишечника мыши.

Мышам BALB/C инъецировали подкожно на правом боку опухолевые клетки СТ26 ( $2,10^5$ /мышь).

На 9-й день, когда опухоль должна достигать 20-30 мм, различные группы мышей обрабатывали 16 или 32 мкг/мышь модулокина RLI к PD1 отдельно в сравнении с эквимолярными концентрациями антитела к PD1 отдельно, RLI отдельно (1004-14p), комбинации антитела к PD1 и RLI или PBS в контрольной группе.

Модулокин или RLI отдельно инъецировали с 9-го дня дважды в неделю в течение 4 недель. Анти-тело к PD1 отдельно инъецировали с 9-го дня и затем один раз в неделю в течение 4 недель. В группе с комбинированием антитело к PD1 инъецировали с 9-го дня и затем один раз в неделю в течение 4 недель, а RLI с 15-го дня и затем дважды в неделю в течение 3 недель. Опухоли измеряли три раза в неделю с помощью штангенциркуля и площадь опухоли рассчитывают следующим образом: длинахширина. Мышей выводили из эксперимента, когда размер опухоли достигал 300  $\text{мм}^2$  или при изъязвлении. Определяли первичный опухолевый рост, выживание и в конечном итоге регрессию. Контрольные группы получали соответствующую дозу изотипа антитела или несвязанного коньюгата aRLI-антитело (RLI к HER2).

Мышам BALB/C инъецировали подкожно на правом боку опухолевые клетки CT26 ( $2,10^5$ /мышь). На 9-й день, когда опухоли достигали 20-30  $\text{мм}^2$ , мышей обрабатывали i.p. 16 или 32 мкг/мышь модулокина RLI к PD-L1 отдельно в сравнении с эквимолярными концентрациями антитела к PD-L1 (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL) отдельно, RLI отдельно (1004-14p), комбинации антитела к PD-L1 (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL) и RLI или PBS в контрольной группе.

Модулокин или RLI отдельно инъецировали с 9-го дня дважды в неделю в течение 4 недель. Анти-тело к PD1 отдельно инъецировали с 9-го дня и затем один раз в неделю в течение 4 недель. В группе с комбинированием антитело к PD1 инъецировали с 9-го дня и затем один раз в неделю в течение 4 недель, а RLI с 15-го дня и затем дважды в неделю в течение 3 недель. Опухоли измеряли три раза в неделю с помощью штангенциркуля и площадь опухоли рассчитывают следующим образом: длинахширина. Мышей выводили из эксперимента, когда размер опухоли достигал 300  $\text{мм}^2$  или при изъязвлении. Определяли первичный опухолевый рост, выживание и в конечном итоге регрессию. Контрольные группы получали соответствующую дозу изотипа антитела или несвязанного коньюгата aRLI-антитело (RLI к HER2).

Определение эффективности модулокина в экспериментальной опухолевой модели рака легких tc-1.

Линию опухолевых клеток TC-1 получали из первичных эпителиальных клеток легких мышей C57B1/6. Клетки иммортализовали амфотропным ретровирусным вектором lxsn16beb7 и затем трансформировали плазмидой pvejb, экспрессирующей активированный онкоген человека c-ha-ras. Клетки являются положительными в отношении экспрессии HPV-16 E7.

Мышам C57B1/6 инъецировали подкожно на правом боку опухолевые клетки TC-1 ( $1,10 \times 10^6$ /мышь). На 9-й день, когда опухоль достигала 20-50  $\text{мм}^2$ , различные группы мышей обрабатывали 16 или 32 мкг/мышь модулокина RLI к PD1 отдельно в сравнении с эквимолярными концентрациями антитела к PD1 отдельно, RLI отдельно (1004-14p), комбинации антитела к PD1 и RLI или PBS в контрольной группе. Модулокин или RLI отдельно инъецировали с 9-го дня дважды в неделю в течение 4 недель. Анти-тело к PD1 отдельно инъецировали с 9-го дня и затем один раз в неделю в течение 4 недель. В группе с комбинированием антитело к PD1 инъецировали с 9-го дня и затем один раз в неделю в течение 4 недель, а RLI с 15-го дня и затем дважды в неделю в течение 3 недель. Опухоли измеряли три раза в неделю с помощью штангенциркуля и площадь опухоли рассчитывают следующим образом: длинахширина. Мышей выводили из эксперимента, когда размер опухоли достигал 300  $\text{мм}^2$  или при изъязвлении. Определяли первичный опухолевый рост, выживание и в конечном итоге регрессию.

Определение эффективности модулокина в экспериментальной опухолевой модели метастатической меланомы B16F10.

Опухоли B16F10 имплантировали инъекцией  $3 \times 10^4$  клеток B16F10 в бок мышей C57BL/6, i.d. на 0-й день. После внедрения опухолевых клеток лечение начинали на 4-й день. Модулокин RLI к PD-L1 инъецировали i.p. при дозе 16 или 32 мкг/мышь в сравнении с эквимолярными концентрациями антитела к PD-L1 отдельно (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL), RLI отдельно (1004-14p), комбинации антитела к PD-L1 ((клон 10 F.9G2, BIO-XCELL)) и RLI или PBS в контрольной группе.

Модулокин, mAb к PD-L1, RLI или комбинацию mAb к PD-L1 + RLI инъецировали с 4-го дня дважды в неделю в течение 4 недель. Опухоли измеряли три раза в неделю с помощью штангенциркуля и площадь опухоли рассчитывают следующим образом: длинахширина. Мышей выводили из эксперимента, когда размер опухоли достигал 300  $\text{мм}^2$  или при изъязвлении. Определяли первичный опухолевый рост, выживание и в конечном итоге регрессию. Контрольные группы получали соответствующую дозу изотипа антитела или несвязанного коньюгата aRLI-антитело (RLI к HER2).

Определение эффективности модулокина в экспериментальной опухолевой модели рака мочевого пузыря MB49 поздней стадии.

Линия опухолевых клеток MB49 происходит из индуцированной канцерогенами опухоли мочевого пузыря эпителиального происхождения от самцов мышей C57BL/6. 10 клеток опухоли мочевого пузыря MB49 инъецировали s.c. в верхнюю часть дермы на спине мышей C57BL/6. Лечение начинали на 6-й день после инокуляции опухоли, который соответствует моменту, когда опухоли становятся четко визуализируемыми и пальпируемыми с размером  $\approx 15 \text{ mm}^2$ . Модулокины RLI к PD-1 и к PD-L1 инъецировали i.p. в дозе 16 или 32 мкг/мышь в сравнении с эквимолярными концентрациями антитела к PD1 отдельно, антитела к PD-L1 отдельно (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL), RLI отдельно (1004-14p), комбинации антитела к PD1 или антитела к PD-L1 (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL) с RLI или PBS в контрольной группе.

Модулокины, mAb к PD-1, mAb к PD-L1 (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL), RLI и комбинацию mAb к

PD-1 или к PD-L1 (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL) + RLI инъецировали с 6-го дня дважды в неделю в течение 4 недель. Опухоли измеряли три раза в неделю с помощью штангенциркуля и площадь опухоли рассчитывали следующим образом: длина×ширина. Мышей выводили из эксперимента, когда размер опухоли достигал 300  $\text{мм}^2$  или при изъязвлении. Определяли первичный опухолевый рост, выживание и в конечном итоге регрессию. Контрольные группы получали соответствующую дозу изотипа антитела или несвязанного конъюгата aRLI-антитело (RLI к HER2).

Определение эффективности модулокина в экспериментальной опухолевой модели рака молочной железы 4T1.

Мышей BALB/c инокулировали  $5 \times 10^4$  клетками рака молочной железы 4T1 в молочную железу на 0-й день. Лечение начинали на 10-й день после инокуляции опухоли, который соответствует моменту, когда опухоли становятся четко визуализируемыми и пальпируемыми с размером  $\approx 15-20 \text{ мм}^2$ . Модулокины RLI к PD-1 и к PD-L1 инъецировали i.p. в дозе 16 или 32 мкг/мышь в сравнении с эквимолярными концентрациями антитела к PD1 отдельно, антитела к PD-L1 отдельно (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL), RLI отдельно (1004-14p), комбинации антитела к PD1 или антитела к PD-L1 (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL) с RLI или PBS в контрольной группе.

Модулокины, mAb к PD-1, mAb к PD-L1 (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL), RLI и комбинацию mAb к PD-1 или к PD-L1 (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL) + RLI инъецировали с 10-го дня дважды в неделю в течение 4 недель. Контрольные группы получали соответствующую дозу изотипа антитела или несвязанного конъюгата aRLI-антитело (RLI к HER2). Опухоли измеряли три раза в неделю с помощью штангенциркуля и площадь опухоли рассчитывали следующим образом: длина×ширина. Мышей выводили из эксперимента на 27-й день. Метастатические узелки в легких подсчитывали под бинокулярным микроскопом.

Определение эффективности модулокина в экспериментальной опухолевой модели рака яичника ID8.

Линию клеток карциномы яичника ID8-VEGF предварительно получали из линии клеток эпителиальной папиллярной серозной аденокарциномы яичника мышей. Мышам C57BL/6 подкожно на правом боку имплантировали  $5 \times 10^6$  опухолевых клеток ID8. Лечение начинали на 10-й день после инокуляции опухоли, который соответствует моменту, когда опухоли становятся четко визуализируемыми и пальпируемыми с размером  $\approx 15-20 \text{ мм}^2$ . Модулокины RLI к PD-1 и к PD-L1 инъецировали i.p. в дозе 16 или 32 мкг/мышь в сравнении с эквимолярными концентрациями антитела к PD1 отдельно, антитела к PD-L1 отдельно (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL), RLI отдельно (1004-14p), комбинации антитела к PD1 или антитела к PD-L1 (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL) с RLI или PBS в контрольной группе.

Модулокины, mAb к PD-1, mAb к PD-L1 (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL), RLI и комбинацию mAb к PD-1 или к PD-L1 (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL) + RLI инъецировали с 10-го дня дважды в неделю в течение 4 недель. Контрольные группы получали соответствующую дозу изотипа антитела или несвязанного конъюгата aRLI-антитело (RLI к HER2). Опухоли измеряли три раза в неделю с помощью штангенциркуля и площадь опухоли рассчитывали следующим образом: длина×ширина. Мышей выводили из эксперимента, когда размер опухоли достигал 300  $\text{мм}^2$  или при изъязвлении.

Определение эффективности модулокина в экспериментальной опухолевой модели рака предстательной железы RM-1.

Самок мышей C57BL/6 инокулировали s.c.  $2 \times 10^5$  клетками рака предстательной железы мышей RM-1. Лечение начинали на 3-й день после инокуляции опухоли, который соответствует моменту, когда опухоли становятся четко визуализируемыми и пальпируемыми с размером  $\approx 15-20 \text{ мм}^2$ . Модулокины RLI к PD-1 и к PD-L1 инъецировали i.p. в дозе 16 или 32 мкг/мышь в сравнении с эквимолярными концентрациями антитела к PD1 отдельно, антитела к PD-L1 отдельно (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL), RLI отдельно (1004-14p), комбинации антитела к PD1 или антитела к PD-L1 (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL) с RLI или PBS в контрольной группе.

Модулокины, mAb к PD-1, mAb к PD-L1 (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL), RLI и комбинацию mAb к PD-1 или к PD-L1 (клон 10 F.9G2, BIO-XCELL) + RLI инъецировали с 3-го дня дважды в неделю в течение 4 недель. Контрольные группы получали соответствующую дозу изотипа антитела или несвязанного конъюгата aRLI-антитело (RLI к HER2). Опухоли измеряли три раза в неделю с помощью штангенциркуля и площадь опухоли рассчитывали следующим образом: длина×ширина. Мышей выводили из эксперимента, когда размер опухоли достигал 300  $\text{мм}^2$  или при изъязвлении.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> СИТЮН

Университе Пари Декарт

Эй-Пи-Эйч-Пи

БЕШАР, Давид

ТАРТУР, Эрик

ЖЕИ, Ален

<120> МОДУЛОКИНЫ НА ОСНОВЕ ДОМЕНА SUSHI IL-15 И IL-15Ra  
 <130> СЫТ-В-0005-РСТ1  
 <150> 13003963.9  
 <151> 2013-08-08  
 <160> 19  
 <170> PatentIn версии 3.5  
 <210> 1  
 <211> 114  
 <212> БЕЛОК  
 <213> искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> консенсусная последовательность интерлейкина 15 млекопитающего  
 <220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X= N, S, T или I  
 <220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X= V, H, I, Q или E  
 <220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (4)..(4)  
 <223> X= N, Y, F или D  
 <220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (6)..(6)  
 <223> X= I или R  
 <220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (7)..(7)  
 <223> X= S, N, L, Y, K или R  
 <220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (10)..(10)  
 <223> X= K, E, R или Q  
 <220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (11)..(11)  
 <223> X= K, T или R  
 <220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (13)..(13)  
 <223> X= E, D или Q  
 <220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (14)..(14)

<223> X= D, H, S или N

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (16)..(16)  
 <223> X= I или T

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (17)..(17)  
 <223> X=Q, R или K

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (18)..(18)  
 <223> X= S или F

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (19)..(19)  
 <223> X= M, I или L

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (21)..(21)  
 <223> X= I, V или M

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (23)..(23)  
 <223> X=A или T

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (28)..(28)  
 <223> X=E или D

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (30)..(30)  
 <223> X= D или G

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (31)..(31)  
 <223> X= V, F, A или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (34)..(34)  
 <223> X= S, N или R

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (37)..(37)  
 <223> X= V или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (39)..(39)  
 <223> X= A или T

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (41)..(41)  
 <223> X= K, Q или N

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (48)..(48)  
 <223> X= Q, G, R, H или E

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (51)..(51)  
 <223> X= S или L

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (52)..(52)  
 <223> X= L, Q или H

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (54)..(54)  
 <223> X= S, F или Y

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (55)..(55)  
 <223> X= G, K, S, N или R

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (56)..(56)  
 <223> X= D, H, S или N

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (57)..(57)  
 <223> X= A, H, M, E, G, S или T

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (58)..(58)  
 <223> X= S, V, P, T, N или D

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (59)..(59)  
 <223> X= I или L

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (60)..(60)  
 <223> X= H, S, K, N, Y или E

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (61)..(61)  
 <223> X= D или E

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (62)..(62)  
 <223> X= T, I или A

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (63)..(63)  
 <223> X= V или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (64)..(64)  
 <223> X= E, T, Q, R или K

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (66)..(66)  
 <223> X= L или V

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (67)..(67)  
 <223> X= I, T или L

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (68)..(68)  
 <223> X= I, M, F, Y или L

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (72)..(72)  
 <223> X= N, T, R, D или S

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (73)..(73)  
 <223> X= S, N, R, T или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (75)..(75)  
 <223> X= S или N

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (76)..(76)  
 <223> X= S или A

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (77)..(77)  
 <223> X= N, I или K

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (78)..(78)  
 <223> X= G, E или K

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (79)..(79)  
 <223> X= N, Y, D или T

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (80)..(80)  
 <223> X= V, K или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (81)..(81)  
 <223> X= T, A или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (83)..(83)  
 <223> X= S, L или T

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (87)..(87)  
 <223> X= E или V

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (93)..(93)  
 <223> X= E или K

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (94)..(94)  
 <223> X= K или R

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (95)..(95)  
 <223> X= N, T или S

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (96)..(96)  
 <223> X= I или F

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (97)..(97)  
 <223> X= K, N, A, или T

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (101)..(101)  
 <223> X= Q, K или E

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (104)..(104)  
 <223> X= V, I или K

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (105)..(105)  
 <223> X= H или R

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (112)..(112)  
 <223> X= N или Y

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (113)..(113)  
 <223> X= = T, S, P, L или A

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (114)..(114)  
 <223> X= = S или P

<400> 1

Xaa Trp Xaa Xaa Val Xaa Xaa Asp Leu Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Leu Xaa  
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa His Xaa Asp Xaa Thr Leu Tyr Thr Xaa Ser Xaa Xaa His  
 20 25 30

Pro Xaa Cys Lys Xaa Thr Xaa Met Xaa Cys Phe Leu Leu Glu Leu Xaa  
 35 40 45

Val Ile Xaa Xaa Glu Xaa  
 50 55 60

Asn Xaa Xaa Xaa Leu Ala Asn Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 65 70 75 80

Xaa Glu Xaa Gly Cys Lys Xaa Cys Glu Glu Leu Glu Xaa Xaa Xaa Xaa  
 85 90 95

Xaa Glu Phe Leu Xaa Ser Phe Xaa Xaa Ile Val Gln Met Phe Ile Xaa  
 100 105 110

Xaa Xaa

<210> 2  
 <211> 114  
 <212> БЕЛОК  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> консенсусная последовательность интерлейкина 15 примата

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X = N или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (4)..(4)  
 <223> X = N или D

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (10)..(10)  
 <223> X = К или R

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (11)..(11)  
 <223> X = К или R

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (13)..(13)  
 <223> X = Е или Q

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (16)..(16)  
 <223> X = I или T

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (19)..(19)  
 <223> X = M или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (30)..(30)  
 <223> X = D или G

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (31)..(31)  
 <223> X = V или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (34)..(34)  
 <223> X = S или R

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (52)..(52)  
 <223> X = L или H

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (55)..(55)  
 <223> X = G или N

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (56)..(56)  
 <223> X = D или N

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (57)..(57)  
 <223> X = A или T

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (58)..(58)

<223> X = S, N или D

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (60)..(60)

<223> X = H или N

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (63)..(63)

<223> X = V или I

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (67)..(67)

<223> X = I или L

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (72)..(72)

<223> X = N или R

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (73)..(73)

<223> X = S или I

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (76)..(76)

<223> X = S или A

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (79)..(79)

<223> X = N или T

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (80)..(80)

<223> X = V или I

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (93)..(93)

<223> X = E или K

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (112)..(112)

<223> X = N или Y

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (113)..(113)

<223> X = T или A

<400> 2

Xaa Trp Val Xaa Val Ile Ser Asp Leu Xaa Xaa Ile Xaa Asp Leu Xaa  
 1 5 10 15

Gln Ser Xaa His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Xaa Xaa His  
20 25 30

Pro Xaa Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln  
35 40 45

Val Ile Ser Xaa Glu Ser Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Asp Thr Xaa Glu  
50 55 60

Asn Leu Xaa Ile Leu Ala Asn Xaa Xaa Leu Ser Xaa Asn Gly Xaa Xaa  
65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Xaa Lys Asn Ile  
85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Xaa  
100 105 110

Xaa Ser

<210> 3  
<211> 114  
<212> БЕЛОК  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (93)..(93)  
<223> X= E или K  
  
<400> 3

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile  
1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His  
20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln  
35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu  
50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val  
65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Xaa Lys Asn Ile  
85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn  
 100 105 110

Thr Ser

<210> 4  
 <211> 61  
 <212> БЕЛОК  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> консенсусная последовательность домена sushi млекопитающего

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X= P или A

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (5)..(5)  
 <223> X= M или V

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (7)..(7)  
 <223> X= V или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (13)..(13)  
 <223> X= W, R или Q

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (16)..(16)  
 <223> X= S или N

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (19)..(19)  
 <223> X= L или V

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (20)..(20)  
 <223> X= Y, H или N

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (26)..(26)  
 <223> X= I или V

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (39)..(39)  
 <223> X= S или T

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (41)..(41)  
 <223> X=T или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (45)..(45)  
 <223> X=T или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (45)..(45)  
 <223> X=L или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (48)..(48)  
 <223> X=A или N

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (51)..(51)  
 <223> X=V или A

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (53)..(53)  
 <223> X=H или Y

<400> 4

Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val Lys Xaa  
 1 5 10 15

Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly Phe Lys  
 20 25 30

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn Lys Xaa  
 35 40 45

Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys  
 50 55 60

<210> 5  
 <211> 64  
 <212> БЕЛОК  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> увеличенная консенсусная последовательность домена sushi млекопитающего

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X= T, V или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (5)..(5)  
 <223> X= Р или А

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (7)..(7)  
 <223> X= М или В

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (9)..(9)  
 <223> X= В или И

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (15)..(15)  
 <223> X= W, R или Q

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (18)..(18)  
 <223> X= S или N

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (21)..(21)  
 <223> X=L или V

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (22)..(22)  
 <223> X=Y, Н или N

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (28)..(28)  
 <223> X= I или V

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (41)..(41)  
 <223> X= S или T

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (43)..(43)  
 <223> X= Т или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (47)..(47)  
 <223> X= L или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (50)..(50)  
 <223> X= А или N

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (53)..(53)  
 <223> X= V или A

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (55)..(55)  
 <223> X= H или Y

<400> 5

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val  
 1 5 10 15

Lys Xaa Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly  
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn  
 35 40 45

Lys Xaa Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile  
 50 55 60

<210> 6  
 <211> 61  
 <212> БЕЛОК  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> консенсусная последовательность домена sushi примата

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X= P или A

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (5)..(5)  
 <223> X= M или V

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (13)..(13)  
 <223> X= W, R или Q

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (20)..(20)  
 <223> X= Y или H

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (26)..(26)  
 <223> X= I или V

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (51)..(51)

<223> X= V или A

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (53)..(53)

<223> X= V или A

<400> 6

Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val Lys Ser  
 1 5 10 15

Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly Phe Lys  
 20 25 30

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala  
 35 40 45

Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys  
 50 55 60

<210> 7

<211> 63

<212> БЕЛОК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> увеличенная консенсусная последовательность домена sushi примата

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (1)..(1)

<223> X= V или I

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (5)..(5)

<223> X= P или A

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (7)..(7)

<223> X= M или V

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (15)..(15)

<223> X= W, R или Q

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (22)..(22)

<223> X= Y или H

<220>

<221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (28)..(28)

<223> X= I или V

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (53)..(53)  
 <223> X=V или A

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (55)..(55)  
 <223> X=H или Y

<400> 7

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val  
 1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly  
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn  
 35 40 45

Lys Ala Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys  
 50 55 60

<210> 8  
 <211> 61  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser  
 1 5 10 15

Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys  
 20 25 30

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala  
 35 40 45

Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys  
 50 55 60

<210> 9  
 <211> 64  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val  
 1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly  
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn  
 35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile  
 50 55 60

<210> 10  
 <211> 77  
 <212> БЕЛОК  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> sushi млекопитающего и консенсусная последовательность домена

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X= T, V или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (5)..(5)  
 <223> X= P или A

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (7)..(7)  
 <223> X= M или V

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (9)..(9)  
 <223> X= V или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (15)..(15)  
 <223> X= W, R или Q

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (18)..(18)  
 <223> X= S или N

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (21)..(21)  
 <223> X= L или V

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (22)..(22)  
 <223> X= Y, H или N

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (28)..(28)  
 <223> X= I или V

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (41)..(41)  
 <223> X= S или T

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (43)..(43)  
 <223> X= T или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (47)..(47)  
 <223> X= L или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (50)..(50)  
 <223> X=A или N

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (53)..(53)  
 <223> X= V или A

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (55)..(55)  
 <223> X= H или Y

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (55)..(55)  
 <223> X= H или Y

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (68)..(68)  
 <223> X=A, S или L

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (70)..(70)  
 <223> X= V, A, S или T

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (71)..(71)  
 <223> X= H или R

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (72)..(72)  
 <223> X= Q или H

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (73)..(73)  
 <223> X= R, S или K

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (75)..(75)  
 <223> X= A, V или P

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (76)..(76)  
 <223> X= P или S

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (77)..(77)  
 <223> X= P или T

<400> 10

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val  
 1 5 10 15

Lys Xaa Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly  
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn  
 35 40 45

Lys Xaa Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile  
 50 55 60

Arg Asp Pro Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa  
 65 70 75

<210> 11  
 <211> 77  
 <212> БЕЛОК  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> sushi примата и консенсусная последовательность домена

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X= V или I

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (5)..(5)  
 <223> X= P или A

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (7)..(7)  
 <223> X= M или V

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК

<222> (15)..(15)  
 <223> X= W, R или Q

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (22)..(22)  
 <223> X= Y или H

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (28)..(28)  
 <223> X= I или V

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (53)..(53)  
 <223> X= V или A

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (55)..(55)  
 <223> X= H или Y

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (68)..(68)  
 <223> X= A, S или L

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (70)..(70)  
 <223> X= V, A или T

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (71)..(71)  
 <223> X= H или R

<220>  
 <221> ДРУГОЙ\_ПРИЗНАК  
 <222> (75)..(75)  
 <223> X= A или V

<400> 11

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val  
 1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly  
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn  
 35 40 45

Lys Ala Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile  
 50 55 60

Arg Asp Pro Xaa Leu Xaa Xaa Gln Arg Pro Xaa Pro Pro  
 65 70 75

<210> 12  
 <211> 77  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val  
 1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly  
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn  
 35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile  
 50 55 60

Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro  
 65 70 75

<210> 13  
 <211> 20  
 <212> БЕЛОК  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> пептидный линкер

<400> 13

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Gln  
 20

<210> 14  
 <211> 20  
 <212> БЕЛОК  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> пептидный линкер

<400> 14

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly  
 20

<210> 15  
<211> 21  
<212> БЕЛОК  
<213> искусственная последовательность

<220>  
<223> пептидный линкер

<400> 15

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Ser Leu Gln  
20

<210> 16  
<211> 22  
<212> БЕЛОК  
<213> искусственная последовательность

<220>  
<223> пептидный линкер

<400> 16

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
20

<210> 17  
<211> 22  
<212> БЕЛОК  
<213> искусственная последовательность

<220>  
<223> пептидный линкер

<400> 17

Ala Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Ala Ala  
20

<210> 18  
<211> 211  
<212> БЕЛОК  
<213> искусственная последовательность

<220>  
<223> RLI1

&lt;400&gt; 18

Ile	Thr	Cys	Pro	Pro	Pro	Met	Ser	Val	Glu	His	Ala	Asp	Ile	Trp	Val
1						5			10				15		

Lys	Ser	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Ser	Arg	Glu	Arg	Tyr	Ile	Cys	Asn	Ser	Gly
						20			25				30		

Phe	Lys	Arg	Lys	Ala	Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Cys	Val	Leu	Asn
						35			40			45			

Lys	Ala	Thr	Asn	Val	Ala	His	Trp	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys	Cys	Ile
						50			55			60			

Arg	Asp	Pro	Ala	Leu	Val	His	Gln	Arg	Pro	Ala	Pro	Pro	Ser	Gly	Gly
65						70			75			80			

Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Leu		
						85			90			95			

Gln	Asn	Trp	Val	Asn	Val	Ile	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Ile	Glu	Asp	Leu
						100			105			110			

Ile	Gln	Ser	Met	His	Ile	Asp	Ala	Thr	Leu	Tyr	Thr	Glu	Ser	Asp	Val
						115			120			125			

His	Pro	Ser	Cys	Lys	Val	Thr	Ala	Met	Lys	Cys	Phe	Leu	Leu	Glu	Leu
						130			135			140			

Gln	Val	Ile	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Asp	Ala	Ser	Ile	His	Asp	Thr	Val
145						150					155			160	

Glu	Asn	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn
						165			170			175			

Val	Thr	Glu	Ser	Gly	Cys	Lys	Glu	Cys	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn
						180			185			190			

Ile	Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Val	His	Ile	Val	Gln	Met	Phe	Ile
						195			200			205			

Asn	Thr	Ser
	210	

<210>	19
<211>	211
<212>	БЕЛОК
<213>	искусственная последовательность

<220>

<223> RLI2

<400> 19

Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val  
1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly  
20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn  
35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile  
50 55 60

Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Gly Gly  
65 70 75 80

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
85 90 95

Gly Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu  
100 105 110

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val  
115 120 125

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu  
130 135 140

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val  
145 150 155 160

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn  
165 170 175

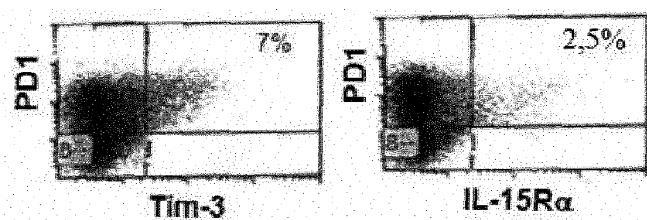
Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Lys Asn  
180 185 190

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile  
195 200 205

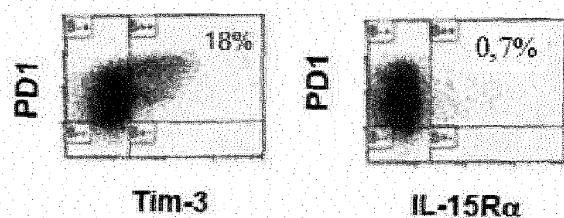
Asn Thr Ser  
210

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

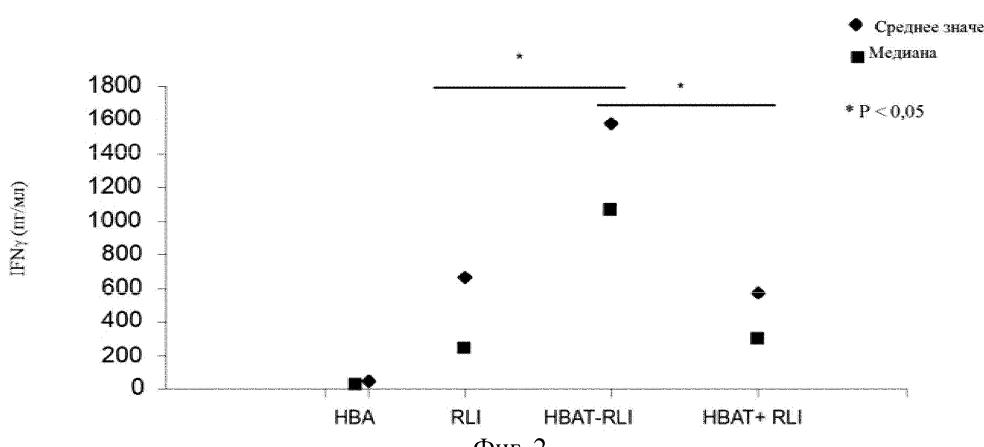
1. Иммуноцитокин, содержащий:
  - а) конъюгат и
  - б) иммуномодулирующее антитело или его фрагмент, напрямую или опосредовано связанные ковалентной связью с указанным конъюгатом,
    - где указанный конъюгат содержит:
      - (i) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность интерлейкина-15 или его производных, и
      - (ii) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность домена sushi IL-15R $\alpha$  или его производных.
2. Иммуноцитокин по п.1, где указанное иммуномодулирующее антитело стимулирует костимулирующий рецептор и выбрано из группы, включающей агонисты CD40, агонисты CD137, агонисты CD134 и агонисты TNFRSF18.
3. Иммуноцитокин по п.1, где указанное иммуномодулирующее антитело ингибирует иммуносупрессорный рецептор и выбрано из группы, включающей антагонисты CTL-A4, антагонисты ингибирующих KIR, антагонисты BTLA, антагонисты LAG3, антагонисты HAVCR2, антагонисты ADORA2A и антагонисты PD-1.
4. Иммуноцитокин по п.3, где указанное иммуномодулирующее антитело, ингибирующее иммуносупрессорный рецептор, выбрано среди антагонистов CTL-A4, предпочтительно ипилимумаба или тицилимумаба.
5. Иммуноцитокин по п.3, где указанное иммуномодулирующее антитело, ингибирующее иммуносупрессорные рецепторы, выбрано среди антагонистов ингибирующих KIR, предпочтительно 1-7F9.
6. Иммуноцитокин по п.3, где указанное иммуномодулирующее антитело, ингибирующее иммуносупрессорные рецепторы, выбрано среди антагонистов PD-1, предпочтительно ниволумаба, Merck 3745 или CT-011 (также известного как hBAT).
7. Иммуноцитокин по любому из пп.1-6, где
  - а) полипептиды i) и ii) конъюгата ковалентно связаны в слитом белке и
  - б) указанный конъюгат и антитело или его фрагмент ковалентно связаны в слитом белке.
8. Иммуноцитокин по любому из пп.1-7, где указанный интерлейкин-15 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.
9. Иммуноцитокин по любому из пп.1-8, где домен sushi IL-15R $\alpha$  имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.
10. Иммуноцитокин по любому из пп.1-9, где полипептид (ii), содержащий аминокислотную последовательность домена sushi IL-15R $\alpha$  или его производных, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.
11. Иммуноцитокин по п.7, где указанный конъюгат содержит аминокислотную последовательность интерлейкина-15 или его производных в С-концевом положении по отношению к аминокислотной последовательности домена sushi IL-15R $\alpha$  или его производных и где аминокислотная последовательность конъюгата находится в С-концевом положении по отношению к аминокислотной последовательности антитела или его фрагмента.
12. Нуклеиновая кислота, кодирующая иммуноцитокин, по любому из пп.1-11.
13. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.12.
14. Клетка-хозяин, полученная способами генетической инженерии с использованием нуклеиновой кислоты по п.12 или с использованием вектора по п.13, при этом предпочтительно указанной клеткой-хозяином является животная клетка и наиболее предпочтительно клетка СНО.
15. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноцитокин по любому из пп.1-11, связанный с фармацевтически приемлемым носителем.
16. Фармацевтическая композиция, содержащая нуклеиновую кислоту по п.12, связанную с фармацевтически приемлемым носителем.
17. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор по п.13, связанный с фармацевтически приемлемым носителем.
18. Фармацевтическая композиция по любому из пп.15-17, где указанная фармацевтическая композиция предназначена для лечения рака у субъекта, предпочтительно поздней стадии рака, такого как гипернефрома (RCC).



Фиг. 1А



Фиг. 1В



Фиг. 2

