

**ИММУНОЦИТОКИН, ВКЛЮЧАЮЩИЙ ГЕТЕРО ДИМЕРНЫЙ БЕЛКОВЫЙ КОМПЛЕКС
НА ОСНОВЕ IL-15 И IL-15RA**

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к иммуноцитокину, включающему гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15/IL-15R α , и к его применению в качестве терапевтического средства, в частности, в качестве средства для терапии рака и аутоиммунного заболевания. Настоящее изобретение также относится к иммуноцитокину, включающему гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15/IL-15R α и иммуномодулирующее антитело, и к его применению в качестве терапевтического средства, в частности, в качестве средства для терапии рака и аутоиммунного заболевания.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Цитокины относятся к категории сигнальных белков и гликопротеинов, которые как гормоны и нейротрансмиттеры, активно используются в клеточной коммуникации. Если гормоны секретируются в кровь определенными органами, а нейротрансмиттеры имеют отношение к нейрональной активности, то цитокины представляют собой более разнообразный класс соединений в отношении происхождения и назначения. Их продуцирует широкий круг гемопозитических и негемопозитических клеток, и они могут оказывать влияние как на близлежащие клетки, так и на весь организм, иногда проявляя сильную зависимость от присутствия других химических соединений. Семейство цитокинов состоит в основном из небольших водорастворимых белков и гликопротеинов массой от 8 до 30 кДа. Цитокины играют ключевую роль в реализации врожденного и приобретенного иммунных ответов. Их часто секретируют клетки иммунной системы, которые встретили патоген, для активации и мобилизации большего количества клеток иммунной системы и усиления ответа иммунной системы на патоген.

Среди цитокинов интерлейкин 15 (IL-15) является цитокином, обладающим структурным сходством с IL-2, секретирующимся мононуклеарными фагоцитами (и некоторыми другими клетками) в ответ на инфицирование вирусом(ами) или непрямую стимуляцию клетками, которые распознаются как «не свои» или ослабленные. Этот цитокин индуцирует пролиферацию естественных киллерных клеток; клеток, обеспечивающих врожденный иммунитет, основная роль которых заключается в уничтожении клеток, инфицированных вирусом. Белок, кодируемый этим геном, представляет собой цитокин, регулирующий активацию и пролиферацию Т клеток и естественных киллерных клеток.

Интерлейкин 15 (IL-15), является гликопротеином массой 14-15 кДа, одновременно относящимся к двум группам как фактор активации Т-клеток (Grabstein, K.H. et al., Science 1994, 264, 965; Burton, J.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 4935). мРНК IL-15 широко экспрессируется в различных клетках и тканях, однако обнаружить белок в этих клетках или в клеточном супернатанте затруднительно вследствие сильного посттранскрипционного контроля его экспрессии на уровне трансляции и внутриклеточного транспорта (Bamford R.N. et al., J. Immunol. 1998, 160: 4418-4426; Kurys G, et al., J. Biol. Chem. 2000, 275: 30653-30659). Кроме того, показано,

что IL-15 может существовать в активной форме в виде мембранного белка (Musso et al., Blood 1999, Vol. 93, No 10 (May 15), : pp 3531-3539), и недавно было замечено, что он может функционировать либо как лиганд, либо как рецептор (Budalgian et al., JBC 2004, vol 279, No 40: pp 42192-42201), индуцируя через этот путь секрецию провоспалительных цитокинов. Высокий уровень экспрессии растворимого белка был связан с патогенезом аутоиммунных и воспалительных заболеваний. IL-15 был обнаружен при некоторых заболеваниях, включая болезнь Крона (Kirman I., 1996, Am. J. Gastroenterol. 91, 1789), псориаз (Ruckert R. 2000, 165: 2240-2250), лейкемию (Yamada Y. 1999, Leukemia and Lymphoma, 35(1-2): 37-45) и ревматоидный артрит (РА), (McInnes I.B. 1998, Immunology Today, 19, 75-79). Связывание лиганда с Т-клеточным рецептором вызывает экспрессию IL-15R α и экспрессию некоторых антигенов активации, таких как CD69, CD25 и TNFRII. Кроме того, IL-15 является хемоаттрактантом для Т лимфоцитов человеческой крови (Wilkinson 1995, J. Exp. Med. 181, 1255-1259). Все эти данные указывают на то, что IL-15, экспрессируемый антигенпредставляющими клетками, может играть важную роль в ранней активации Т-клеток на участке воспаления.

IL-15 представляет собой член небольшого семейства цитокинов, имеющих структуру пучка из четырех α -спиралей. Биологические эффекты IL-15 опосредуются через его связывание с рецептором клеточной мембраны, состоящим из трех субъединиц α , β , и γ . IL-15R α является субъединицей, специфичной для этого цитокина, с которым она связывается с очень высокой аффинностью Kd 10^{-11} , и может обнаруживаться в виде мембранного рецептора, или в растворимой форме (Budagian V. et al., JBC 2004, 279, 39: 40368-40375; Mortier et al., The Journal of Immunology, 2004, 173: 1681-1688). IL-15R α содержит домен Sushi, который способен к связыванию с IL-15 и является существенным для биологических функций IL-15 после связывания.

IL-15 имеет недостатки, обусловленные небольшой молекулярной массой, коротким периодом полувыведения *in vivo*, слабо контролируемым повторным дозированием, и, вероятно, вызывает системный иммунный побочный эффект. Существует неотложная необходимость в нахождении подхода, который мог бы увеличить период полувыведения *in vivo* и стимулировать или усилить биологическую активность IL-15 *in vivo*.

Недавно обнаружено, что комплекс, образуемый IL-15 и его рецептором IL-15R α , может значительно усиливать биологическую активность IL-15. Исследования показали, что комплекс, образуемый IL-15 и растворимым рецептором IL-15R α , значительно превосходит отдельный IL-15 в стимуляции пролиферации Т лимфоцитов памяти CD8+ и клеток NT/NKT. Комплекс IL-15/IL-15R α более чем в 10 раз сильнее, чем отдельный IL-15, стимулирует пролиферацию Т лимфоцитов памяти CD8+ и поддерживает их выживание, при этом механизм этого действия может быть обусловлен цис-презентированием.

Международные заявки WO2007046006, WO2016095642 описывают слитый белок, предназначенный для стимуляции пути передачи сигнала через IL-15R β ета/гамма, с целью индуцировать и/или стимулировать активацию и/или пролиферацию IL-15R β ета/гамма-положительных клеток, таких как NK- и/или Т-клетки, характеризующееся тем, что

оно содержит IL-15, опосредованно связанный ковалентной связью с полипептидом, содержащим домен sushi внеклеточной области субъединицы альфа IL-15R, и к его применение при лечении рака. При этом экспериментальные данные и характеристики суперагониста в заявке WO2007046006 представлены только для соединенного линкерным пептидом через N- и C-терминальные аминокислоты IL-15 с альфа IL-15R. Тогда как экспериментальные данные и характеристики суперагониста в заявке WO2016095642 представлены только для соединенных химерной S-S связью, образуемой мутациями Cys в самих IL-15 лиганде и альфа IL-15R. Оба варианта не приводят доказательств активности и физикохимических характеристик вариантов IL15 суперагонистов, содержащих fusion белковые домены, соединенных S-S связью/ями или без S-S мостиков.

Данные объекты имеют недостатки, обусловленные небольшой молекулярной массой, коротким периодом полувыведения *in vivo*. Они обладают ограниченной активностью интерлейкина 15, а их продукция очень затруднена, в частности, в клетках яичников китайского хомячка (от англ. Chinese hamster ovary cells), и сопровождается низким выходом.

Международные заявки WO 2015103928, WO2018071919 описывают варианты решения вышеуказанных проблем, а именно гетеродимерный белок-агонист IL-15, состоящий из белка (I) и белка (II), где указанный белок (I) образован IL-15, слитым с первым вариантом Fc, причем первый вариант Fc связан с C-концом IL-15, а указанный белок (II) представляет собой второй вариант Fc или образован IL-15R α или его вариантом, слитым со вторым вариантом Fc, причем второй вариант Fc связан с C-концом IL-15R α . Белок (I) и белок (II) образуют стабильный гетеродимерный белок посредством взаимодействия с образованием структуры «выступ (Knob) во впадину (Hole)» между первым вариантом Fc и вторым вариантом Fc.

Создание иммуноцитоклинов на основе IL-15 представляет особый интерес для сочетания полезных свойств опухолеспецифических антител, мишенями которых являются опухоли, с иммуномодулирующим действием интерлейкина 15.

Международные заявки WO2015018528, WO2018071918 описывают иммуноцитоклин, содержащий конъюгат и иммуномодулирующее антитело или его фрагмент, напрямую или опосредованно связанные ковалентной связью с указанным конъюгатом, где указанный конъюгат содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность интерлейкина-15 или его производных, и полипептид, содержащий аминокислотную последовательность домена sushi IL-15R α или его производных.

Международная заявка WO 2012175222 описывает иммуноцитоклин для лечения рака, который содержит конъюгат и антитело или его фрагмент, который выбран из группы, состоящей из Fab фрагмента, Fab' фрагмента, F(ab')₂ фрагмента, Facb, Fd, и scFv, где указанный конъюгат включает полипептид, содержащий аминокислотную последовательность интерлейкина 15, и полипептид, содержащий аминокислотную последовательность домена sushi IL-15R α . Конъюгат и антитело или его фрагмент ковалентно связаны при помощи бифункциональных сшивающих агентов, обеспечивающих присоединение белков.

Международная заявка WO2019006472 описывает бифункциональный гетеродимерный белок, содержащий:

слитый белок IL-15/IL-15R α , который включает белок IL-15R α , белок IL-15 и первый домен Fc; и

мономер антигенсвязывающего домена, который связывает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD8 человека, NKG2A человека и NKG2D человека, содержащий тяжелую цепь, включающую мономер VH-CH1-шарнир-CH2-CH3, где VH представляет собой переменный домен тяжелой цепи, а CH2-CH3 представляет собой второй домен Fc, и легкая цепь содержит переменную легкую цепь (VL) и легкий константный домен (CL),

где указанные первый и указанный второй домены Fc имеют набор аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из

S267K / L368D / K370S: S267K / S364K / E357Q;

S364K / E357Q: L368D / K370S;

L368D / K370S: S364K;

L368E / K370S: S364K;

T411T / K360E / Q362E: D401K;

L368D / K370S: S364K / E357L и

K370S:S364K / E357Q.

Несмотря на вышеуказанные в уровне техники решения для комплекса, образованного IL-15 и его рецептором IL-15R α , все еще существует потребность в молекуле на основе IL15, которая будет иметь высокую стабильность, пролонгированный период полувыведения *in vivo*, повышенную биологическую активность *in vivo* и повышенную продуктивность в клетках млекопитающих.

Разработанный авторами данного изобретения новый формат иммуноцитокина, который включает гетеродимерные молекулы на основе IL-15 и IL-15R α , проявляют более высокую стабильность, повышенную продуктивность в клетках млекопитающих, пролонгированный период полувыведения *in vivo* и повышенную биологическую активность *in vivo*. Кроме того, они представляют из себя универсальный формат для биспецифического иммуноцитокина, обладающего свойством IL15 активности. Разработанный авторами данного изобретения новый формат иммуноцитокина обладает пониженной токсичностью по результатам доклинических исследований.

Краткое описание изобретения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к иммуноцитокину для стимулирования активации и/или пролиферации IL-15R β /гамма-положительных клеток, который включает гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α , содержащий:

1) IL-15R α , который связан с

а) константным доменом легкой цепи антитела или

б) константными доменами тяжелой цепи антитела, включающими первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

2) IL-15, который связан с

а) константными доменами тяжелой цепи антитела, включающими первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-

фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, или

б) константным доменом легкой цепи антитела;

при этом первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса имеют или не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик и,

где, если IL-15 или IL-15R α связан с константным доменом легкой цепи антитела, то другая часть гетеродимерного белкового комплекса, выбранная из IL-15R α или IL-15, связана с константными доменами тяжелой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса, которые имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса, которые не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает константный домен легкой цепи антитела, который выбирают из CK или CL.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α с аминокислотной последовательностью, которая представлена SEQ ID NO:9 или любой известный вариант IL-15R α , содержащий мутации, с аналогичной биологической активностью.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, который имеет аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:10 или любой известный вариант IL-15, содержащий мутации, с аналогичной биологической активностью.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , который связан с константным доменом легкой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:19.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, который связан с константным доменом легкой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:21.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, которые соединены через шарнир.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15 или IL-15R α , который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела, идущими в следующем порядке CH1-шарнир-CH2-CH3.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые

имеют аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:22.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:20.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

IL-15R α , связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:19, а

IL-15, связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:20.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

IL-15R α , связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:22, а

IL-15, связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:21.

В некоторых вариантах иммуноцитокин имеет мутации в мономере Fc-фрагмента, приводящие к отсутствию ADCC, CDC и/или ADCP свойств у указанного иммуноцитокина.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает Fc-фрагмент, который относится к IgG.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает Fc-фрагмент, который выбирают из группы: IgG1, IgG2, или IgG4 человека.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает два вышеуказанных гетеродимерных белковых комплекса на основе IL-15 и IL-15R α .

В некоторых вариантах иммуноцитокин применяют в качестве терапевтического средства для терапии рака или аутоиммунного заболевания.

В некоторых вариантах иммуноцитокин применяют в качестве терапевтического средства для терапии рака.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к иммуноцитокину для стимулирования активации и/или пролиферации IL-15R β /гамма-положительных клеток, который включает гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α и иммуномодулирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически ингибируют PD-1 путь,

где гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α содержит:

1) IL-15R α , который связан с

а) константным доменом легкой цепи антитела или

б) константными доменами тяжелой цепи антитела, включающими первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

2) IL-15, который связан с

а) константными доменами тяжелой цепи антитела, включающими первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, или

б) константным доменом легкой цепи антитела;

при этом первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса имеют или не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик и,

где, если IL-15 или IL-15R α связан с константным доменом легкой цепи антитела, то другая часть гетеродимерного белкового комплекса, выбранная из IL-15R α или IL-15, связана с константными доменами тяжелой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса, которые имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса, которые не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает константный домен легкой цепи антитела, который выбирают из CK или CL.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , который имеет аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO: 9 или любой известный вариант IL-15R α , содержащий мутации, с аналогичной биологической активностью.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, который имеет аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO: 10 или любой известный вариант IL-15, содержащий мутации, с аналогичной биологической активностью.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , который связан с константным доменом легкой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:19.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, который связан с константным доменом легкой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:21.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, которые соединены через шарнир.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15 или IL-15R α , который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела, идущими в следующем порядке CH1-шарнир-CH2-CH3.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:24.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:23.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает иммуномодулирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически ингибируют PD-1 путь, и представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает иммуномодулирующее антитело, которое включает:

а) легкую цепь, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи;

б) тяжелую цепь, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает вариабельный домен легкой цепи, который включает LCDR 1, 2 и 3 (гипервариабельные участки 1, 2 и 3), которые, соответственно, представлены аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает вариабельный домен легкой цепи, который включает аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает вариабельный домен тяжелой цепи, который включает HCDR 1, 2 и 3 (гипервариабельные участки 1, 2 и 3), которые, соответственно, представлены аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает вариабельный домен тяжелой цепи, который включает аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

1) вариабельный домен легкой цепи, который включает LCDR 1, 2 и 3 (гипервариабельные участки 1, 2 и 3), которые, соответственно, представлены аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16;

2) вариабельный домен тяжелой цепи, который включает HCDR 1, 2 и 3 (гипервариабельные участки 1, 2 и 3), которые, соответственно, представлены аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

1) вариабельный домен легкой цепи, который включает аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO: 18;

2) вариабельный домен тяжелой цепи, который включает аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает иммуномодулирующее антитело, которое включает легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO 8.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает иммуномодулирующее антитело, которое включает тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO 7.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает иммуномодулирующее антитело, которое включает:

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO 7;

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO 8.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает иммуномодулирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически ингибируют PD-1 путь, которое представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

а) гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α , который содержит:

IL-15R α , связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:19, а

IL-15, связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:23;

б) иммуномодулирующее антитело, которое включает:

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO 7;

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO 8.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

а) IL-15R α , связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:24, а

IL-15, связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:21;

б) иммуномодулирующее антитело, которое включает:

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO 7;

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена SEQ ID NO 8.

В некоторых вариантах иммуноцитокин имеет мутации в константных доменах антитела, обуславливающие гетеродимеризацию двух разных частей, одна из которых включает ковалентно или нековалентно ассоциированные IL-15R α , связанный с константными доменами антитела, и IL-15, связанный с константным доменом

антитела, а другая включает ковалентно или нековалентно ассоциированные легкую и тяжелую цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

первый мономер Fc и второй мономер Fc, которые выбраны из группы: первый мономер Fc представляет собой Fc, модифицированный с образованием Knob, а второй мономер Fc представляет собой Fc, модифицированный с образованием Hole, или когда второй мономер Fc представляет собой Fc, модифицированный с образованием Knob, а первый мономер Fc представляет собой Fc, модифицированный с образованием Hole.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает первый мономер Fc, который имеет аминокислотные замены S354C/T366W, и второй мономер Fc, который имеет аминокислотные замены Y349C/T366S/L368A/Y407V.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает первый мономер Fc, который имеет аминокислотные замены Y349C/T366S/L368A/Y407, и второй мономер Fc, который имеет аминокислотные замены S354C/T366W.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает Fc-фрагмент, который относится к IgG.

В некоторых вариантах иммуноцитокин, где изотип Fc-фрагмента выбирают из группы: IgG1, IgG2, или IgG4 человека.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает мутации в мономере Fc-фрагмента, приводящие к отсутствию ADCC, CDC и/или ADCCP свойств у указанного иммуноцитокина.

В некоторых вариантах иммуноцитокин применяют для лечения онкологического или аутоиммунного заболевания.

В некоторых вариантах иммуноцитокин применяют для лечения онкологического заболевания.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, которая кодирует любой из вышеуказанных иммуноцитоксинов.

В некоторых вариантах нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, который содержит вышеуказанную нуклеиновую кислоту.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения клетки-хозяина для получения вышеуказанного иммуноцитокина, который включает трансформирование клетки вышеуказанным вектором.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к клетке-хозяину для получения вышеуказанного иммуноцитокина, которая содержит вышеуказанную нуклеиновую кислоту.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения препарата, содержащего вышеуказанный иммуноцитокин, который заключается в культивировании вышеуказанной клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, достаточных для получения указанного иммуноцитокина, при необходимости, с последующим выделением и очисткой полученного иммуноцитокина.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для стимулирования активации и/или пролиферации IL-15Рбета/гамма-положительных клеток, которая

содержит вышеуказанный иммуноцитокин в терапевтически эффективном количестве, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция применяется для лечения онкологического или аутоиммунного заболевания.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция применяется для лечения онкологического заболевания.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция применяется для лечения онкологического заболевания, которое выбирают из группы: ПРГШ (плоскоклеточный рак головы и шеи), рак шейки матки, рак без выявленного первоисточника, глиобластома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, ТНРМЖ (трижды негативный рак молочной железы), КРР (колоректальный рак), гепатоцеллюлярная карцинома, меланома, НМРЛ (Немелкоклеточный рак легкого), рак почки, рак яичника, MSI КРР (колоректальный рак с высокой микросателлитной нестабильностью), лейкоз (острый или миелобластный), лимфома, множественная миелома, меланома, рак молочной железы, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, саркома, гепатоцеллюлярная карцинома, глиобластома, лимфома Ходжкина, Т- и В-клеточном острый лимфобластный лейкоз, мелкоклеточный рак лёгкого, острый миелобластный лейкоз, рефрактерная В-клеточная неходжкинская лимфома, фолликулярная лимфома, В-клеточная лимфома маргинальной зоны, крупноклеточная В-клеточной диффузная лимфома, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак яичника, острый миелобластный лейкоз и миелодиспластический синдром высокого риска.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения онкологического заболевания, который включает введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, вышеуказанного иммуноцитокина или вышеуказанной фармацевтической композиции в терапевтически эффективном количестве.

В некоторых вариантах способа лечения, онкологическое заболевание выбрано из группы: ПРГШ (плоскоклеточный рак головы и шеи), рак шейки матки, рак без выявленного первоисточника, глиобластома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, ТНРМЖ (трижды негативный рак молочной железы), КРР (колоректальный рак), гепатоцеллюлярная карцинома, меланома, НМРЛ (Немелкоклеточный рак легкого), рак почки, рак яичника, MSI КРР (колоректальный рак с высокой микросателлитной нестабильностью), лейкоз (острый или миелобластный), лимфома, множественная миелома, меланома, рак молочной железы, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, саркома, гепатоцеллюлярная карцинома, глиобластома, лимфома Ходжкина, Т- и В-клеточном острый лимфобластный лейкоз, мелкоклеточный рак лёгкого, острый миелобластный лейкоз, рефрактерная В-клеточная неходжкинская лимфома, фолликулярная лимфома, В-клеточная лимфома маргинальной зоны, крупноклеточная В-клеточной диффузная лимфома, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак яичника, острый миелобластный лейкоз и миелодиспластический синдром высокого риска.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу активации биологической активности Т клеточной популяции или NK клеточной популяции у субъекта, нуждающегося в такой активации,

который включает введение субъекту эффективного количества вышеуказанного иммуноцитокина или вышеуказанной фармацевтической композиции.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению вышеуказанного иммуноцитокина или вышеуказанной фармацевтической композиции для лечения у субъекта, нуждающегося в таком лечении, онкологического заболевания.

В некоторых вариантах применения, онкологическое заболевание выбрано из группы: ПРГШ (плоскоклеточный рак головы и шеи), рак шейки матки, рак без выявленного первоисточника, глиобластома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, ТНRMЖ (трижды негативный рак молочной железы), KPP (колоректальный рак), гепатоцеллюлярная карцинома, меланома, НМРЛ (Немелкоклеточный рак легкого), рак почки, рак яичника, MSI KPP (колоректальный рак с высокой микросателлитной нестабильностью), лейкоз (острый или миелобластный), лимфома, множественная миелома, меланома, рак молочной железы, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, саркома, гепатоцеллюлярная карцинома, глиобластома, лимфома Ходжкина, Т- и В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, мелкоклеточный рак лёгкого, острый миелобластный лейкоз, рефрактерная В-клеточная неходжкинская лимфома, фолликулярная лимфома, В-клеточная лимфома маргинальной зоны, крупноклеточная В-клеточной диффузная лимфома, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак яичника, острый миелобластный лейкоз и миелодиспластический синдром высокого риска.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Формат иммуноцитокина, включающего гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α (CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA).

Фиг. 2. Формат иммуноцитокина, включающего гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α (CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcLALA).

Фиг. 3. Формат иммуноцитокина, включающего гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α и иммуномодулирующее антитело, которое специфически ингибирует PD-1 путь (Fab-CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcknobLALA).

Под knob подразумеваются мутации с образованием структуры «выступ (Knob) во впадину (Hole)» между первым вариантом Fc и вторым вариантом Fc в CH3 домене.

Фиг. 4. Формат иммуноцитокина, включающего гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α и иммуномодулирующее антитело, которое специфически ингибирует PD-1 путь (Fab-CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcknobLALA).

Под knob подразумеваются мутации с образованием структуры «выступ (Knob) во впадину (Hole)» между первым вариантом Fc и вторым вариантом Fc в CH3 домене.

Фиг. 5. Вектор pEE-IL15Ra-CK.

AmpR – ген бета-лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину,

pUC origin- pUC ориджин репликации в бактериях,

CMV-Promoter – промотор ранних генов цитомегаловируса,

leader-лидерная последовательность,
IL15Ra- ген, кодирующий субъединицу α рецептора интерлейкина 15,
CK- ген, кодирующий константный домен легкой цепи,
Poly A - последовательность сигнала полиаденилирования, для повышения стабильности мРНК,
OriP- ориджин репликации в бактериях или
Высококопийный ColE1/pMB1/pBR322/pUC ориджин репликации в бактериальных клетках.
Фиг. 6. Вектор pEE-IL15-CH1-Fc-LALA.
AmpR - ген бета-лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину,
pUC origin- pUC ориджин репликации в бактериях,
CMV-Promoter - промотор ранних генов цитомегаловируса,
leader-лидерная последовательность,
IL15- ген, кодирующий интерлейкин 15,
CH1- ген, кодирующий первый константный домен тяжелой цепи,
Fc-LALA - ген, кодирующий Fc-фрагмент с мутациями LALA (мутации L234A и L235A в константном домене CH2 Fc-фрагмента),
Poly A - последовательность сигнала полиаденилирования, для повышения стабильности мРНК,
OriP- ориджин репликации в бактериях или
высококопийный ColE1/pMB1/pBR322/pUC ориджин репликации в бактериальных клетках.
Фиг. 7. Вектор pEE-BCD100-02-VL-CK.
AmpR - ген бета-лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину,
pUC origin- pUC ориджин репликации в бактериях,
CMV-Promoter - промотор ранних генов цитомегаловируса,
leader-лидерная последовательность,
aPD1-VL- ген, кодирующий легкую цепь антитела, которое специфически связывается с PD1,
CK- ген, кодирующий константный домен легкой цепи,
Poly A - последовательность сигнала полиаденилирования, для повышения стабильности мРНК,
OriP- ориджин репликации в бактериях или
высококопийный ColE1/pMB1/pBR322/pUC ориджин репликации в бактериальных клетках.
Фиг. 8. Вектор pEE-BCD100-02-VH-CH1-Fc-hole-LALA.
AmpR - ген бета-лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину,
pUC origin- pUC ориджин репликации в бактериях,
promoter - промотор ранних генов цитомегаловируса,
leader-лидерная последовательность,
aPD1-VH- ген, кодирующий переменный домен тяжелой цепи антитела, которое специфически связывается с PD1,
CH1- ген, кодирующий первый константный домен тяжелой цепи,
Fc-hole-LALA - ген, кодирующий Fc-фрагмент с мутациями для образования hole и LALA (мутации L234A и L235A в константном домене CH2 Fc-фрагмента),
STOP-стоп-кодон,
OriP- ориджин репликации в бактериях или

высококопийный ColE1/pMB1/pBR322/pUC ориджин репликации в бактериальных клетках.

Фиг. 9. Вектор pEE-IL15-CH1-Fc-knob-LALA.

AmpR – ген бета-лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину,

pUC origin- pUC ориджин репликации в бактериях,

CMV-Promoter – промотор ранних генов цитомегаловируса,

leader-лидерная последовательность,

IL15- ген, кодирующий интерлейкин 15,

CH1- ген, кодирующий первый константный домен тяжелой цепи,

Fc-knob-LALA – ген, кодирующий Fc-фрагмент с мутациями для образования knob и LALA (мутации L234A и L235A в константном домене CH2 Fc-фрагмента),

STOP-стоп-кодон,

OriP- ориджин репликации в бактериях или

высококопийный ColE1/pMB1/pBR322/pUC ориджин репликации в бактериальных клетках.

Фиг. 10 А. SDS-гель-электрофорез с бета-меркаптоэтанолом

1.Контрольное антитело	5мкл	
2.Fermentas unstained marker		
3.-		
4.Среда роста с CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA до очистки		10
МКЛ		
5.Среда роста с CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA после очистки		10
МКЛ		
6.Очищенный CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA		10
МКЛ		
7.-		
8.Среда роста с CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcLALA до очистки		10
МКЛ		
9.Среда роста с CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcLALA после очистки		10
МКЛ		
10.Очищенный CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcLALA		10
МКЛ		

Фиг. 10 Б. SDS-гель-электрофорез без бета-меркаптоэтанолом

1.Очищенный CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA	10 мкл
2.Очищенный CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcLALA	10 мкл
3.Fermentas unstained marker	
4.Контрольное антитело	5мкл

Фиг. 11. Тест на определение пролиферационной активности. Для теста использовали клеточную линию NK-92. Тест проводили в культуральном 96-луночном планшете. Суспензия содержала клетки NK-92, исследуемое антитело в указанной на графике концентрации. Все компоненты суспензии готовили в среде RPMI-1640, содержащей эмбриональную бычью сыворотку и глутамин. После добавления всех компонентов планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂. Далее в лунки вносили краситель Alamar Blue. После инкубации измеряли интенсивность флуоресценции в лунках.

Фиг. 12. Тест на определение пролиферационной активности. Для теста использовали выделенные натуральные киллеры, выделенные из РВМС здоровых доноров, методом негативной селекции. Тест проводили в культуральном 96-луночном планшете. Суспензия содержала клетки натуральных киллеров, исследуемое антитело в указанной на графике

концентрации. Все компоненты суспензии готовили в среде культивирования, содержащей аутологичную плазму человека. После добавления всех компонентов планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂. Далее в лунки вносили краситель Alamar Blue. После инкубации измеряли интенсивность флуоресценции в лунках.

Фиг. 13. Тест на определение aPD1 спец. активности. Для теста использовали клеточную линию Jurkat NFAT-FLuc PD-1, созданную на основе клеточной линии Jurkat, стабильно экспрессирующую на поверхности PD-1 и содержащую ген, кодирующий люциферазу светляка, под контролем NFAT-промотора; а также клеточную линию Raji PDL1, созданную на основе клеточной линии Raji, стабильно экспрессирующую на поверхности PDL1. Тест проводили в культуральном 96-луночном планшете. Суспензия в каждой лунке содержала клетки Jurkat NFAT-FLuc PD-1, клетки Raji PDL1, aCD3/aTAA1 в концентрации 1 нг/мл, исследуемое антитело в указанной на графике концентрации. После добавления всех компонентов планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и далее, с помощью набора для оценки люминесценции, измеряли интенсивность люциферы в лунках.

Фиг. 14. Анализ специфической активности анти-PDL1/IL15SA антител на репортерной клеточной линии.

Фиг. 15. Тест на определение влияния на ADCC натуральных киллеров. Для теста использовали натуральные киллеры, выделенные из PBMC здоровых доноров, методом негативной селекции. Тест проводили в культуральном 96-луночном планшете. Суспензия содержала клетки натуральных киллеров и клетки Raji, эффекторное антитело Ритуксимаб и исследуемое антитело в указанной на графике концентрации. Все компоненты суспензии готовили в среде культивирования, содержащей эмбриональную бычью сыворотку и глутамин. После добавления всех компонентов планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂. Далее собирали культуральную жидкость и исследовали содержание лактатдегидрогеназы с использованием набора для определения ЛДГ.

Фиг. 16. Результаты проверки специфической активности иммуноцитоклинов в отношении усиления ADCC способности rituximab против ТАА-репортерной линии.

Фиг. 17. Исследование цитотоксичности для вариантов иммуноцитоклина, включающего гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α (IL15SA), на NK-клетках.

Результаты свидетельствуют об отсутствии значимого цитотоксического эффекта кандидатов, то есть не более 10% уменьшения количества иммунореактивных клеток в сравнении с негативным контролем АВ (отсутствие каких-либо экзогенных антител).

Фиг. 18. Исследование цитотоксичности для IL15SA вариантов на В-клетках.

Результаты свидетельствуют об отсутствии значимого цитотоксического эффекта кандидатов, то есть не более 10% уменьшения количества иммунореактивных клеток в сравнении с негативным контролем АВ (отсутствие каких-либо экзогенных антител).

Фиг. 19. Исследование цитотоксичности для IL15SA вариантов на CD3+ -клетках.

Результаты свидетельствуют об отсутствии значимого цитотоксического эффекта кандидатов, то есть не более 10% уменьшения количества иммунореактивных клеток в сравнении с негативным контролем АВ (отсутствие каких-либо экзогенных антител).

Фиг. 20. Исследование цитотоксичности для IL15SA вариантов на CD4+ -клетках.

Результаты свидетельствуют об отсутствии значимого цитотоксического эффекта кандидатов, то есть не более 10% уменьшения количества иммунореактивных клеток в сравнении с негативным контролем АВ (отсутствие каких-либо экзогенных антител).

Фиг. 21. Исследование цитотоксичности для IL15SA вариантов на CD8+ -клетках.

Результаты свидетельствуют об отсутствии значимого цитотоксического эффекта кандидатов, то есть не более 10% уменьшения количества иммунореактивных клеток в сравнении с негативным контролем АВ (отсутствие каких-либо экзогенных антител).

Фиг. 22. Хроматограмма. Данная хроматограмма демонстрирует высокую гомогенность (содержание агрегатов в растворе составила не более 5%) иммуноцитокина, включающего гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α (IL15 суперагониста).

Фиг. 23. Схема эксперимента по определению противоопухолевой активности препаратов иммуноцитокина, включающего гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α (BCD-225) в *in vivo* мышинной модели опухоли.

Фиг. 24. Результаты эксперимента по определению противоопухолевой активности вариантов препарата иммуноцитокина, включающего гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α (BCD-225) (график) в *in vivo* мышинной модели опухоли.

Фиг. 25. Результаты эксперимента по определению противоопухолевой активности вариантов препарата иммуноцитокина, включающего гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α (BCD-225) (диаграмма) в *in vivo* мышинной модели опухоли.

Описание изобретения

Общие определения и общие методы

Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в данной области.

Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в единственном числе включают в себя термины во множественном числе, и термины во множественном числе включают в себя термины в единственном числе. Как правило, используемая классификация и методы культивирования клеток, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, химии органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии, а также гибридизации и химии белка и нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, хорошо известны специалистам и широко применяются в данной области. Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя,

как это обычно осуществляется в данной области, или как описано в настоящем документе.

Если специально не указано иначе, выражения «биологически активный», и «биологическая активность», и «биологические характеристики», по отношению к полипептиду по данному изобретению, означают обладание способностью связываться с биологической молекулой.

Термин «рекомбинантный белок» означает белок (полипептид), который экспрессируется в клетке или клеточной линии, содержащей нуклеотидную последовательность (нуклеотидные последовательности), которая кодирует данный белок, при этом указанная нуклеотидная последовательность (нуклеотидные последовательности) не ассоциирована с клеткой в природе.

Термин «биспецифическое антитело» означает антитело, содержащее антигенсвязывающий домен или антигенсвязывающие домены, которые способны к специфическому связыванию с двумя различными эпитопами на одной биологической молекуле или способны к специфическому связыванию с эпитопами на двух различных биологических молекулах. Биспецифическое антитело также упоминается в настоящем документе, как обладающее «двойной специфичностью» или как являющееся антителом с «двойной специфичностью».

Термин «моноклональное антитело» или «mAb» относится к антителу, которое синтезировано и выделено отдельной клональной популяцией клеток. Клональная популяция может быть клональной популяцией immortalized клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения immortalized клетки в клональной популяции являются гибридными клетками, гибридами, которые обычно получают путем слияния отдельных В-лимфоцитов от иммунизированных животных с отдельными клетками лимфоцитарной опухоли. Гибридомы представляют собой тип сконструированных клеток и не встречаются в природе.

Термин «Ка», как использовано в данном описании, относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин «Kd», как использовано в данном описании, относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

«Аффинность связывания» обычно относится к силе совокупных нековалентных взаимодействий между единичным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иначе, «аффинность связывания» относится к внутренней (характерной, истинной) аффинности связывания, которая отражает 1:1 взаимодействие между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к своему партнеру Y обычно можно представить константой диссоциации (Kd). Желательно, чтобы величина Kd составляла, примерно, 200 нМ, 150 нМ, 100 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 8 нМ, 6 нМ, 4 нМ, 2 нМ, 1 нМ или менее. Аффинность можно измерять обычными методами, известными в уровне техники, включая методы по данному описанию. В уровне техники известны различные методы измерения аффинности связывания, любой из этих методов можно использовать для целей настоящего изобретения.

Термин «пептидный линкер» в настоящем документе означает любой пептид с возможностью соединения доменов с длиной в

зависимости от доменов, которые он связывает между собой, содержащий любую аминокислотную последовательность. Предпочтительно пептидный линкер имеет длину более 5 аминокислот и состоит из любого набора аминокислот, выбранного из G, A, S, P, E, T, D, K.

Термин «in vitro» относится к биологическому объекту, биологическому процессу или биологической реакции вне организма, смоделированному в искусственных условиях. Например, рост клеток in vitro должен пониматься как рост клеток в среде вне организма, например, в пробирке, культуральном флаконе или микропланшете.

В настоящем описании и в последующей формуле изобретения, если контекстом не предусмотрено иное, слова «иметь», «включать» и «содержать» или их вариации, такие как «имеет», «имеющий», «включает», «включающий», «содержит» или «содержащий», следует понимать как включение указанного целого или группы целых, но не исключение любого другого целого или группы целых.

Подробное описание изобретения

Иммуноцитокин

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к иммуноцитокину для стимулирования активации и/или пролиферации IL-15R β /гамма-положительных клеток, который включает гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α , содержащий:

- 1) IL-15R α , который связан с
 - а) константным доменом легкой цепи антитела или
 - б) константными доменами тяжелой цепи антитела, включающими первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;
 - 2) IL-15, который связан с
 - а) константными доменами тяжелой цепи антитела, включающими первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, или
 - б) константным доменом легкой цепи антитела;
- при этом первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса имеют или не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик и,

где, если IL-15 или IL-15R α связан с константным доменом легкой цепи антитела, то другая часть гетеродимерного белкового комплекса, выбранная из IL-15R α или IL-15, связана с константными доменами тяжелой цепи антитела.

Формат вышеуказанного иммуноцитокина представлен на фигурах 1 и 2.

Термин «иммуноцитокин» обозначает молекулу, содержащую антитело или его фрагменты, напрямую или опосредованно связанные при помощи ковалентной связи с цитокином или его производными. Указанное антитело и указанный цитокин могут быть связаны при помощи линкерного пептида.

Под иммуноцитокин по изобретению подразумевается выделенный иммуноцитокин.

Определение «выделенный» («изолированный»), применяемое для описания различных иммуноцитокinov по данному описанию, означает иммуноцитокин, идентифицированный и выделенный и/или регенерированное из клетки или клеточной культуры, в которой он экспрессируется. Примеси (загрязняющие компоненты) из природной среды представляют собой материалы, которые, как правило, мешают диагностическому или терапевтическому применению полипептида, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах изобретения иммуноцитокин очищают (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, при использовании секвенатора с вращающейся стеклянной чашечкой (секвенатора Эдмана), или (2) до гомогенности методом SDS-PAGE в невосстанавливающих или восстанавливающих условиях с применением окрашивания Кумасси бриллиантовым голубым или, предпочтительно, серебром. Выделенный иммуноцитокин включает иммуноцитокин *in situ* внутри рекомбинантных клеток, так как по меньшей мере один компонент природной среды полипептида отсутствует. Обычно выделенный полипептид получают в результате по меньшей мере одной стадии очистки.

При использовании в настоящем документе «гетеродимерный белковый комплекс» относится к белку, образованному комбинацией IL-15 и IL-15R α .

При использовании в настоящем документе «IL-15», «пептид IL-15» или «интерлейкин-15» может представлять собой любой IL-15 (интерлейкин-15) или его мутантную форму, такой как IL-15 человека или млекопитающего, отличающегося от человека, или IL-15 не млекопитающего. Иллюстративные млекопитающие, отличающиеся от человека, включают таких млекопитающих, как свиньи, кролики, обезьяны, шимпанзе, мыши и тому подобные; не млекопитающие включают таких, как куры и тому подобные. Предпочтительно зрелую молекулу интерлейкина-15 человека находят в базе данных UniProtKB, номер доступа P40933, 49-162aa. Термин «вариант IL-15» относится к варианту молекулы, обладающему повышенной или пониженной аффинностью к ее рецептору или повышенной или пониженной активностью при стимуляции Т клеток или NK клеток в результате одного или более из замен, дополнений или делеций аминокислот.

«IL-15R α » означает субъединицу α рецептора интерлейкина 15 и, согласно настоящему изобретению, может представлять собой любое соединение IL-15R α или его функциональный фрагмент, такой как IL-15R α человека или IL-15R α млекопитающего, отличающегося от человека, или IL-15R α не млекопитающего. Иллюстративные млекопитающие, отличающиеся от человека, включают таких млекопитающих, как свиньи, кролики, обезьяны, шимпанзе, мыши и тому подобные; не млекопитающие включают таких, как куры и тому подобные. Предпочтительная молекула IL-15R α находят в базе данных UniProt, номер доступа Q13261 (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q13261>).

Кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина (англ. fragment crystallizable region, Fc region, Fc) – это концевая часть молекулы иммуноглобулина, которая взаимодействует с Fc-рецептором на

поверхности клетки и с некоторыми белками системы комплемента. Данное свойство позволяет антителам активировать иммунную систему. Fc-участок IgG, IgA и IgD изотипов состоит из двух одинаковых белковых фрагментов, соответственно, второго и третьего константных доменов двух тяжелых цепей; в случае изотипов IgM и IgE Fc содержит три константных домена тяжелых цепей (домены CH2, CH3 и CH4) в каждой полипептидной цепочке.

Под «мономером Fc-фрагмента» подразумевается Fc-участок из второго и третьего константных доменов любой одной из двух тяжелых цепей (для IgG, IgA и IgD изотипов); в случае изотипов IgM и IgE мономер Fc содержит три константных домена одной из двух тяжелых цепей (домены CH2, CH3 и CH4).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса, которые имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса, которые не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает константный домен легкой цепи антитела, который выбирают из CK или CL.

У млекопитающих известно только два типа легких цепей, которые обозначают как лямбда (λ) и каппа (κ). Константный домен лямбда легкой цепи обозначается как CL, а каппа легкой цепи обозначается как CK.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α с аминокислотной последовательностью, которая представлена DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVANWHTTPSLKCI RDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASS (SEQ ID NO:9) или любой известный вариант IL-15R α , содержащий мутации, с аналогичной биологической активностью.

Под IL-15R α , который содержит мутации, с аналогичной биологической активностью IL-15R α , подразумевается любой известный из уровня техники IL-15R α , который содержит мутации и имеет аналогичную биологическую активность IL-15R α «дикого типа».

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, который имеет аминокислотную последовательность, которая представлена DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKTMKCFLELQVISLESGDASIHDTV ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKKEFLQSFVHVIVQMFINTS (SEQ ID NO:10) или любой известный вариант IL-15, содержащий мутации, с аналогичной биологической активностью.

Под IL-15, который содержит мутации, с аналогичной биологической активностью IL-15, подразумевается любой известный из уровня техники IL-15, который содержит мутации и имеет аналогичную биологическую активность IL-15 «дикого типа».

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , который связан с константным доменом легкой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVANWHTTPSLKCI RDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLK

SGTASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:1).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI
RDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA (SEQ ID NO:19).

Аминокислотная последовательность, которая представлена SEQ ID NO:19, отличается от аминокислотной последовательности, которая представлена SEQ ID NO:1, одной аминокислотной заменой Цистеина (C) на Аланин (A) в 216 положении. Данная замена позволяет получить иммуноцитокин, который включает первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса, которые не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, который связан с константным доменом легкой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHDTV
ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
SLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:3).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHDTV
ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
SLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA (SEQ ID NO:21).

Аминокислотная последовательность, которая представлена SEQ ID NO:21, отличается от аминокислотной последовательности, которая представлена SEQ ID NO:3, одной аминокислотной заменой Цистеина (C) на Аланин (A) в 233 положении. Данная замена позволяет получить иммуноцитокин, который включает первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса, которые не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, которые соединены через шарнир.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15 или IL-15R α , который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела, идущими в следующем порядке CH1-шарнир-CH2-CH3.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSSLTECVLNKATNVANHWTTPSLKCI
 RDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKGPSVFPLAPSSKSTS
 GGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID
 NO:4).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSSLTECVLNKATNVANHWTTPSLKCI
 RDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKGPSVFPLAPSSKSTS
 GGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTKVDKRVEPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID
 NO:22).

Аминокислотная последовательность, которая представлена SEQ ID NO:22, отличается от аминокислотной последовательности, которая представлена SEQ ID NO:4, одной аминокислотной заменой Цистеина (C) на Аланин (A) в 212 положении. Данная замена позволяет получить иммуноцитокин, который включает первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса, которые не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTV
 ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
 KDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSP (SEQ ID NO:2).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTV
 ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
 KDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSP (SEQ ID NO:20).

Аминокислотная последовательность, которая представлена SEQ ID NO:20, отличается от аминокислотной последовательности, которая

представлена SEQ ID NO:2, одной аминокислотной заменой Цистеина (C) на Аланин (A) в 229 положении. Данная замена позволяет получить иммуноцитокин, который включает первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса, которые не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

IL-15R α , связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWHTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTITAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:1) или DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWHTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTITAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA (SEQ ID NO:19), а

IL-15, связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGASTKGPSVFPAPASSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSP (SEQ ID NO:2) или DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGASTKGPSVFPAPASSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSP (SEQ ID NO:20).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

IL-15R α , связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWHTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTITAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:1), а

IL-15, связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGASTKGPSVFPAPASSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ

DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSP (SEQ ID NO:2).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

IL-15 α , связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPLKCI RDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA (SEQ ID NO:19), а

IL-15, связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHDTV ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSADKTHCTPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQK SLSLSP (SEQ ID NO:20).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

IL-15 α , связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPLKCI RDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHCTPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSP (SEQ ID NO:4) или

DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPLKCI RDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSADKTHCTPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSP (SEQ ID NO:22), а

IL-15, связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHDTV ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:3) или DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHDTV ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA (SEQ ID NO:21).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

IL-15R α , связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSSLTECVLNKATNVAHWITPSLKCI
RDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELINQAISLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID
NO:4), а

IL-15, связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHDTV
ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:3).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

IL-15R α , связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSSLTECVLNKATNVAHWITPSLKCI
RDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKRVKPKSADKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELINQAISLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID
NO:22), а

IL-15, связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHDTV
ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA (SEQ ID NO:21).

В некоторых вариантах иммуноцитокин имеет мутации в мономере Fc-фрагмента, приводящие к отсутствию ADCC, CDC и/или ADCP свойств у указанного иммуноцитокина.

Под мутациями в Fc-фрагменте предлагается модификация(и) аминокислотных последовательностей антител, описанных в настоящей заявке. Варианты аминокислотной последовательности антитела получают введением соответствующих изменений нуклеотидов в нуклеиновую кислоту антитела или пептидным синтезом. Такие модификации включают, например, делеции, и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Осуществляют любое сочетание делеции, инсерции и замены, чтобы получить конечную конструкцию, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками.

Вариант модификации аминокислотных последовательностей антител с помощью аминокислотных замен представляет собой замену,

по меньшей мере, одного аминокислотного остатка в молекуле антитела на другой остаток.

Консервативные замены показаны в таблице А под заголовком «предпочтительные замены».

Таблица А		
Исходный остаток	Примеры замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn(N)	Gin; His; Asp; Lys; Arg	Gin
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gin	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gin; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

Понятие «эффекторная функция» антитела относится к видам биологической активности, связанным с Fc-областью (нативной последовательностью Fc-области или с вариантами аминокислотной последовательности Fc-области) антитела, и варьируют в зависимости от изотипа антитела. Примерами эффекторных функций антитела являются: Cl_q -связывание; комплементзависимая цитотоксичность; связывание Fc-рецептора; антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора, BCR) и B-клеточная активация.

«Антитело-зависимая клеточная цитотоксичность» или «ADCC» относится к опосредованному клетками ответу, при котором неспецифичные цитотоксические клетки, которые экспрессируют рецепторы Fc (FcR) (например, природные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), узнают связанное антитело на клетке-мишени и затем вызывают лизис или фагоцитоз клетки-мишени. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и

FcγRIII. Экспрессия FcR на гематопоэтических клетках суммирована в таблице 3 на странице 464 в публикации Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Чтобы оценить активность в ADCC представляющей интерес молекулы можно осуществить анализы ADCC *in vitro*, такие как анализы, описанные в патентах США № 5500362 или 5821337. Применимые эффекторные клетки для таких анализов включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и природные клетки-киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно ADCC-активность представляющей интерес молекулы можно оценить *in vivo*, например, в животной модели, такой как модель, описанная в Clynes et al. *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).

«Эффекторными клетками человека» являются лейкоциты, которые экспрессируют один или несколько FcR и осуществляют эффекторные функции. Предпочтительно клетки экспрессируют, по меньшей мере, FcγRIII и осуществляют ADCC-эффекторную функцию. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют ADCC, включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC), природные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; при этом предпочтительны PBMC и NK-клетки. Эффекторные клетки могут быть выделены из их природного источника, например из крови или PBMC, как описано в настоящей публикации.

«Комплемент-зависимая цитотоксичность» и «CDC» относятся к способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом) в комплексе со своим антигеном. Чтобы оценить активацию комплемента можно осуществить анализ CDC, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает Fc-фрагмент, который относится к IgG.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает Fc-фрагмент, который выбирают из группы: IgG1, IgG2, или IgG4 человека.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает два вышеуказанных гетеродимерных белковых комплекса на основе IL-15 и IL-15Rα.

Под IL15 суперагонистом (другое название BCD225 или IL15SA или (IL15SA)2-Fc) по данному изобретению подразумевается CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA и CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcLALA.

Обозначения CK, IL15Ra, IL15, CH1FcLALA имеют расшифровку по тексту заявки.

CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA – это вышеуказанный иммуноцитокин, включающий два гетеродимерных белковых комплекса на основе IL-15 и IL-15Rα, которые включают IL15Ra, который связан с константным доменом легкой цепи антитела CK и IL15, который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела, включающими первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, где Fc содержит мутации LALA.

CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcLALA – это вышеуказанный иммуноцитокин, включающий два гетеродимерных белковых комплекса на основе IL-15 и IL-15Rα, которые включают IL15, который связан с константным доменом легкой цепи антитела CK, и IL15Ra, который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела, включающими

первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, где Fc содержит мутации LALA.

Вышеуказанные иммуноцитокнины могут быть выполнены как в формате, где первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик, так и в формате, где первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик, в частном случае для этого оба цистеина заменяют на аланин.

При экспериментальных исследованиях вышеуказанных иммуноцитокнинов как формате, где первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик, так и в формате, где первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик, не было выявлено какой-либо значительной разницы в активности вышеуказанных иммуноцитокнинов.

Формат вышеуказанного иммуноцитокнина представлен на фигурах 1 и 2.

В некоторых вариантах иммуноцитокнин применяют в качестве терапевтического средства для терапии рака или аутоиммунного заболевания.

В некоторых вариантах иммуноцитокнин применяют в качестве терапевтического средства для терапии рака.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к иммуноцитокнину для стимулирования активации и/или пролиферации IL-15R β /гамма-положительных клеток, который включает гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α и иммуномодулирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически ингибируют PD-1 путь,

где гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α содержит:

1) IL-15R α , который связан с

а) константным доменом легкой цепи антитела или

б) константными доменами тяжелой цепи антитела, включающими первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

2) IL-15, который связан с

а) константными доменами тяжелой цепи антитела, включающими первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, или

б) константным доменом легкой цепи антитела;

при этом первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса имеют или не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик и,

где, если IL-15 или IL-15R α связан с константным доменом легкой цепи антитела, то другая часть гетеродимерного белкового

комплекса, выбранная из IL-15R α или IL-15, связана с константными доменами тяжелой цепи антитела.

Термин «антитело» или «иммуноглобулин» (Ig), как использовано в данном описании, включает целые антитела и любой антигенсвязывающий фрагмент (т.е. «антигенсвязывающую часть») или его отдельные цепи. Термин «антитело» относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, взаимосвязанные дисульфидными связями, или его антигенсвязывающей части. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно называемую в данном описании как VH) и константную область тяжелой цепи. Известно пять типов тяжелых цепей антител млекопитающих, которые обозначают греческими буквами: α , δ , ϵ , γ и μ . Присутствующий тип тяжелой цепи определяет класс антитела; указанные цепи обнаружены в антителах типа IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно. Различные тяжелые цепи отличаются по размеру и составу; α и γ содержат примерно 450 аминокислот, а μ и ϵ состоят примерно из 550 аминокислот. Каждая тяжелая цепь содержит две области, т.е. константную область и переменную область. Константная область является идентичной во всех антителах одного и того же изотипа, но отличается в антителах различного изотипа. Тяжелые цепи γ , α и δ содержат константную область, которая состоит из трех константных доменов CH1, CH2 и CH3 (выстроены в ряд) и шарнирной области, которая придает гибкость (Woof J., Burton D., Nat Rev Immunol 4, 2004, сс.89-99); тяжелые цепи μ и ϵ содержат константную область, которая состоит из четырех константных доменов CH1, CH2, CH3 и CH4. У млекопитающих известно только два типа легких цепей, которые обозначают как лямбда (λ) и каппа (κ). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно называемой в данном описании как VL) и константной области легкой цепи. Примерная длина легкой цепи составляет 211-217 аминокислот. Предпочтительно легкая цепь представляет собой легкую каппа (κ)-цепь, а константный домен CL предпочтительно представляет собой C-каппа (κ).

«Антитело» согласно изобретению может представлять собой антитело любого класса (например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, предпочтительно IgG) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2, предпочтительно IgG1).

Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), разбросанные между областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями хозяина или факторами, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторными клетками), и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин «антигенсвязывающая часть» антитела или «антигенсвязывающий фрагмент» (или просто «часть антитела» или

«фрагмент антитела»), как использовано в данном описании, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин «антигенсвязывающая часть» антитела включают (i) Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH 1; (ii) F(ab')₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH 1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH в едином плече антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена VH/VNH; и (vi) выделенная определяющая комплементарность область (CDR). Кроме того, две области Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются разными генами, они могут быть соединены при помощи рекомбинантных способов с использованием синтетического линкера, который дает возможность получать их в виде единой белковой цепи, в которой области VL и VH спариваются с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Предполагается, что такие одноцепочечные молекулы также включены в термин «антигенсвязывающая часть» антитела. Такие фрагменты антител получают с использованием общепринятых способов, известных специалистам в данной области, и эти фрагменты подвергают скринингу таким же образом, как и интактные антитела.

Предпочтительно CDR антигенсвязывающего участка или весь антигенсвязывающий участок антител по изобретению имеет происхождение из мыши, ламы или донорской человеческой библиотеки или по существу человеческое происхождение с определенными аминокислотными остатками, измененными, например, замещенными разными аминокислотными остатками с тем, чтобы оптимизировать конкретные свойства антитела, например KD, koff, IC₅₀, EC₅₀, ED₅₀. Предпочтительно каркасные участки антитела по изобретению имеют человеческое происхождение или по существу человеческое происхождение (по крайней мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% человеческого происхождения).

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий участок антитела по изобретению может происходить из других нечеловеческих видов, включая мыши, ламы, кролика, крысу или хомяка, но не ограничиваясь ими. Альтернативно, антигенсвязывающий участок может происходить из человеческих видов.

Термин «вариабельный» относится к тому факту, что определенные сегменты вариабельных доменов широко отличаются в последовательности среди антител. Домен V опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела к его конкретному антигену. Однако вариабельность неравномерно распределяется на участке вариабельных доменов из 110 аминокислот. Напротив, V области состоят из инвариантных фрагментов, называемых каркасными областями (FR) из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими участками чрезвычайной вариабельности, называемых «гипервариабельными областями» или CDR. Каждый вариабельный домен

нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR, в основном принимающих конфигурацию бета-листов, связанных тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, связывающие, и в некоторых случаях являющиеся частью бета-складчатой структуры. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в тесной близости с помощью FR и с гипервариабельными областями другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего сайта антител. Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ, ADCC).

Термин «гипервариабельная область» по данному описанию относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Обычно гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки из «области, определяющей комплементарность» или «CDR», и/или такие остатки из «гипервариабельной петли».

В некоторых случаях может также быть предпочтительным изменение одного или более остатков аминокислот CDR-участков с целью повышения аффинности связывания с целевым эпитопом. Это известно, как «созревание аффинности» и в некоторых случаях может выполняться в связи с гуманизацией, например, в ситуациях, когда гуманизация антитела приводит к снижению специфичности или аффинности связывания, и не представляется возможным в достаточной степени улучшить специфичность или аффинность связывания с помощью только обратных мутаций. Различные методы созревания аффинности известны в данной области техники, например, способ *in vitro* сканирующего насыщающего мутагенеза, описанный Burks et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:412-417 (1997), и способ пошагового *in vitro* созревания аффинности, предложенный Wu et al., Proc Natl Acad Sci USA 95:6037-6042 (1998).

«Каркасные области» (FR) представляют собой остатки вариабельного домена, отличные от CDR остатков. Обычно каждый вариабельный домен имеет четыре FR, определяемые как FR1, FR2, FR3 и FR4. Если CDR определяются согласно Kabat, FR остатки легкой цепи локализуются, приблизительно, в области остатков 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3) и 98-107 (LCFR4), а остатки FR тяжелой цепи локализуются, приблизительно, в области остатков 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) и 103-113 (HCFR4) в тяжелой цепи. Если участки CDR содержат аминокислотные остатки из гипервариабельных петель, FR остатки легкой цепи локализуются, приблизительно, в остатках 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3) и 97-107 (LCFR4) в легкой цепи, а FR остатки тяжелой цепи локализуются, примерно, в остатках 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3) и 102-113 (HCFR4) в остатках тяжелой цепи. В некоторых примерах, когда CDR содержит аминокислоты как из CDR по Kabat, так и аминокислоты из гипервариабельной петли, FR соответствующим образом корректируются. Например, когда CDRH1 включает аминокислоты H26-H35, остатки FR1 тяжелой цепи находятся в положениях 1-25, а остатки FR2 находятся в положениях 36-49.

Антитело по данному изобретению, «которое связывает» целевой антиген, представляет собой антитело, которое связывает антиген с достаточной аффинностью так, что антитело можно применять в

качестве диагностического и/или терапевтического агента при нацеливании на белок или клетку, или ткань, экспрессирующую антиген, и в незначительной степени перекрестно реагирует с другими белками. По данным аналитических методов: сортинга флуоресцентно-активированных клеток (FACS), радиоиммунопреципитации (RIA) или ИФА (ELISA), в таких вариантах изобретения степень связывания антитела с белком, не являющимся «мишенью» (с «нецелевым белком»), составляет менее 10% от связывания антитела с конкретным белком-мишенью. По отношению к связыванию антитела с молекулой-мишенью термин «специфическое связывание» или выражения «специфически связывается с» или «специфический к» конкретному полипептиду или эпитопу на конкретном полипептиде-мишени означает связывание, которое заметно (измеримо) отличается от неспецифического взаимодействия.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса, которые имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса, которые не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает константный домен легкой цепи антитела, который выбирают из CK или CL.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , который имеет аминокислотную последовательность, которая представлена DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVANWHTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASS (SEQ ID NO:9) или любой известный вариант IL-15R α , содержащий мутации, с аналогичной биологической активностью.

Под IL-15R α , который содержит мутации, с аналогичной биологической активностью IL-15R α , подразумевается любой известный из уровня техники IL-15R α , который содержит мутации и имеет аналогичную биологическую активность IL-15R α «дикого типа».

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, который имеет аминокислотную последовательность, которая представлена DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVAMKCFLELQVISLESGDASIHDTV ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:10) или любой известный вариант IL-15, содержащий мутации, с аналогичной биологической активностью.

Под IL-15, который содержит мутации, с аналогичной биологической активностью IL-15, подразумевается любой известный из уровня техники IL-15, который содержит мутации и имеет аналогичную биологическую активность IL-15 «дикого типа».

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , который связан с константным доменом легкой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVANWHTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:1).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVANHWTTPSLKCI RDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA (SEQ ID NO:19).

Аминокислотная последовательность, которая представлена SEQ ID NO:19, отличается от аминокислотной последовательности, которая представлена SEQ ID NO:1, одной аминокислотной заменой Цистеина (C) на Аланин (A) в 216 положении. Данная замена позволяет получить иммуноцитокин, который включает первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса, которые не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, который связан с константным доменом легкой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTV ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:3).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTV ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA (SEQ ID NO:21).

Аминокислотная последовательность, которая представлена SEQ ID NO:21, отличается от аминокислотной последовательности, которая представлена SEQ ID NO:3, одной аминокислотной заменой Цистеина (C) на Аланин (A) в 233 положении. Данная замена позволяет получить иммуноцитокин, который включает первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса, которые не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, которые соединены через шарнир.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15 или IL-15R α , который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела, идущими в следующем порядке CH1-шарнир-CH2-CH3.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVANHWTTPSLKCI RDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKGPSVFPLAPSSKSTS

GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID
NO:6).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15R α , связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVANHTTPSLKCI
RDPALVHQRPAPPSTVITAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKRVEPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID
NO:24).

Аминокислотная последовательность, которая представлена SEQ ID NO:24, отличается от аминокислотной последовательности, которая представлена SEQ ID NO:6, одной аминокислотной заменой Цистеина (C) на Аланин (A) в 212 положении. Данная замена позволяет получить иммуноцитокин, который включает первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса, которые не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTV
ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVTVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
SLSLSP (SEQ ID NO:5).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает IL-15, связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTV
ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVTVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
SLSLSP (SEQ ID NO:23).

Аминокислотная последовательность, которая представлена SEQ ID NO:23, отличается от аминокислотной последовательности, которая представлена SEQ ID NO:5, одной аминокислотной заменой Цистеина (C) на Аланин (A) в 229 положении. Данная замена позволяет получить

иммуноцитокин, который включает первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса, которые не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает иммуномодулирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически ингибируют PD-1 путь, и представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

Специфическое связывание можно определять количественно, например, определяя связывание молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы. Например, специфическое связывание можно определять конкурентной реакцией с другой молекулой, аналогичной мишени, например, с избытком немеченой мишени. В этом случае специфическое связывание указывается, если связывание меченой мишени с зондом конкурентно ингибируется избытком немеченой мишени. В данном описании термин «специфическое связывание» или выражения «специфически связывается с» или «специфический к» конкретному полипептиду или эпитопу на конкретном полипептиде-мишени можно характеризовать на примере молекулы, имеющей Kd к мишени по меньшей мере около 200 нМ, или же по меньшей мере около 150 нМ, или же по меньшей мере около 100 нМ, или же по меньшей мере около 60 нМ, или же по меньшей мере около 50 нМ, или же по меньшей мере около 40 нМ, или же по меньшей мере около 30 нМ, или же по меньшей мере около 20 нМ, или же по меньшей мере около 10 нМ, или же по меньшей мере около 8 нМ, или же по меньшей мере около 6 нМ, или же по меньшей мере около 4 нМ, или же по меньшей мере около 2 нМ, или же по меньшей мере около 1 нМ или выше. В одном варианте изобретения термин «специфическое связывание» относится к связыванию, при котором молекула связывается с конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде, практически не связываясь с каким-либо другим полипептидом или эпитопом на полипептиде.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает иммуномодулирующее антитело, которое включает:

а) легкую цепь, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи;

б) тяжелую цепь, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает вариабельный домен легкой цепи, который включает LCDR 1, 2 и 3 (гипервариабельные участки 1, 2 и 3), которые, соответственно представлены аминокислотными последовательностями GGNNIGSKNVH (SEQ ID NO: 14), RDSNRPS (SEQ ID NO: 15) и CQVWDSSTAV (SEQ ID NO: 16).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает вариабельный домен легкой цепи, который включает аминокислотную последовательность, которая представлена QPVLTLQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSNRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISRAGDEADYYCQVWDSSTAVFGTGTKLTVLQ (SEQ ID NO: 18).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает переменный домен тяжелой цепи, который включает HCDR 1, 2 и 3 (гиперпеременные участки 1, 2 и 3), которые, соответственно представлены аминокислотными последовательностями FTFSSYWMY (SEQ ID NO: 11), AIDTGGGRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 12) и CARDEGGGTGWGVLDKWPYGLDA (SEQ ID NO: 13).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает переменный домен тяжелой цепи, который включает аминокислотную последовательность, которая представлена QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLEWVSAIDTGGGRTYYADSV KGRFAISRVRNAKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGGGTGWGVLDKWPYGLDAWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 17).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

1) переменный домен легкой цепи, который включает LCDR 1, 2 и 3 (гиперпеременные участки 1, 2 и 3), которые, соответственно представлены аминокислотными последовательностями GGNIGSKNVH (SEQ ID NO: 14), RDSNRPS (SEQ ID NO: 15) и CQVWDSSTAV (SEQ ID NO: 16);

2) переменный домен тяжелой цепи, который включает HCDR 1, 2 и 3 (гиперпеременные участки 1, 2 и 3), которые, соответственно представлены аминокислотными последовательностями FTFSSYWMY (SEQ ID NO: 11), AIDTGGGRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 12) и CARDEGGGTGWGVLDKWPYGLDA (SEQ ID NO: 13).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

1) переменный домен легкой цепи, который включает аминокислотную последовательность, которая представлена QPVLTLQPLSVSVALGQTARITCGGNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLIYRDSNRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISRAGAGDEADYYCQVWDSSTAVFGTGTCLTVLQ (SEQ ID NO: 18);

2) переменный домен тяжелой цепи, который включает аминокислотную последовательность, которая представлена QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLEWVSAIDTGGGRTYYADSV KGRFAISRVRNAKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGGGTGWGVLDKWPYGLDAWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 17).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает иммуномодулирующее антитело, которое включает легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена QPVLTLQPLSVSVALGQTARITCGGNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLIYRDSNRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISRAGAGDEADYYCQVWDSSTAVFGTGTCLTVLQRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO 8).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает иммуномодулирующее антитело, которое включает тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLEWVSAIDTGGGRTYYADSV KGRFAISRVRNAKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGGGTGWGVLDKWPYGLDAWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHCTCPPEAAGGSPVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSP (SEQ ID NO 7).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает иммуномодулирующее антитело, которое включает:

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWRQVPGKGLEWVSAIDTGGGRYYADSV
KGRFAISRVAKNMTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGGGTGWGVLKDWPGYGLDAWGQGTLLTVTS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
TQKSLSLSP (SEQ ID NO 7);

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена

QPVLTLQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLIYRDSNRPSGIPERFSGS
NSCNTATLTISRAGDEADYYCQVWDSSTAVFGTGTCLTVLQRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO 8).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает иммуномодулирующее антитело пролголимаб (BCD100, WO2018013017).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает иммуномодулирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически ингибируют PD-1 путь, которое представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах антитело, которое специфически связывается с PD-L1 представляет собой BCD135, которое описано в патенте RU2665790 (WO2018194496).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

а) гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α , который содержит:

IL-15R α , связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVHWTTPSLKCI
RDPALVHQRPAPPSTVTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:1), а

IL-15, связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLESGLDASIHDTV
ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
SLSLSP (SEQ ID NO:5);

б) иммуномодулирующее антитело, которое включает:

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWRQVPGKGLEWVSAIDTGGGRYYADSV
KGRFAISRVAKNMTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGGGTGWGVLKDWPGYGLDAWGQGTLLTVTS

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
TQKSLSLSP (SEQ ID NO 7);

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена
QPVLTPQLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLIYRDSNRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISRAGDEADYYCQVWDSSTAVFGTGTCLTVLQRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO 8).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

а) гетеродимерный белковый комплекс на основе IL-15 и IL-15R α , который содержит:

IL-15R α , связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена
DTCPPPMSEVHADIWKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI
RDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPELSLSPSGKEPAASSGAEGGRTVAAPSVFI FPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:19), а

IL-15, связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHDTV
ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
SLSLSP (SEQ ID NO:23);

б) иммуномодулирующее антитело, которое включает:

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYVWRQVPGKLEWVSAIDTGGGRTYYADSV
KGRFAISRNVAKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGGGTGWGVLDWPGYGLDAWGQGTILTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
TQKSLSLSP (SEQ ID NO 7);

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена
QPVLTPQLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLIYRDSNRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISRAGDEADYYCQVWDSSTAVFGTGTCLTVLQRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO 8).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

а) IL-15R α , связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая

представлена

DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWHTPSLKCI
RDPALVHQRPAPPSTVITAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID
NO:6), а

IL-15, связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая представлена

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTV
ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:3);

б) иммуномодулирующее антитело, которое включает:

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая

представлена
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYVVRQVPGKLEWVSAIDTGGGRYYADSV
KGRFAISRVAKNMTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGGGTGWGVLKDWPYGLDAWGQGLTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP
PKPKDTLMISRTPEVTCVTVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
TQKSLSLSP (SEQ ID NO 7);

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая

представлена
QPVLTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLIYRDSNRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISRAGDEADYYCQVWDSSTAVFGTGTCLTVLQRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO 8).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

а) IL-15R α , связанный с константными доменами тяжелой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая

представлена
DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWHTPSLKCI
RDPALVHQRPAPPSTVITAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKRVEPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID
NO:24), а

IL-15, связанный с константным доменом легкой цепи антитела, которые имеют аминокислотную последовательность, которая

представлена
DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTV
ENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSAGGKPGGSAGGRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA (SEQ ID NO:21);

б) иммуномодулирующее антитело, которое включает:

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLEWVSAIDTGGGRITYYADSV
KGRFAISRNVNAKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGGGTGWGVLKDWPYGLDAWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
TQKSLSLSP (SEQ ID NO 7);

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая представлена

QPVLTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLIYRDSNRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISRAGDEADYYCQVWDSSTAVFGTGTCLTVLQRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO 8).

В некоторых вариантах иммуноцитокин имеет мутации в константных доменах антитела, обуславливающие гетеродимеризацию двух разных частей, одна из которых включает ковалентно или нековалентно ассоциированные IL-15R α , связанный с константными доменами антитела, и IL-15, связанный с константным доменом антитела, а другая включает ковалентно или нековалентно ассоциированные легкую и тяжелую цепи антитела.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает:

первый мономер Fc и второй мономер Fc, которые выбраны из группы: первый мономер Fc представляет собой Fc, модифицированный с образованием Knob, а второй мономер Fc представляет собой Fc, модифицированный с образованием Hole, или когда второй мономер Fc представляет собой Fc, модифицированный с образованием Knob, а первый мономер Fc представляет собой Fc, модифицированный с образованием Hole.

«knobs -into-holes» (взаимодействие по типу «выступ-впадина») это подход, с помощью которого можно обойти проблему, связанную с имеющимися ошибочные спаривания побочными продуктами. Данный подход направлен на усиление спаривания двух различных тяжелых цепей антитела путем интродукции мутаций в CH3-домены для модификации поверхности раздела в области контакта. На одной цепи имеющие большие размеры аминокислоты заменяли на аминокислоты с короткими боковыми цепями для создания «впадины». И, наоборот, аминокислоты с более крупными боковыми цепями интродуцировали в другой CH3-домен, создавая «выступ». Путем совместной экспрессии этих двух тяжелых цепей получали высокий выход гетеродимерной формации («выступ-впадина») относительно гомодимерной формации («впадина-впадина» или «выступ-выступ») (Ridgway J.B., Presta L.G., Carter P. и WO 1996/027011). Процентное содержание гетеродимера можно дополнительно повышать путем ремоделирования поверхностей раздела двух CH3-доменов с помощью технологии фагового дисплея и интродукции дисульфидного мостика для стабилизации гетеродимеров (Merchant A.M. и др., Nature Biotech 16, 1998, сс.677-681; Atwell S., Ridgway J.B., Wells J.A., Carter P., J Mol Biol 270, 1997, сс.26-35).

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает первый мономер Fc, который имеет аминокислотные замены S354C/T366W, и второй

мономер Fc, который имеет аминокислотные замены Y349C/T366S/L368A/Y407V.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает первый мономер Fc, который имеет аминокислотные замены Y349C/T366S/L368A/Y407, и второй мономер Fc, который имеет аминокислотные замены S354C/T366W.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает Fc-фрагмент, который относится к IgG.

В некоторых вариантах иммуноцитокин, где изотип Fc-фрагмента выбирают из группы: IgG1, IgG2, или IgG4 человека.

В некоторых вариантах иммуноцитокин включает мутации в мономере Fc-фрагмента, приводящие к отсутствию ADCC, CDC и/или ADCCP свойств у указанного иммуноцитокина.

Под биспецифическим IL15 суперагонистом или биспецифическим IL15 иммуноцитоксином или иммуноцитоксином anti-PD1/IL15SA (биспецифическое моноклональное антитело, содержащее IL-15SA и Fab фрагмент к PD-1) также подразумевается:

Anti-PD-1 Fab-CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcknobLALA,

Anti-PD-1 Fab- CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcknobLALA.

Под иммуноцитоксином anti-PD-L1/IL15SA также подразумевается:

Anti-PD-L1 Fab-CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcknobLALA,

Anti-PD-L1 Fab- CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcknobLALA.

Обозначения Anti-PD-1 Fab, Anti-PD-L1 Fab, CK, IL15Ra, IL15, CH1FcknobLALA имеют расшифровку по тексту заявки.

Anti-PD-1 Fab-CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcknobLALA - это вышеуказанный иммуноцитокин, включающий антигенсвязывающий фрагмент Fab антитела к PD1, IL15Ra, который связан с константным доменом легкой цепи антитела CK и IL15, который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела, включающими первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, где Fc содержит мутации для образования гетеродимеризации (например, knob) и LALA.

Anti-PD-1 Fab- CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcknobLALA - это вышеуказанный иммуноцитокин, включающий антигенсвязывающий фрагмент Fab антитела к PD1, IL15, который связан с константным доменом легкой цепи антитела CK и IL15Ra, который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела, включающими первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, где Fc содержит мутации для образования гетеродимеризации (например, knob) и LALA.

Anti-PD-L1 Fab-CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcknobLALA - это вышеуказанный иммуноцитокин, включающий антигенсвязывающий фрагмент Fab антитела к PD-L1, IL15Ra, который связан с константным доменом легкой цепи антитела CK и IL15, который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела, включающими первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, где Fc содержит мутации для образования гетеродимеризации (например, knob) и LALA.

Anti-PD--L1 Fab- CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcknobLALA - это вышеуказанный иммуноцитокин, включающий антигенсвязывающий

фрагмент Fab антитела к PD-L1, IL15, который связан с константным доменом легкой цепи антитела СК и IL15Ra, который связан с константными доменами тяжелой цепи антитела, включающими первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, где Fc содержит мутации для образования гетеродимеризации (например, knob) и LALA.

Вышеуказанные иммуноцитокнины могут быть выполнены как в формате, где первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик, так и в формате, где первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик, в частном случае для этого оба цистеина заменяют на аланин.

При экспериментальных исследованиях вышеуказанных иммуноцитокнинов как формате, где первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик, так и в формате, где первый константный домен тяжелой цепи антитела и константный домен легкой цепи антитела в составе гетеродимерного комплекса не имеют ковалентную ассоциацию через природный S-S мостик, не было выявлено какой-либо значительной разницы в активности вышеуказанных цитокинов.

Под knob, который указан выше, подразумеваются мутации с образованием структуры «выступ (Knob) во впадину (Hole)» между первым вариантом Fc и вторым вариантом Fc в CH3 домене.

Формат вышеуказанного иммуноцитокнина представлен на фигурах 3 и 4.

В некоторых вариантах иммуноцитокнин применяют для лечения онкологического или аутоиммунного заболевания.

В некоторых вариантах иммуноцитокнин применяют для лечения онкологического заболевания.

Нуклеиновая кислота

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, которая кодирует любой из вышеуказанных иммуноцитокнинов.

Термины «нуклеиновая кислота», «нуклеиновая последовательность» или «нуклеиновокислотная последовательность», «полинуклеотид», «олигонуклеотид», «полинуклеотидная последовательность» и «нуклеотидная последовательность», которые используются равнозначно в данном описании, обозначают четкую последовательность нуклеотидов, модифицированных или не модифицированных, определяющую фрагмент или участок нуклеиновой кислоты, содержащую или не содержащую неприродные нуклеотиды и являющуюся либо двухцепочечной ДНК или РНК, либо одноцепочечной ДНК или РНК, либо продуктами транскрипции указанных ДНК.

Здесь также следует упомянуть, что данное изобретение не относится к нуклеотидным последовательностям в их природной хромосомной среде, т.е. в природном состоянии. Последовательности данного изобретения были выделены и/или очищены, т.е. были взяты прямо или косвенно, например, путем копирования, при этом их среда

была по меньшей мере частично модифицирована. Таким образом, также здесь следует подразумевать изолированные нуклеиновые кислоты, полученные путем генетической рекомбинации, например, с помощью принимающих клеток (клеток-хозяев), или полученные путем химического синтеза.

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена от по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты-примеси, с которой она обычно связана в естественном источнике. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от той формы или набора, в которых она находится в естественных условиях. Таким образом, выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от молекулы нуклеиновой кислоты, существующей в клетках в естественных условиях. Однако выделенная молекула нуклеиновой кислоты включает молекулу нуклеиновой кислоты, находящуюся в клетках, в которых в норме происходит экспрессия иммуноцитокина, например, в случае, если молекула нуклеиновой кислоты имеет локализацию в хромосоме, отличную от ее локализации в клетках в естественных условиях.

В некоторых вариантах нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

В одном из вариантов настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24. Молекула нуклеиновой кислоты может также содержать любую комбинацию указанных выше нуклеотидных последовательностей.

Специалисту в данной области будет очевидно, что пептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24, может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

Экспрессионный вектор

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, который содержит вышеуказанную нуклеиновую кислоту.

Термин «вектор» при использовании в настоящем документе означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой плазмиду, т.е. кольцевую двухцепочечную часть ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы,

имеющие бактериальный сайт инициации репликации и эписомные векторы млекопитающих). В других вариантах осуществления изобретения векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и таким образом реплицируются вместе с геном хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально соединены. Такие векторы упоминаются в данном документе как «рекомбинантные экспрессирующие векторы» (или просто «экспрессирующие векторы»).

Настоящее изобретение относится к векторам, содержащим вышеуказанные молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют любую из аминокислотных последовательностей вышеуказанного иммуноцитокина или его конструктивных частей как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммуноцитокин по данному изобретению экспрессируется путем вставки ДНК, кодирующей частично или полностью последовательность первого и второго домена иммуноцитокина (например, домена, включающего IL15 или IL15R α , связанного с константным (-ыми) доменом (-ами) антитела и/или легкую и тяжелую цепь антитела), полученный, как описано выше, в экспрессионных векторах таким образом, что гены функционально соединены с необходимыми последовательностями, контролирующими экспрессию, такими как транскрипционные и трансляционные контрольные последовательности. Экспрессионные векторы включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирусы табачной мозаики, космиды, YAC, EBV полученные эписомы и тому подобное. Молекулы ДНК могут быть лигированы в вектор таким образом, что последовательности, контролирующие транскрипцию и трансляцию в векторе, выполняют предусмотренную функцию регуляции транскрипции и трансляции ДНК. Экспрессионный вектор и последовательности контроля экспрессии могут быть выбраны таким образом, чтобы быть совместимыми с используемой экспрессирующей клеткой-хозяином. Молекулы ДНК, кодирующие частично или по всей длине последовательности первого и второго связывающих доменов (например, последовательности тяжелой и легкой цепи, где связывающий домен содержит последовательность тяжелой и легкой цепи) могут быть введены в отдельные векторы. В одном варианте осуществления изобретения любая комбинация указанных выше молекул ДНК вводится в тот же экспрессионный вектор. Молекулы ДНК могут быть введены в экспрессионный вектор стандартными способами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена антитела и вектора или лигированием тупых концов, если сайты рестрикции отсутствуют).

Подходящим вектором является тот, который кодирует функционально законченные последовательности СН или CL/СК человеческого иммуноглобулина с конструированием соответствующего места рестрикции так, что любая последовательность VH или VL или IL15 или IL15R α , может быть легко включена и экспрессирована, как описано выше. НС- и LC-кодирование генов в таких векторах может содержать интронные последовательности, что приводит к общему увеличению белковых продуктов антитела путем стабилизации

соответствующей мРНК. Интронные последовательности находятся в окружении сплайс-донора и сплайс-акцептора сайтов, которые определяют, где будет происходить сплайсинг РНК. Расположение интронных последовательностей может быть либо в переменных или константных участках цепей антитела, или как в переменных, так и константных участках, когда используются несколько интронов. Прекращение полиаденилирования и транскрипции может произойти вниз по ходу сайта нативной хромосомы кодируемых участков. Рекомбинантный экспрессионный вектор также может кодировать сигнальный пептид, который облегчает выработку цепочки антитела клеткой-хозяином. Ген цепочки антитела или ген цепочки, включающий IL15 или IL15R α , может быть клонирован в вектор таким образом, что сигнальный пептид соединен с рамкой считывания аминоконца цепи иммуноглобулина. Сигнальным пептидом может быть сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (то есть, сигнальный пептид белка не иммуноглобулиновой природы).

Помимо цепочки генов антител или гена цепочки, включающей IL15 или IL15R α , рекомбинантная экспрессия векторов по данному изобретению может нести регулирующие последовательности, которые контролируют экспрессию генов в клетке-хозяине. Специалистам в этой области будет понятно, что дизайн экспрессионного вектора, включая выбор регулирующих последовательностей, может зависеть от таких факторов, как селекция клетки-хозяина для трансформации, уровень экспрессии желаемого белка, и т.д. Предпочтительные регулирующие последовательности для экспрессирующей клетки-хозяина млекопитающих включают вирусные элементы обеспечивающие высокий уровень экспрессии белков в клетках млекопитающих, таких как промоторы и/или энхансеры, полученные из ретровирусной LTR, цитомегаловируса (CMV) (например, CMV промотора/энхансера), обезьяньего вируса 40 (SV40) (например, SV40 промотора/энхансера), аденовируса, (например, большого позднего промотора аденовируса (AdMLP)), вирус полиомы, а также сильных промоторов млекопитающих, таких как промотор нативных иммуноглобулинов или промотор актина. Для дальнейшего описания вирусных регулирующих элементов и их последовательностей см., например, патенты США 5,168,062, 4,510,245 and 4,968,615. Методы экспрессии полипептидов в бактериальных клетках или клетках грибов, например, дрожжевых клетках, также хорошо известны в данной области техники.

В дополнение к вышеуказанным генам и регулирующим последовательностям, рекомбинантные векторы экспрессии изобретения могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и гены селективируемого маркера. Ген селективируемого маркера облегчает селекцию клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США 4,399,216, 4,634,665 и 5,179,017). Например, обычно ген селективируемого маркера придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую вектор введен. Например, гены селективируемого маркера включают ген дигидрофолат редуктазы (DHFR) (для использования в dhfr-клетках-хозяевах при селекции/амплификации метотрексата), ген нео (для селекции G418) и ген синтетазы глутамата.

Термин «последовательность контроля экспрессии», используемый в данном описании, означает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для воздействия на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, к которым они лигированы. Контролирующие экспрессию последовательности включают соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминации, промотора и энхансера; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сплайсинг и сигналы полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию белка. Характер таких контролирующих последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина; в прокариотах такие контролирующие последовательности, как правило, включают промотор, сайт связывания рибосомы, а также последовательности терминации транскрипции; в эукариотах, как правило, такие контролирующие последовательности включают промоторы и последовательности терминации транскрипции. Термин «контролирующие последовательности» включает, как минимум, все компоненты, наличие которых имеет важное значение для экспрессии и процессинга, и может также включать дополнительные компоненты, чье присутствие является полезным, например, лидирующие последовательности и последовательности слившихся клеток.

Выражение «контролирующие последовательности» относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в определенном организме-хозяине. Пригодные для прокариот контролирующие последовательности представляют собой, например, промотор, необязательно оператор и сайт связывания рибосомы. Как известно, в эукариотических клетках присутствуют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота «функционально связана», если она находится в функциональной связи с другой нуклеотидной последовательностью. Например, ДНК предпоследовательности или секреторной лидерной последовательности функционально связывают с ДНК полипептида, если он экспрессируется в виде предпротеина, который принимает участие в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связывают с кодирующей последовательностью, если он оказывает воздействие на транскрипцию последовательности; сайт связывания рибосомы функционально связывают с кодирующей последовательностью, если он расположен так, что может облегчать трансляцию. Как правило, «функционально связан» обозначает, что связанные последовательности ДНК являются смежными, а в случае секреторной лидерной последовательности являются смежными и находятся в фазе считывания. Однако энхансеры не обязательно должны быть смежными.

Клетки-хозяева и способ их получения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения клетки-хозяина для получения вышеуказанного иммуноцитокина, который включает трансформирование клетки вышеуказанным вектором.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие иммуноцитокينات по изобретению и векторы, содержащие эти молекулы нуклеиновой кислоты, могут быть использованы для трансфекции подходящего млекопитающего или его клетки, растения или его клетки, бактериальной или дрожжевой клетки-хозяина. Преобразование может происходить любым известным способом для введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают декстран-опосредованную трансфекцию, трансфекцию комплексом нуклеиновой кислоты и позитивно заряженного полимера, трансфекцию преципитатом нуклеиновой кислоты и фосфата кальция, полибрен-опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, трансфекцию инкапсулированными в липосомы полинуклеотидами и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. В дополнение, молекулы нуклеиновых кислот могут быть введены в клетки млекопитающих вирусными векторами. Способы трансфекции клеток хорошо известны в данной области техники. См., например, патенты США, 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461 и 4,959,455. Способы трансформации клеток растений хорошо известны в данной области, включая, например, *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию, биолистическую трансформацию, прямую инъекцию, электропорацию и вирусную трансформацию. Методы трансформации клеток бактерий и дрожжей также хорошо известны в данной области.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к клетке-хозяину для получения вышеуказанного иммуноцитокина, которая содержит вышеуказанную нуклеиновую кислоту.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения препарата, содержащего вышеуказанный иммуноцитокин, который заключается в культивировании вышеуказанной клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, достаточных для получения указанного иммуноцитокина, при необходимости, с последующим выделением и очисткой полученного иммуноцитокина.

Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») при использовании в данном документе означает клетку, в которую введен рекомбинантный экспрессионный вектор. Настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, которые могут включать, например, вектор в соответствии с настоящим изобретением, описанным выше. Настоящее изобретение относится также к клеткам-хозяевам, которые включают, например, нуклеотидную последовательность, кодирующую иммуноцитокин или его вышеуказанные части по данному изобретению. Следует понимать, что «рекомбинантная клетка-хозяин» и «клетка-хозяин» означают не только конкретную заявленную клетку, но также и потомство такой клетки. Поскольку модификации могут проходить в последующих поколениях вследствие мутации или воздействий окружающей среды, такое потомство не может, на самом деле, быть идентичным родительской клетке, но такие клетки по-прежнему включены в объем термина «клетка-хозяин» при использовании в настоящем документе.

Клеточные линии млекопитающих, используемые в качестве хозяев для трансформации, хорошо известны в данной области и включают множество иммортализованных доступных клеточных линий. К ним относятся, например, клетки яичников китайского хомячка (CHO), NS0 клетки, клетки SP2, HEK-293T клетки, 293 Фристайл клетки

(Invitrogen), NIH-3T3 клетки, клетки HeLa, клетки почек хомячка (BHK), клетки почек африканских зеленых мартышек (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Нер G2), A549 клетки и ряд других клеточных линий. Клеточные линии выбираются путем определения, какие клеточные линии имеют высокие уровни экспрессии и обеспечивают необходимые характеристики продуцируемого белка. Другими клеточными линиями, которые могут быть использованы, являются клеточные линии насекомых, такие как Sf9 или Sf21 клетки. Когда векторы рекомбинантной экспрессии, кодирующие иммуноцитокин по изобретению или его часть, вводятся в клетки-хозяева млекопитающих, иммуноцитокينات продуцируются путем культивирования клеток-хозяев в течение времени, достаточного для экспрессии иммуноцитокина или его части по изобретению в клетках-хозяевах или, предпочтительнее, выделения иммуноцитокина в питательную среду, в которой выращиваются клетки-хозяева. Иммуноцитокينات могут быть выделены из питательной среды с использованием стандартных методов очистки белка. Клетки-хозяева растений, например, включают *Nicotiana*, *Arabidopsis*, ясню, кукурузу, пшеницу, картофель и т.д. Клетки бактерий хозяина включают виды *Escherichia* и *Streptomyces*. Дрожжевые клетки-хозяева включают *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

Кроме того, уровень продукции иммуноцитокина по данному изобретению из продуцирующей клеточной линии можно усилить с помощью ряда известных методов. Например, система экспрессии гена глутамин синтетазы (система GS) является достаточно распространенной для усиления экспрессии при определенных условиях. Система GS обсуждается в целом или частично в связи с патентами EP 0216846, 0256055, 0323997 и 0338841.

Вполне вероятно, что иммуноцитокин или его часть по изобретению в различных клеточных линиях или клетках-хозяевах будут отличаться друг от друга профилем гликозилирования. Однако иммуноцитокин, описанный в данном документе, или его часть (домен), содержащая аминокислотные последовательности, приведенные в настоящем документе, являются частью данного изобретения, независимо от состояния гликозилирования связывающих молекул и в целом, независимо от наличия или отсутствия пост-трансляционных модификаций.

Фармацевтическая композиция

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для стимулирования активации и/или пролиферации IL-15R β /гамма-положительных клеток, которая содержит вышеуказанный иммуноцитокин в терапевтически эффективном количестве, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

«Фармацевтическая композиция» обозначает композицию, включающую в себя иммуноцитокин, согласно изобретению и, по крайней мере, один из компонентов, выбранных из группы, состоящей из фармацевтически приемлемых и фармакологически совместимых эксципиентов, таких как наполнители, растворители, разбавители, носители, вспомогательные, распределяющие, средства доставки, консерванты, стабилизаторы, эмульгаторы, суспендирующие агенты,

загустители, регуляторы пролонгированной доставки, выбор и соотношение которых зависит от природы и способа назначения и дозировки. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению и способы их изготовления будут бесспорно очевидными для специалистов в этой области. Производство фармацевтических композиций предпочтительно должно соответствовать требованиям GMP (надлежащей производственной практики). Композиция может включать буферную композицию, тонические агенты, стабилизаторы и солюбилизаторы. Пролонгированное действие композиции может быть обеспечено с помощью агентов, замедляющих абсорбцию активного фармацевтического ингредиента, например, моностеарат алюминия и желатин. Примерами подходящих носителей, растворителей, разбавителей и средств доставки являются вода, этанол, полиспирты, а также их смеси, масла и инъекционные органические сложные эфиры.

«Терапевтически эффективным количеством» считается количество вводимого в процессе лечения терапевтического агента, которое избавит в определенной степени от одного или нескольких симптомов заболевания, по поводу которого проводится лечение.

«Лекарственное средство (препарат)» – вещество или смесь веществ в виде фармацевтической композиции в виде таблеток, капсул, порошков, лиофилизатов, инъекций, инфузий, мазей и др. готовых форм, предназначенное для восстановления, исправления или изменения физиологических функций у человека и животных, а также для лечения и профилактики болезней, диагностики, анестезии, контрацепции, косметологии и прочего. Любой способ введения пептидов, белков или антител, принятый в данной области, может соответствующим образом использоваться для иммуноцитокина по данному изобретению.

Термин «фармацевтически приемлемый» означает один или несколько совместимых жидких или твердых компонентов, которые подходят для введения млекопитающему, предпочтительно человеку.

Термин «эксципиент» или «вспомогательное вещество» используется в данном документе для описания любого компонента, отличающегося от ранее описанных по данному изобретению. Это вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств.

Под термином «буфер», «буферная композиция», «буферный агент» понимается раствор, способный сохранять значение pH, благодаря взаимодействию кислотных и щелочных компонентов, входящих в его состав, который дает возможность препарату иммуноцитокина по изобретению проявлять устойчивость к изменениям pH. В общем случае, преимущественными являются значения pH фармацевтической композиции от 4,0 до 8,0. В качестве буферных агентов могут быть использованы, например, ацетатный, фосфатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный и т.п. буферные растворы, но, не ограничиваясь ими.

Термины «тонический агент», «осмолитик» или «осмотический агент» в том виде, как они здесь использованы, относятся к эксципиенту, который может подводить осмотическое давление жидкого препарата антитела. «Изотоничный» препарат представляет собой препарат, который имеет осмотическое давление, эквивалентное давлению человеческой крови. Изотоничные препараты обычно имеют

осмотическое давление от примерно 250 до 350 мОсм/кг. В качестве изотонических агентов могут быть использованы полиолы, моно- и дисахара, аминокислоты, соли металлов, например, хлорид натрия, и т.п., но, не ограничиваясь ими.

Под «стабилизатором» понимается вспомогательное вещество или смесь двух и более вспомогательных веществ, которые обеспечивают физическую и/или химическую стабильность активного агента. В качестве стабилизаторов могут быть использованы аминокислоты, например, аргинин, гистидин, глицин, лизин, глутамин, пролин, но, не ограничиваясь ими; поверхностно-активные вещества, например, полисорбат 20 (торговое наименование Tween 20), полисорбат 80 (торговое наименование Tween 80), полиэтилен-полипропилен гликоль и его кополимеры (торговые наименования Поллоксамер (Poloxamer), Плуроник (Pluronic)), натрия додецилсульфат (SDS), но, не ограничиваясь ими; антиоксиданты, например, метионин, ацетилцистеин, аскорбиновая кислота, монотиоглицерол, соли серистых кислот, и т.п., но не ограничиваясь ими; хелатирующие агенты, например, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), диэтиленetriаминпентауксусная кислота (ДТПА), цитрат натрия и т.п., но не ограничиваясь ими.

Фармацевтическая композиция является «стабильной», если активный агент сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность в течение заявленного срока годности при температуре хранения, например, при 2–8 °С. Предпочтительно, чтобы активный агент сохранял и физическую, и химическую стабильность, а также биологическую активность. Период хранения выбирается на основании результатов исследования стабильности при ускоренном и естественном хранении.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может изготавливаться, упаковываться или широко продаваться в виде единичной стандартной дозы или множества единичных стандартных доз в виде готовой лекарственной формы. Используемый в данном документе термин «единичная стандартная доза» означает дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозировке активного ингредиента, который будет вводиться субъекту, или удобной части такой дозировки, например, половине или трети такой дозировки.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, как правило, пригодны для парентерального введения в виде стерильных лекарственных средств, предназначенных для введения в организм человека с нарушением целостности кожных покровов или слизистых оболочек, минуя желудочно-кишечный тракт путем инъекций, инфузий или имплантации. Например, предполагается, что парентеральное введение включает, помимо прочего, подкожную, внутривенную, внутримышечную, внутриаартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, интрауретральную, внутричерепную, внутрисуставную, трансдермальную инъекцию или инфузии; и почечные диализные инфузионные методики. Внутриопухолевая доставка, например, внутриопухолевая инъекция, также может быть применима. Также предусмотрена региональная перфузия. Предпочтительные варианты осуществления изобретения включают внутривенный и подкожный пути. Любой способ введения пептидов или белков,

принятый в данной области, может соответствующим образом использоваться для иммуноцитокина по данному изобретению.

Инъекционные лекарственные средства могут быть изготовлены, упакованы или проданы в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах, флаконах, полимерных контейнерах, преднаполненных шприцах, устройствах для автоинъекции, но, не ограничиваясь ими. Лекарственные средства для парентерального введения включают, помимо прочего, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных основах, пасты и тому подобное.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является лекарственное средство для парентерального введения, где фармацевтическая композиция предоставлена в сухой форме, то есть, порошка или гранул для растворения в подходящем растворителе (например, стерильной апиrogenной воде) перед введением. Такое лекарственное средство может быть получено, например, с помощью лиофилизации, т.е. процесса, известного в данной области техники как сушка из замороженного состояния, включающая в себя замораживание препарата и последующее удаление растворителя из замороженного содержимого.

Иммуноцитокин по данному изобретению может также вводиться интраназально или ингаляционно, самостоятельно, в виде смеси с подходящим фармацевтически приемлемым наполнителем из ингалятора, такого как аэрозольный контейнер под давлением, помпа, спрей, распылитель) или небулайзер, в котором используется или не используется подходящий пропеллент, или в виде назальных капель или спрея.

Лекарственное средство для парентерального введения может быть немедленного или модифицированного высвобождения. Лекарственные средства с модифицированным высвобождением включают отсроченное, замедленное, пульсирующее, контролируемое, нацеленное и программируемое высвобождение.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция применяется для лечения онкологического или аутоиммунного заболевания.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция применяется для лечения аутоиммунного заболевания.

Термин «аутоиммунное заболевание» в контексте настоящего описания обозначает не злокачественное заболевание или нарушение, возникающее и направленное против собственных (ауто) антигенов и/или тканей индивидуума.

Определение «аутоиммунного заболевания» охватывает, но без ограничения, ревматоидный артрит, артроз, ювенильный хронический артрит, септический артрит, артроз Лайма, псориатический артрит, реактивный артрит, спондилоартропатия, системная красная волчанка, болезнь Крона, язвенный колит, воспалительные заболевания кишечника, сахарный диабет, тиреоидит, астма, аллергические заболевания, псориаз, атопический дерматит, склеродермия, реакция «трансплантат против хозяина», отторжение трансплантата, острые или хронические иммунные заболевания, связанные с трансплантацией, саркоидоз, болезнь Кавасаки, болезнь Грейвса, нефротический синдром, синдром хронической усталости, гранулематоз Вегенера, пурпура Геноха-Шенлейна, микроскопический почечный васкулит, хронический активный гепатит, uvenita, септический шок, синдром токсического шока, септический синдром, кахексия, синдром

приобретенного иммунодефицита, острый поперечный миелит, хорея Гентингтона, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, инсульт, первичный билиарный цирроз, гемолитическая анемия, взрослых (острый) респираторный дистресс-синдром, алопеция, очаговая алопеция, серонегативная артропатия, артропатии, болезнь Рейтера, псориатическая артропатия, связанная с язвенным колитом артропатия, атопические аллергии, аутоиммунные Буллезные заболевания, пузырьчатка vulgaris, листовидная пузырьчатка, болезнь пемфигоида, линейные IgA, аутоиммунная гемолитическая анемия, Кумбс позитивная гемолитическая анемия, злокачественная анемия, ювенильная злокачественная анемия, артрит, первичный склерозирующий гепатит А, криптогенный аутоиммунный гепатит, фиброзирующие заболевания легких, криптогенный фиброзный альвеолит, поствоспалительные интерстициальные заболевания легких, интерстициальный пневмонит, хроническая эозинофильная пневмония chronic, постинфекционные интерстициальные заболевания легких, подагрический артрит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный гепатит I типа (классический аутоиммунный гепатит или липоид), аутоиммунный гепатит II типа, остеоартрит, первичный склерозирующий холангит, псориаз I типа, псориаз II типа, идеопатическая лейкопения, аутоиммунная нейтропения, ренальные NOS заболевания [renal NOS-disease], гломерулонефрит, микроскопический ренальный васкулит, дискоидный волчаночный эритематоз, идеопатическая или мужская NOS фертильность, [autoimmunity to sperm], все подтипы множественного склероза, симпатическая офтальмия, вторичная легочная гипертензия при заболеваниях соединительной ткани, синдром Гудпасчура, легочная манифестация узлового полиартрита, острая ревматическая лихорадка, ревматоидный спондилит, анкилозирующий спондилит, болезнь Стилла, системный склероз, синдром Шенгрена, синдром Такаясу, аутоиммунная тромбоцитопения, идиопатическая тромбоцитопения, аутоиммунный тиреоидит, гипертиреоз, болезнь Хашимото, аутоиммунный атрофический гипотиреоз, первичная мексидема, факогенный увеит, первичный васкулит, витилиго, острые заболевания печени, хронические заболевания печени, аллергии, астма, психические заболевания (включая депрессию и шизофрению), заболевания опосредованные Th2 типом и Th1 типом, конъюнктивиты, аллергические контактные дерматиты, аллергические риниты, дефицит альфа-1-антитрипсина, амиотрофический латеральный склероз, анемия, цистический фиброз, заболевания ассоциированные с цитокиновой терапией, демиелизирующие заболевания, дерматиты, иридоциклит/увеит/оптический неврит, повреждение ишемической реперфузии, ишемический инсульт, ювенильный ревматоидный артрит, аутоиммунная энтеропатия, аутоиммунная потеря слуха, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, аутоиммунный миокардит, аутоиммунная преждевременная недостаточность яичника и блефарит.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция применяется для лечения онкологического заболевания.

Термины «онкологическое заболевание», «рак» или «раковый» относятся к физиологическому состоянию или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым(/-ой) ростом/пролиферацией клеток. Примеры онкологических заболеваний включают, но без ограничения,

карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких раковых заболеваний включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка, включая рак ЖКТ, рак поджелудочной железы, глиобластому, глиому, цервикальный рак, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия и матки, карциному слюнных желез, рак почки (почечноклеточную карциному), рак предстательной железы (рак простаты), рак наружных женских половых органов, рак щитовидной железы, печеночную карциному, карциному анального канала, карциному пениса, меланому и различные типы рака головы и шеи.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция применяется для лечения онкологического заболевания, которое выбирают из группы: ПРГШ (плоскоклеточный рак головы и шеи), рак шейки матки, рак без выявленного первоисточника, глиобластома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, ТНRMЖ (трижды негативный рак молочной железы), KPP (колоректальный рак), гепатоцеллюлярная карцинома, меланома, HMPJ (Немелкоклеточный рак легкого), рак почки, рак яичника, MSI KPP (колоректальный рак с высокой микросателлитной нестабильностью), лейкоз (острый или миелобластный), лимфома, множественная миелома, меланома, рак молочной железы, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, саркома, гепатоцеллюлярная карцинома, глиобластома, лимфома Ходжкина, Т- и В-клеточном острый лимфобластный лейкоз, мелкоклеточный рак лёгкого, острый миелобластный лейкоз, рефрактерная В-клеточная неходжкинская лимфома, фолликулярная лимфома, В-клеточная лимфома маргинальной зоны, крупноклеточная В-клеточной диффузная лимфома, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак яичника, острый миелобластный лейкоз и миелодиспластический синдром высокого риска.

Термин «антипролиферативное действие» подразумевает остановку или ингибирование роста пролиферирующих клеток, таких как раковые клетки.

Термин «IC₅₀» (50% ингибирующая концентрация) относится к концентрациям препарата, при которых измеряемая активность или отклик, например, рост или пролиферация клеток, таких как опухолевые клетки, ингибируется на 50%. Значение IC₅₀ может оцениваться с помощью соответствующих кривых зависимости от ответа от логарифма дозы, с использованием специальных статистических программ для обработки кривых.

Термин GI₅₀ (50% ингибирование роста) относится к концентрациям препарата, при которых пролиферация клеток, таких как опухолевые клетки, ингибируется на 50%.

Термин ED₅₀ (EC₅₀) (50% эффективная доза/концентрация) относится к концентрациям препарата, при которых измеряемый биологический эффект достигается на 50% (может включать цитотоксичность).

Способ лечения/Применение для лечения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения онкологического заболевания, который включает введение

субъекту, нуждающемуся в таком лечении, вышеуказанного иммуноцитокина или вышеуказанной фармацевтической композиции в терапевтически эффективном количестве.

«Лечить», «лечение» и «терапия» относятся к методу смягчения или устранения биологического расстройства и/или по меньшей мере одного из сопутствующих ему симптомов. Используемый в данном документе, термин «облегчить» болезнь, заболевание или состояние, означает уменьшение тяжести и/или частоты возникновения симптомов заболевания, расстройства или состояния. Кроме того, содержащиеся в данном документе ссылки на «лечение» включает ссылки на лечебную, паллиативную и профилактическую терапию.

В одном аспекте субъект лечения или пациент является млекопитающим, предпочтительно человеческим субъектом. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола любого возраста.

Термин «заболевание» означает любое состояние, которое можно улучшить в результате лечения по настоящему изобретению. В определение данного термина входят хронические и острые нарушения или заболевания.

В некоторых вариантах способа лечения, онкологическое заболевание выбрано из группы: ПРГШ (плоскоклеточный рак головы и шеи), рак шейки матки, рак без выявленного первоисточника, глиобластома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, ТНРМЖ (трижды негативный рак молочной железы), КРР (колоректальный рак), гепатоцеллюлярная карцинома, меланома, НМРЛ (Немелкоклеточный рак легкого), рак почки, рак яичника, MSI КРР (колоректальный рак с высокой микросателлитной нестабильностью), лейкоз (острый или миелобластный), лимфома, множественная миелома, меланома, рак молочной железы, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, саркома, гепатоцеллюлярная карцинома, глиобластома, лимфома Ходжкина, Т- и В-клеточном острый лимфобластный лейкоз, мелкоклеточный рак лёгкого, острый миелобластный лейкоз, рефрактерная В-клеточная неходжкинская лимфома, фолликулярная лимфома, В-клеточная лимфома маргинальной зоны, крупноклеточная В-клеточной диффузная лимфома, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак яичника, острый миелобластный лейкоз и миелодиспластический синдром высокого риска.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу активации биологической активности Т клеточной популяции или NK клеточной популяции у субъекта, нуждающегося в такой активации, который включает введение субъекту эффективного количества вышеуказанного иммуноцитокина или вышеуказанной фармацевтической композиции.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению вышеуказанного иммуноцитокина или вышеуказанной фармацевтической композиции для лечения у субъекта, нуждающегося в таком лечении, онкологического заболевания.

В некоторых вариантах применения, онкологическое заболевание выбрано из группы: ПРГШ (плоскоклеточный рак головы и шеи), рак шейки матки, рак без выявленного первоисточника, глиобластома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, ТНРМЖ (трижды негативный рак молочной железы), КРР (колоректальный рак), гепатоцеллюлярная

карцинома, меланома, НМРЛ (Немелкоклеточный рак легкого), рак почки, рак яичника, MSI KPP (колоректальный рак с высокой микросателлитной нестабильностью), лейкоз (острый или миелобластный), лимфома, множественная миелома, меланома, рак молочной железы, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, саркома, гепатоцеллюлярная карцинома, глиобластома, лимфома Ходжкина, Т- и В-клеточном острый лимфобластный лейкоз, мелкоклеточный рак лёгкого, острый миелобластный лейкоз, рефрактерная В-клеточная неходжкинская лимфома, фолликулярная лимфома, В-клеточная лимфома маргинальной зоны, крупноклеточная В-клеточной диффузная лимфома, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак яичника, острый миелобластный лейкоз и миелодиспластический синдром высокого риска.

В случае опухоли (например, раковой опухоли) терапевтически эффективное количество иммуноцитокина по изобретению, может уменьшать число раковых клеток; уменьшать начальный размер опухоли; ингибировать (т.е. до некоторой степени замедлять и, предпочтительно, прекращать) инфильтрацию раковыми клетками периферических органов; ингибировать (т.е. до некоторой степени замедлять и, предпочтительно, прекращать) метастазирование опухоли; ингибировать, до некоторой степени, рост опухоли; и/или облегчать, до некоторой степени, один или более симптомов, обусловленных расстройством. Иммуноцитокин по изобретению может, до некоторой степени, предупреждать рост и/или убивать имеющиеся раковые клетки, оно может вызывать цитостатический и/или цитотоксический эффект. При терапии рака эффективность *in vivo* можно определять, например, оценивая продолжительность жизни, время до прогрессирования заболевания (TTP), частоту ответа опухоли на лечение (RR), продолжительность ответа и/или качество жизни.

Иммуноцитокины по данному изобретению могут назначаться без дополнительного терапевтического лечения, т.е. в качестве самостоятельной терапии. Кроме того, лечение иммуноцитоксином по данному изобретению может включать по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое лечение (комбинированная терапия). В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммуноцитокин может вводиться совместно или быть сформулирована с другим медикаментом/препаратом для лечения рака.

Используемые в данном документе термины «совместное назначение», «совместно назначенный» и «в сочетании с» относятся к иммуноцитокину по изобретению, с одним или более другими терапевтическими агентами, как предполагается, означают, ссылаются или включают:

1) одновременное введение такой комбинации иммуноцитокина по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы вместе в одной лекарственной форме, из которой указанные компоненты высвобождаются практически одновременно указанному пациенту,

2) одновременное введение такой комбинации иммуноцитокина по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы отдельно в разных лекарственных формах, введение которых

происходит практически в одно и то же время указанному пациенту, после чего указанные компоненты высвобождаются практически одновременно указанному пациенту,

3) последовательное введение такой комбинации иммуноцитокина по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы отдельно друг от друга в отдельных лекарственных формах, которые принимаются в последовательно по времени указанным пациентом со значимым временным интервалом между каждым введением, после чего указанные компоненты высвобождаются в практически разное время указанному пациенту; а также

4) последовательное введение такой комбинации иммуноцитокина по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы вместе в единый лекарственной форме, из которой высвобождение указанных компонентов происходит контролируемым образом, после чего они одновременно, последовательно или совместно высвобождаются в одно и то же время и/или разное время указанному пациенту, где каждая часть может быть введена одним или разными путями.

Иммуноцитокин по данному изобретению могут комбинировать с терапевтическим агентом, который выбирают из группы, включающей: цитотоксическое средство, химиотерапевтическое средство, противогормональное средство или другое терапевтическое антитело.

Термин «цитотоксическое средство» в используемом в настоящем описании смысле относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функционирование клеток и/или вызывает разрушение клеток. Подразумевается, что термин включает радиоактивные изотопы (например, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические средства и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины, имеющие происхождение из бактерий, грибов, растений или животных, включая их фрагменты и/или варианты.

«Химиотерапевтическим средством» является химическое соединение, применимое для лечения злокачественной опухоли. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбохинон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метилмеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтиленфосфорамид и триметилмеламин; ацетогенины (например, буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOI®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотecin (включая синтетический аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотecin, скополектин и 9-аминокамптотecin); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (например, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина,

мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как энедииновые антибиотики (например, калихеамицин, например, калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II (см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); динемидин, включая динемидин А; эсперамицин; а также хромофор неокарциностатина и родственные хромофоры хромопротеинов – энедииновые антибиотики, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая ADRIAMICIN®, морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин, доксорубициноHCl в инъектируемых липосомах (DOXOL®), липосомный доксорубицин TLC D-99 (MYOCET®), пегилированный липосомный доксорубицин (CAELYX®) и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиروмицин, пуромидин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (GEMZAR®), тегафур (UFTORAL®), капецитабин (XELODA®), эпотилон и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; средства, подавляющие функции надпочечников, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фолиевая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновую кислоту; этилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатраксат; дефофамин; демеколлин; диазихон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитразерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2»-трихлортриэтиламин; трихотецены (например, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («ara-C»); тиотепа; таксоид, например паклитаксел (TAXOL®), препарат паклитаксела на основе сконструированных связанных с альбумином наночастиц (ABRAXANETM) и доцетаксел (TAXOTERE®); хлорамбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; средства на основе платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; алкалоиды барвинка, которые предотвращают полимеризацию тубулина из образующихся микротрубочек, включая винбластин (VELBAN®), винкристин (ONCOVIN®), виндезин (ELDISINE®, FILDESIN®) и винорелбин (NAVELBINE®); этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; лейковорин; новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин;

ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота, включая бексаротен (TARGRETIN®); бифосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), этидронат (DIDROCAL®), NE-58095, золедроновую кислоту/золедронат (ZOMETA®), алендронат (FOSAMAX®), памидронат (AREDIA®), тилудронат (SKELID®) или ризендронат (ACTONEL®); троксацидин (1,3-диоксолановый нуклеозидный аналог цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, например олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию генов в путях передачи сигналов, вовлеченных в пролиферацию аберрантных клеток, таких как, например, PKC-альфа, Raf, H-Ras и рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина THERATOR® и вакцины для генной терапии, например вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы 1 (например, LURTOTECAN®); rmRH (например, ABARELIX®); BAY439006 (сорафениб; Bayer); SU-11248 (Pfizer); перифосин, ингибитор ЦОГ-2 (например, целекоксиб или эторикоксиб), ингибитор протеасом (например, PS341); бортезомиб (VELCADE®); CCI-779; типифарниб (811577); орафениб, ABT510; ингибитор Bcl-2, такой как облимерсен натрия (GENASENSE®); пиксантрон; ингибиторы EGFR (см. определение ниже); ингибиторы тирозинкиназ (см. определение ниже); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше средств; а также сочетания двух или более указанных выше средств, такие как CHOP, сокращенное название комбинированной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном, и FOLFOX, сокращенное название схемы лечения оксалиплатином (ELOXATINTM) в сочетании с 5-FU и лейковорином.

Также в указанное определение включены противогормональные средства, которые действуют, регулируя или ингибируя действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены со смешанным профилем агонист/антагонист, включая тамоксифен (NOLVADEX®), 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, торемифен (FARESTON®); идоксифен, дролоксифен, ралоксифен (EVISTA®), триоксифен, кеоксифен и избирательные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), такие как SERM3; чистые антиэстрогены без агонистических свойств, такие как фулвестрант (FASLODEX®) и EM800 (такие средства могут блокировать димеризацию рецепторов эстрогена (ER), ингибировать связывание ДНК, усиливать метаболизм ER и/или снижать уровни ER); ингибиторы ароматазы, включая стероидные ингибиторы ароматазы, такие как форместан и эксеместан (AROMASIN®), и нестероидные ингибиторы ароматазы, такие как анастрозол (ARIMIDEX®), летрозол (FEMARA®) и аминоглутетимид и другие ингибиторы ароматазы, включая ворозол (RIVISOR®), ацетат мегестрола (MEGASE®), фадрозол, имидазол; агонисты релизинг-гормона лютеинизирующего гормона, включая лейпролид (LUPRON® и ELIGARD®), гозерелин, бузерелин и триптерелин; половые стероиды, включая прогестины, такие как ацетат мегестрола и ацетат медроксипрогестерона, эстрогены, такие как диэтилстилбестрол и премарин и андрогены/ретиноиды, такие как флуоксиместерон, полностью трансретиноевая кислота и фенретирид; снапристон; антипрогестероны; понижающие регуляторы рецепторов эстрогенов (ERD); антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид; тестолактон; и фармацевтически приемлемые соли,

кислоты или производные любого из указанных выше средств; а также сочетания двух или более указанных выше средств.

Другим терапевтическим средством, которое может применяться в комбинации с иммуноцитоксином по данному изобретению может быть терапевтическое антитело, которое выбирают из группы: антитела к PD1 (например, пролголимаб, пембролизумаб или ниволумаб), антитела к PD-L1, антитела к CTLA4, антитела к анти 4-1BB, антитела к OX40, антитела к GITR, антитела к CD20 (например, ритуксимаб), антитела к HER2 (например, трастузумаб или пертузумаб), антитела к VEGF (например, бевацизумаб) или их комбинации.

Другим терапевтическим средством, которое может применяться в комбинации с иммуноцитоксином по данному изобретению может быть терапевтически активное противоопухолевое соединение, которое выбирают из группы активаторов врожденного или приобретенного иммунитета.

Подразумевается, что иммуноцитоксин по данному изобретению может использоваться в способах лечения, как описано выше, может использоваться в лечении, как описано выше, и/или может использоваться в производстве медикаментов для лечения, как описано выше.

Дозы и пути введения

Иммуноцитоксин по данному изобретению будет вводиться в количестве, эффективном для лечения состояния, о котором идет речь, т.е. в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как конкретное состояние, по поводу которого проводится лечение, возраста, пола и веса пациента, а также является ли введение иммуноцитоксина самостоятельным лечением или оно проводится в комбинации с одним или более дополнительных препаратов или методов лечения.

Схемы приема лекарственных средств можно регулировать, чтобы обеспечить оптимальный желаемый ответ. Например, может быть введен один болюс, несколько разделенных доз могут быть введены в течение некоторого времени, или доза могут быть пропорционально уменьшена или увеличена в зависимости от остроты терапевтической ситуации. Особенно полезным является изготовление парентеральных композиций в стандартной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозирования. Стандартная лекарственная форма при использовании в данном документе, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для пациентов/субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для стандартных лекарственных форм по настоящему изобретению, как правило, диктуется и непосредственно зависит от (a) уникальных характеристик химиотерапевтического агента и конкретного терапевтического или профилактического эффекта, которые должны быть достигнуты, и (b) ограничений, присущих в технике компаундирования такого активного соединения для лечения чувствительности у субъектов.

Таким образом, квалифицированным специалистам понятно, исходя из раскрытия, представленного в данном документе, что дозы и режим дозирования корректируются в соответствии со способами, хорошо известными в терапевтической области. Это означает, что может быть легко установлена максимально переносимая доза и может быть также определено эффективное количество, обеспечивающее обнаруживаемый терапевтический эффект для пациента, так же как и требования к времени введения каждого агента для достижения видимого терапевтического эффекта для пациента. Таким образом, хотя некоторые дозы и схемы режима введения приведены в качестве примеров в данном документе, эти примеры никоим образом не ограничивают дозы и режимы введения, которые могут понадобиться для пациента в практике применения настоящего изобретения.

Следует отметить, что значения дозировки могут изменяться, в зависимости от типа и тяжести состояния, которое следует облегчить, и может включать одну или более доз. Кроме того, необходимо понимать, что для любого конкретного пациента, конкретные схемы введения должны быть скорректированы через некоторое время согласно индивидуальной потребности и на усмотрение медицинского работника, который осуществляет введение или контролирует введение композиций, и что диапазоны концентрации, приведенные в данном описании, приведены только в качестве примера и не предназначены для ограничения объема или практики заявленных композиций. Кроме того, режим дозирования с композициями по данному изобретению может быть основан на различных факторах, включая тип заболевания, возраст, вес, пол, состояния здоровья пациента, тяжесть состояния, путь введения и конкретный иммуноцитокин по изобретению. Таким образом, режим дозирования может широко варьироваться, но может определяться регулярно с помощью стандартных методов. Например, дозы могут быть скорректированы на основе фармакокинетических и фармакодинамических параметров, которые могут включать клинические эффекты, такие как токсические эффекты или лабораторные значения. Таким образом, настоящее изобретение охватывает индивидуальное повышение дозы, которое определяется квалифицированным специалистом. Определение необходимой дозы и режимы хорошо известны в соответствующей области техники и будут понятны специалисту в данной области после ознакомления с идеями, раскрытыми в данном документе.

Примеры подходящих способов введения предусмотрены выше.

Предполагается, что подходящая доза иммуноцитокина по данному изобретению будет в диапазоне от 0,1–200 мг/кг, предпочтительно 0,1–100 мг/кг, в том числе около 0,5–50 мг/кг, например, около 1–20 мг/кг. Иммуноцитокин может быть введен, например, в дозе по меньшей мере 0,25 мг/кг, например, по меньшей мере 0,5 мг/кг, в том числе не менее 1 мг/кг, например, по меньшей мере 1,5 мг/кг, например, также как не менее 2 мг/кг, например, по меньшей мере 3 мг/кг, в том числе по меньшей мере 4 мг/кг, например, по меньшей мере 5 мг/кг; и например вплоть до максимально 50 мг/кг, в том числе вплоть до максимально 30 мг/кг, например, вплоть до максимально 20 мг/кг, в том числе вплоть до максимально 15 мг/кг. Введение будет повторяться обычно в подходящие промежутки времени, например, раз в неделю, раз в две недели, один раз каждые три

недели или один раз каждые четыре недели, и так долго, как будет сочтено целесообразным ответственным врачом, который может в некоторых случаях увеличить или уменьшить дозу при необходимости.

Примеры

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано путем иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемых вариантов осуществления изобретения.

Материалы и общие методы

Методы рекомбинантной ДНК

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии использовали согласно инструкциям производителей.

Синтез генов

Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза. Генные сегменты длиной от 300 до 4000 п.н., которые фланкированы уникальными сайтами рестрикции, собирали путем отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая ПЦР-амплификацию и последующее клонирование через указанные сайты рестрикции. Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали путем секвенирования ДНК.

Определение последовательностей ДНК

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования по Сенгеру.

Анализ последовательностей ДНК и белков и обработка данных о последовательностях

Применяли пакет программ Infomax's Vector NTI Advance suite, версия 8.0 и SnapGene Viewer для создания, картирования, анализа, аннотирования и иллюстрации последовательностей.

Пример 1

Производство рекомбинантных белков в суспензионной культуре клеток млекопитающих

Для приготовления рекомбинантных белков на основе IL15 суперагониста, схематично представленных на фиг. 1, фиг. 2, фиг. 3 и фиг. 4, были синтезированы конструкции, содержащие фрагменты последовательности IL15 и лиганда (IL15R α).
(<https://www.uniprot.org/uniprot/P40933>) и IL15R α
(<https://www.uniprot.org/uniprot/Q13261>) человека.

Последовательности обоих генов были синтезированы из олигонуклеотидов посредством ПЦР.

Для получения вариантов IL15 суперагониста, как представлено CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA на фиг. 1 и CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcLALA на фиг. 2 (далее упоминаются как IL15SA или BCD225), указанные гены были клонированы в плазмиды в виде N-terminus фьюжн (слитый белок) с первым константным доменом каппа легкой цепи антитела в вектор pEE-IL15Ra-CK (или pEE-IL15-CK) по сайтам рестрикции SalI/BsiWI (фиг. 5) и с первым константным доменом тяжелой цепи антитела в вектор pEE-IL15-CH1-Fc-LALA (или pEE-IL15Ra-CH1-Fc-LALA) IgG1 по сайтам рестрикции SalI/NheI (фиг. 6) и оба вектора скомбинированы на стадии трансфекции.

Для получения вариантов биспецифического IL15 суперагониста, как представлено Fab-CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcknobLALA (далее упоминается как IL15SA/PD1 или anti-PD1/IL15SA или IL15SA/PDL1 или anti-PDL1/IL15SA) на фиг. 4 и Fab-CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcknobLALA на фиг. 3, гены IL15 лиганда и рецептора были клонированы в плазмиды в виде N-terminus фьюжн с первым константным доменом каппа легкой цепи антитела в вектор pEE-IL15Ra-CK (или pEE-IL15-CK) по сайтам рестрикции SalI/BsiWI (фиг. 5) и с первым константным доменом тяжелой цепи антитела в вектор pEE-IL15-CH1-Fc-knob-LALA (или pEE-IL15Ra-CH1-Fc-knob-LALA) IgG1 по сайтам рестрикции SalI/NheI (фиг. 9). Кроме того, для образования Fab части ассиметричного антитела, как представлено на фиг. 3 и фиг. 4, гены переменных доменов антител anti-PD1 (prolgolimab) (далее как IL15SA/PD1 или anti-PD1/IL15SA) или anti-PDL1 (BCD-135) (далее как IL15SA/PDL1 или anti-PDL1/IL15SA) были клонированы в плазмиды в виде N-terminus фьюжн с первым константным доменом каппа легкой цепи антитела в вектор pEE-BCD100-02-VL-CK по сайтам рестрикции SalI/BsiWI (фиг. 7) и с первым константным доменом тяжелой цепи антитела в вектор pEE-BCD100-02-VH-CH1-Fc-hole-LALA IgG1 по сайтам рестрикции SalI/NheI (фиг. 8). В результате четыре описываемых вектора были скомбинированы на стадии трансфекции для синтеза 4 отдельных полипептидов в одной клетке и образования биспецифического иммуноцитокина.

Все указанные выше плазмиды нарабатывали в необходимых количествах в клетках E.Coli и очищали при помощи набора Maxiprep Qiagen.

Рекомбинантные белки, содержащие IL15SA, транзистентно нарабатывали в клетках клеточной линии клеток яичника китайского хомячка (линия CHO-K1), полученной согласно опубликованным протоколам [Biotechnol Bioeng. 2005 Sep 20; 91(6):670-677, Liao Metal., 2004; Biotechnol Lett. 2006 Jun;28(11):843-848; Biotechnol Bioeng. 2003 Nov 5;84(3):332-342]. Использовали клетки, конститутивно экспрессирующие ген белка EBNA1 (Epstein-Barrvirus nuclear antigen 1). Суспензионное культивирование осуществляли в колбах на орбитальном шейкере, с использованием бессывороточных сред производства компании Life Technologies Corporation и согласно инструкциям производителя. Для транзистентной экспрессии клетки в концентрации 2×10^6 /мл трансфецировали с помощью линейного полиэтиленимина (ПЭИ «МАХ», компания «Polysciences»). Соотношение ДНК/ПЭИ составляло 1:3/1:10. Через 5-7 дней после трансфекции культуральную среду центрифугировали при 2000 g в течение 20 минут

и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Целевые белки выделяли из культуральной жидкости с помощью аффинной хроматографии.

Рекombинантные белки выделяли и очищали из культуральной жидкости, используя колонку для аффинной хроматографии протеин А. Осветленную культуральную жидкость пропускали через колонку HiTrap rProtein A Sepharose FF объемом 5 мл (GE Healthcare), уравновешенную фосфатно-солевым буфером (ФСБ, pH 7,4). Затем колонку промывали 5 колоночными объемами ФСБ, чтобы вымыть неспецифически связывающиеся компоненты. Связанный антиген элюировали, используя 0,1 М глициновый буфер pH 3. Главный протеиновый пик элюции собирали и доводили его pH до нейтральности с помощью 1 М буфера Tris (pH 8). Все стадии проводили при скорости потока 110 см/ч. Далее белок переводили в ФСБ (pH 7,4) с помощью диализа, используя технологию SnakeSkin Dialysis Tubing, фильтровали (0,22 мкм), переносили в пробирки и хранили при -70°C.

Чистоту полученного раствора белка оценивали с помощью SDS-гель-электрофореза (пример фиг. 10).

Пример 2

Кинетический анализ взаимодействия (IL15SA)2-Fc с IL2βγ рецептором человека

Константы аффинности связывания (IL15SA)2-Fc (далее так будут называться CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA на фиг. 1 и CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcLALA на фиг. 2) с IL2βγ человека были получены с помощью прибора OctetRed 96 согласно инструкциям компании ForteBio. Биосенсоры AR2G заранее были регидратированы в течение часа в mQ. После активации биосенсоров препараты (IL15SA)2-Fc в концентрации 25 мкг\мл в ацетатном буфере pH4 были неспецифически (по NH₂-группам) иммобилизованы на поверхности биосенсора. Затем сенсоры погружались в лунки с растворами Human CD122 / IL-2RB Protein (Fc Tag) (1 и 0,5 мкг\мл) при 30°C в буфере PBS, содержащем 0,1% Твин-20 и 0,1% BCA. В этом растворе происходила ассоциация комплекса IL15SA и IL2βγ. После этого сенсоры погружались в буферный раствор для последующей стадии диссоциации. Анализ был произведен при 30°C с использованием PBS, содержащим 0,1% Твин-20 и 0,1% BCA в качестве рабочего буфера.

Полученные сенсограммы представлены в таблице 1 для CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA и для CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcLALA, которые были проанализированы с вычетом базового сигнала с помощью программы Octet Data Analysis (версия 8.0) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1. Полученные константы аффинности приведены в таблице 1. Оба исследованных варианта проявили высокую аффинность и специфичность к IL2βγ человека.

Таблица 1. Константы аффинности (IL15SA)2-Fc иммуноцитокина при взаимодействии с IL2βγ-Fc человека.

Loading Sample ID	Conc. (nM)	Response	KD (M)	k _{on} (1/Ms)	k _{dis} (1/s)
CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLA	19.4	0.3774	2.47E-10	3.69E+05	9.11E-05
CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLA	9.69	0.3301	3.80E-10	3.02E+05	1.15E-04
CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcLA	19.4	0.325	2.13E-10	3.58E+05	7.63E-05
CK_IL15_Hc_IL15RaCH1FcLA	9.69	0.2832	2.12E-10	3.57E+05	7.55E-05

Пример 3

Кинетический анализ взаимодействия биспецифических IL15 суперагонистов с IL2 β рецептором человека и другим клеточным рецептором иммунных клеток

Константы аффинности связывания IL15SA биспецифических иммуноцитоклинов (далее так будут называться anti-PD1-Fab-CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcKnobLALA и anti-PD-L1-Fab-CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcKnobLALA) с IL2 β и рецепторами PD-1 и PD-L1 человека были получены с помощью прибора OctetRed 96 согласно инструкциям компании ForteBio. Биосенсоры AR2G заранее были регидратированы в течение часа в mQ. После активации биосенсоров биспецифические в концентрации 25 мкг\мл в ацетатном буфере pH4 были неспецифически (по NH₂-группам) иммобилизованы на поверхности биосенсора. Затем сенсоры погружались в лунки с растворами Human CD122 / IL-2RB Protein (Fc Tag) или рецептора PD-1-Fc или PD-L1-Fc (1 и 0,5 мкг\мл) в буфере PBS, содержащем 0,1% Твин-20 и 0,1% BSA для ассоциации биспецифического суперагониста и исследуемого рецептора. После этого сенсоры погружались в буферный раствор для последующей стадии диссоциации.

Инструментальные данные проанализированы с вычетом базового сигнала с помощью программы Octet Data Analysis (версия 8.0) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1.

Полученные константы аффинности приведены в таблице 2. Оба исследованных варианта проявили высокую аффинность и специфичность как к IL2 β человека, так и к парным рецепторам и проявляют отсутствие неспецифической активности к другому рецептору.

Таблица 2. Константы аффинности биспецифических IL15 суперагонистов антител при взаимодействии с IL2 β -Fc человека и второму рецептору.

Loading Sample ID	PD1		IL28b		PDL1	
	Response	ED (M)	Response	ED (M)	Response	ED (M)
Anti-PD-1 Fab-CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA	0.7606	8.718E-10	0.4504	1.25E-10	0	0
Anti-PD-L1 Fab - CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA	0	0	0.3251	2.39E-11	0.3084	2.38E-11
Anti-PD-1 proigolimab	0.9216	1.86E-10	0	0	0	0
Anti-PDL-1 BCD-135	0	0	0	0	0.8183	<1.0E-12

Пример 4

Клеточный тест на определение пролиферационной активности IL15 суперагонистов на линии NK92

Для теста использовали клеточную линию NK-92. Тест проводили в культуральном 96-луночном планшете. Суспензия содержала клетки NK-92, исследуемое антитело в указанной на графике концентрации. Все компоненты суспензии готовили в среде RPMI-1640, содержащей эмбриональную бычью сыворотку и глутамин. После добавления всех компонентов планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂. Далее в лунки вносили краситель Alamar Blue. После инкубации измеряли интенсивность флуоресценции в лунках. Сравнительно исследовались препараты IL15SA (CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA), IL15SA/PD1 (Anti-PD-1 Fab-CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA) и IL15SA/PDL1 (Anti-PDL-1 Fab-CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA).

Результаты проверки специфической активности указанных выше иммуноцитоклинов выявили высокую пролиферативную активность в отношении NK92 линии. Расчетные EC50 для всех кандидатов оказались идентичными, и уровень активации определяемый верхним плато также полностью совпал (фиг. 11). Нужно отметить, что валентность IL15SA части, и соответственно различная avidность, не оказала существенного влияния на данную активность.

Пример 5

Клеточный тест на определение пролиферационной активности IL15 суперагонистов на линии природных киллеров

Для теста использовали выделенные натуральные киллеры, выделенные из PBMC здоровых доноров, методом негативной селекции. Тест проводили в культуральном 96-луночном планшете. Суспензия содержала клетки натуральных киллеров, исследуемое антитело в указанной на графике концентрации. Все компоненты суспензии готовили в среде культивирования, содержащей аутологичную плазму человека. После добавления всех компонентов планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂. Далее в лунки вносили краситель Alamar Blue. После инкубации измеряли интенсивность флуоресценции в лунках. Сравнительно исследовалось влияние препаратов IL15SA (CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA), IL15SA/PD1 (Anti-PD-1 Fab-CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA) и интерлейкин-2 (IL2) (Ронлейкин НПО "Биотех") человека на пролиферативную способность природных киллерных клеток.

Результаты проверки специфической активности указанных выше иммуноцитокинов выявили высокую пролиферативную активность в отношении природных киллерных клеток (фиг. 12). Расчетные EC50 для всех кандидатов оказались идентичными в пределах погрешности и чуть слабее чем IL2 цитокин. Кроме того, уровень активации, определяемый верхним плато, также полностью совпал. Нужно отметить, что валентность IL15SA части, и соответственно различная авидность, не оказала существенного влияния на данную активность.

Пример 6

Клеточный тест на определение anti-PD1 антагонистической активности IL15 суперагонистов на репортерной линии

Для теста использовали клеточную линию Jurkat NFAT-FLuc PD-1, созданную на основе клеточной линии Jurkat, стабильно экспрессирующую на поверхности PD-1 и содержащую ген, кодирующий люциферазу светляка, под контролем NFAT-промотора; а также клеточную линию Raji PDL1, созданную на основе клеточной линии Raji, стабильно экспрессирующую на поверхности PDL1. Сравнительно исследовалось влияние препаратов IL15SA (CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA), anti-PD1/IL15SA (Anti-PD-1 Fab-CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcknobLALA) и anti-PD1 антагонист (prolgolimab) на активационную способность в репортерной клеточной системе.

Тест проводили в культуральном 96-луночном планшете. Суспензия в каждой лунке содержала клетки Jurkat NFAT-FLuc PD-1, клетки Raji PDL1, aCD3/aTAA1 в концентрации 1 нг/мл, исследуемое антитело в указанной на графике концентрации. После добавления всех компонентов планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и далее, с помощью набора для оценки люминесценции, измеряли интенсивность люциферы в лунках.

Результаты проверки специфической активности указанных выше иммуноцитокинов выявили на порядок более слабую величину EC50 специфичности для anti-PD1/IL15SA в сравнении с терапевтически эффективным моноклональным anti-PD1 антителом prolgolimab (фиг. 13). Кроме того, уровень максимальной активности (верхнее плато) также на 30% снижен. Меньшая специфичность anti-PD1/IL15SA, чем prolgolimab, может объясняться только моновалентным Fab связывающим PD1 в составе молекулы anti-PD1/IL15SA, чем классического антитела. Это же подтверждается и почти порядковой разностью в аффинности к PD-1 рецептору по данным в примере 3 (таблица 2) и указанной для prolgolimab значением. Нужно отметить, что антагонистическая активность IL15SA проявилась как фон, то есть практически отсутствовала.

Пример 7

Клеточный тест на определение anti-PDL1 антагонистической активности IL15 суперагонистов на репортерной линии

Для теста использовали клеточную линию Jurkat NFAT-FLuc PD-1, созданную на основе клеточной линии Jurkat, стабильно экспрессирующую на поверхности PD-1 и содержащую ген, кодирующий люциферазу светляка, под контролем NFAT-промотора; а также клеточную линию Raji PDL1, созданную на основе клеточной линии Raji, стабильно экспрессирующую на поверхности PDL1. Сравнительно

исследовалось влияние препаратов IL15SA (CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA), anti-PDL1/IL15SA (Anti-PD-L1 Fab-CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcknobLALA) и anti-PDL1 антагонист (atezolizumab) на активационную способность в репортерной клеточной системе.

Тест проводили в культуральном 96-луночном планшете. Суспензия в каждой лунке содержала клетки Jurkat NFAT-FLuc PD-1, клетки Raji PDL1, aCD3/aTAA1 в концентрации 1 нг/мл, исследуемое антитело в указанной на графике концентрации. После добавления всех компонентов планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и далее, с помощью набора для оценки люминесценции, измеряли интенсивность люциферы в лунках.

Результаты проверки специфической активности указанных выше иммуноцитоклинов выявили в 30X более слабую величину EC50 специфичности для anti-PD-L1/IL15SA в сравнении с терапевтически эффективным моноклональным anti-PD-L1 антителом atezolizumab (фиг. 14). Однако уровень максимальной активности (верхнее плато) был снижен лишь на 10%. Меньшая специфичность anti-PD-L1/IL15SA, чем atezolizumab, может объясняться только моновалентным Fab связывающим PD-L1 в составе молекулы anti-PD-L1/IL15SA, чем классического антитела. При этом, антагонистическая активность IL15SA не была значимо зафиксирована.

Пример 8

Клеточный тест на определение влияния IL15 суперагонистов в присутствии антитела, специфичного против опухоль-ассоциированного антигена (TAA), на антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) натуральных киллеров против TAA-репортерной линии

Для теста использовали натуральные киллеры, выделенные из PBMC здоровых доноров, методом негативной селекции. Тест проводили в культуральном 96-луночном планшете. Суспензия содержала клетки натуральных киллеров и клетки Raji, эффекторное антитело Ритуксимаб и исследуемое антитело в указанной на графике концентрации. Все компоненты суспензии готовили в среде культивирования, содержащей эмбриональную бычью сыворотку и глутамин. После добавления всех компонентов планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂. Далее собирали культуральную жидкость и исследовали содержание лактатдегидрогеназы с использованием набора для определения ЛДГ. Сравнительно исследовалось влияние препаратов IL15SA (CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA), anti-PDL1/IL15SA (Anti-PD-L1 Fab-CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcknobLALA) на ADCC способность rituximab в репортерной клеточной системе.

Результаты проверки специфической активности указанных выше иммуноцитоклинов выявили высокую активность в отношении усиления ADCC способности rituximab против TAA-репортерной линии (фиг.15 и фиг.16). Эффективность rituximab-зависимого ADCC, определяемая процентом лизированных клеток Raji, имеющих сверхэкспрессированный CD20 рецептор на поверхности, выросла на 30% в присутствии каждого исследованного кандидата в сравнении с только наличием rituximab. По-видимому, данный эффект объясняется пролиферацией активных природных киллеров под действием IL15SA и anti-PDL1/IL15SA в тесте, согласно приведенным результатам в примерах 4 и 5. Расчетные EC50

для всех кандидатов оказались идентичными в пределах погрешности. Нужно отметить, что валентность IL15SA части, и соответственно различная avidность, не оказала существенного влияния на данную активность, что также подтверждается примерами 4 и 5.

Пример 9

Клеточный тест на определение цитотоксичности IL15 суперагонистов на клетках PBMCs из цельной крови здоровых доноров. Клетки PBMCs были изолированы из цельной крови здоровых доноров путём центрифугирования в градиенте плотности фиколла.

Тест проводили в культуральном 96-луночном планшете. Суспензия в каждой лунке содержала свежие выделенные PBMCs и указанное на графике антитело в концентрации 0,1 мкг/мл. После смешивания PBMCs и антител планшет инкубировали в течение 16 ч при 37°C, 5% CO₂. Далее оценивали в суспензиях долю CD56+, CD19+, CD3+, CD4+ и CD8+ субпопуляций PBMCs с помощью прямого окрашивания суспензий флуоресцентно-мечеными антителами против соответствующих CD и последующего анализа клеток на проточном цитофлуориметре. Для CD56+, CD19+, CD3+ клеток на графиках приведена доля от всех клеток анализируемой суспензии, для CD4+, CD8+ – доля от CD3+ клеток. Сравнительно исследовалось цитотоксическое влияние препаратов IL15SA (CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcLALA), anti-PD1/IL15SA (Anti-PD-1 Fab-CK_IL15Ra_Hc_IL15CH1FcknobLALA), anti-PD1 (prolgolimab), смеси anti-PD1 (prolgolimab) + IL15SA, anti-CD20 GA101 антитело на клетки PBMCs человека.

Результаты представленные на фиг. 17-21 свидетельствуют об отсутствии значимого цитотоксического эффекта кандидатов, то есть не более 10% уменьшения количества иммунореактивных клеток в сравнении с негативным контролем АВ (те отсутствием каких-либо экзогенных антител). При этом контрольное антитело anti-CD20 показало закономерно полную деплецию популяции CD20+ В клеток. Таким образом, все рассматриваемые кандидаты не обладают значимой неспецифической цитотоксичностью *in vitro* на клетках крови человека.

Пример 10

Определение агрегационной стабильности IL15 суперагониста в условиях термостресса

Препарат IL15 суперагонист с концентрацией 9 мг/мл в ФСБ буфере прогревался в течение 12 часов при температуре 50°C. Определение агрегации после термостресса проводили методом гель-фильтрационной высокоэффективной хроматографии. Хроматографию проводили на системе ВЭЖХ (Agilent) 1100 на колонке Tosoh TSK-Gel G3000SWXL, 7.8 мм x 30 см, кат. № 08541 с предколонкой Tosoh TSKgel Guard SWXL, 6.0 мм x 4.0 см, с диаметром частиц 7 мкм, кат. № 08543. Элюирование проводилось в изократическом режиме подвижной фазой: 50 mM NaF6, 0,3 M NaCl, pH 7.0 на скорости потока 0,5 мл/мин. Детектирование проводилось на длинах волн 214 и 280 нм. Образцы антител были разведены буфером ФСБ, pH 7.5, до концентрации ~1 мг/мл. Объем вводимой пробы – 10 мкл. Предварительно была хроматографирована калибровочная смесь Gel filtration standard (от Bio-Rad), кат. № 151-1901. На фиг. 22 представлена хроматограмма,

на которой IL15 суперагонист демонстрирует высокую гомогенность (содержание агрегатов в растворе составила не более 5%).

Пример 11

Оценка противоопухолевой активности препаратов IL15 суперагонистов на сингенной модели меланомы B16F10

Для оценки эффективности использовали иммунокомпетентных мышей линии C57BL/6, которым прививали опухолевую линию B16F10. Каждому животному в группе вводили подкожно в правый бок $1,5 \times 10^5$ опухолевых клеток. На 7 день после инокуляции клеток (1 сутки эксперимента) животных распределяли по группам, как представлено в таблице 3. Оценку эффективности проводили с использованием одной дозы препаратов BCD-225, IL15SA/a-mPD-1 – биспецифического моноклонального антитела, содержащего IL-15SA и Fab фрагмент к мышиному PD-1, производное мышиного антитела RMP1-14. Последовательность переменных доменов антитела RMP1-14 была любезно предоставлена Hideo Yagita, PhD, Juntendo University School of Medicine. Гены и препараты антител RMP1-14 переменные домены были синтезированы согласно примеру 1. Кроме того, был синтезирован препарат сравнения ALT-803 [Han KP et al, Cytokine. 2011 Dec;56(3):804-10.] (положительный контроль) и плацебо (отрицательный контроль). Также была оценена противоопухолевая активность препаратов в комбинации с антителом к мышиному PD-1 (a-mPD-1).

Таблица 3. Распределение животных по группам в эксперименте по определению противоопухолевой активности препаратов IL15 суперагонистов.

Группа	Количество животных	Доза
BCD-225 (IL15SA)	9	0,2 мг/кг
IL15SA/a-mPD-1	9	0,2 мг/кг
ALT-803	9	0,2 мг/кг
anti-mPD-1	10	10 мг/кг
BCD-225 (IL15SA) + anti-mPD-1	9	0,2 мг/кг + 10 мг/кг
IL15SA/a-mPD-1 + anti-mPD-1	9	0,2 мг/кг + 10 мг/кг
ALT-803 + anti-mPD-1	9	0,2 мг/кг + 10 мг/кг
Отрицательный контроль	10	-

Препараты BCD-225 (IL15SA), IL15SA/a-mPD-1 и ALT-803 вводили внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл на 1, 4, 8 и 11 сутки эксперимента. Препарат anti-mPD-1 вводили внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл на 2, 5, 9 и 12 сутки эксперимента. Группе отрицательного контроля вводили натрий-ацетатный буфер на 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11 и 12 сутки эксперимента в объеме 0,2 мл (фигура 23).

В течение эксперимента измеряли массу тела мышей и линейные размеры опухоли. Для вычисления объема опухоли использовали

формулу $V=L \times W \times W \times \pi / 6$. В качестве критерия эффективности исследуемого препарата использовали показатель торможения роста опухоли (ТРО), который рассчитывается с учетом медианного значения объема опухоли в группе отрицательного контроля (V_c) и группе препарата (V_t) по формуле:

$$\text{ТРО (\%)} = \frac{V_c - V_t}{V_c} * 100$$

Результаты эксперимента показаны на фигурах 24 и 25. Приводятся данные за 11 сутки эксперимента, в связи с гибелью животных от опухолевой нагрузки практически во всех экспериментальных группах и невозможностью достоверно оценить противоопухолевую активность препаратов на 15 сутки.

По результатам исследования препарат BCD-225 и препарат сравнения ALT-803 показали сопоставимую противоопухолевую активность: ТРО в группе BCD-225 составил 52%, в группе препарата ALT-803 – 53%. Наблюдалась тенденция к увеличению значения показателя ТРО в группе биспецифического антитела IL15SA/anti-mPD-1 по сравнению со значениями ТРО в группах BCD-225 и ALT-803. ТРО в группе IL15SA/anti-mPD-1 составило 58% на 11 сутки эксперимента.

Показатели ТРО в группах комбинации препаратов BCD-225 + anti-mPD-1 и ALT-803 + anti-mPD-1 были равны 72% на 11 сутки эксперимента, в группе комбинации IL15SA/a-mPD-1и anti-mPD-1 – 69%. Полученные значения ТРО свидетельствуют о более выраженной противоопухолевой активности комбинации исследуемых препаратов с anti-mPD-1 по сравнению с активностью данных препаратов в монотерапии.

Пример 12

Оценка и анализ сравнительной смертности мышей препаратов IL15 суперагонистов и ALT803 на сингенной модели меланомы B16F10

Для сравнительной оценки смертности мышей в результате применения препаратов IL15 суперагонистов использовали модель и серию животных, описанных в примере 11. Оценка выживаемости проводилась путем подсчета павших или эвтаназированных в агонизирующем состоянии животных.

Результаты представлены в таблице 4. Как следует из полученных данных, показатели смертности, в группах препаратов IL15SA/a-mPD-1 и IL15SA/a-mPD-1 + anti-mPD-1 в среднем меньше по количеству мышей и времени выживаемости, чем для IL15SA (BCD225), IL15SA + anti-mPD-1, ALT-803, ALT-803 + anti-mPD-1. Полученные значения смертности свидетельствуют о вероятно менее выраженной токсичности IL15SA/a-mPD-1 биспецифического иммуноцитокина в сравнении с моноспецифическими бивалентными IL15SA и ALT-803. Наличие или отсутствие антитела anti-PD1 не оказывало статистически значимый эффект на смертность. Кроме того, анализ органов погибшей мыши из серии IL15SA и ALT-803, выявил наличие в печени гидропической дистрофии с некрозом гепатоцитов, и сдавленность синусоидов. Лимфогистиоцитарные инфильтраты в перинхиме и скопление лимфоцитов в синусоидах. Эти показатели согласуются с ранее описанными в литературе данными, что суперагонисты на основе IL15 способны вызывать повреждение печени у мышей.

Таблица 4. Распределение животных по группам в эксперименте по определению смертности от препаратов IL15 суперагонистов и ALT803 суперагонистов и их комбинаций с anti-PD1 антителом.

Номер группы	Лечение	Количество павших животных	День эксперимента	Общее количество
1	IL15SA (BCD-225)	2	10	4
		2	14	
2	IL15SA/a-mPD-1	2	15	2
3	ALT-803	2	7	2
4	anti-mPD-1	3	14	3
5	IL15SA (BCD-225) + anti-mPD-1	1	14	1
6	IL15SA/a-mPD-1 + anti-mPD-1	1	11	2
		1	14	
7	ALT-803 + anti-mPD-1	3	7	3
8	Плацебо	1	14	1