

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201600418** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2016.09.30**

(22) Дата подачи заявки  
**2012.04.26**

(51) Int. Cl. *C07K 14/55* (2006.01)  
*C12N 15/26* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 47/48* (2006.01)  
*C07K 16/46* (2006.01)  
*C07K 19/00* (2006.01)  
*C07K 14/54* (2006.01)

---

(54) **НОВЫЕ ИММУНОКОНЬЮГАТЫ**

---

(31) **11164237.7**

(32) **2011.04.29**

(33) **EP**

(62) **201301208; 2012.04.26**

(71) Заявитель:  
**РОШЕ ГЛИКАРТ АГ (CH)**

(72) Изобретатель:  
**Аст Оливер, Брюнкер Петер, Хофер  
Томас У., Хоссе Ральф, Клайн  
Кристиан, Мёсснер Эккехард, Умана  
Пабло (CH)**

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

(57) В целом, в заявке описаны антигенспецифические иммуноконъюгаты, предназначенные для введения эффекторных фрагментов, которые влияют на клеточную активность. Более конкретно, в заявке описаны новые иммуноконъюгаты, которые содержат первый антигенсвязывающий фрагмент, Fc-домен и единичный эффекторный фрагмент. Кроме того, в заявке описаны полинуклеотиды, кодирующие указанные иммуноконъюгаты, и векторы и клетки-хозяева, которые содержат указанные полинуклеотиды. В заявке описаны также способы получения иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, и способы применения указанных иммуноконъюгатов для лечения заболевания.

**201600418**  
**A1**

**201600418**  
**A1**

5

10

15

Заявка №

Заявитель Роше Гликарт АГ, СН

## НОВЫЕ ИММУНОКОНЬЮГАТЫ

20

### Область техники, к которой относится изобретение

25

Настоящее изобретение относится в целом к антигенспецифическим иммуноконъюгатам, предназначенным для избирательного переноса обладающих эффекторной функцией фрагментов (эффекторных фрагментов), которые оказывают влияние на клеточную активность. Кроме того, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим указанные иммуноконъюгаты, и векторам и клеткам-хозяевам, которые содержат указанные молекулы нуклеиновых кислот. Изобретение относится также к способам получения иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, и способам применения указанных конъюгатов для лечения заболевания.

30

### Известный уровень техники

В различных клинических ситуациях часто требуется деструкция индивидуальной клетки или конкретного типа клеток. Например, основной задачей при терапии рака является специфическое разрушение опухолевых

клеток с сохранением при этом в интактном и неповрежденном состоянии здоровых клеток и тканей. С выживаемостью и/или гибелью клеток связано множество путей трансдукции сигналов в клетке. Таким образом, для оказания влияния на поддержание клетки или ее деструкцию можно применять  
5 непосредственное введение связанного с указанным путем фактора, который участвует в обеспечении выживаемости или гибели клеток. Аналогично этому, можно вводить специфические факторы, которые стимулируют иммунные эффекторные клетки в микроокружении опухоли, такие как естественные клетки-киллеры (NK) или цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), для «атаки» на  
10 опухолевые клетки и их разрушения.

Цитокины представляют собой молекулы, обеспечивающие передачу клеточных сигналов, которые принимают участие в регуляции иммунной системы. При применении в терапии рака цитокины могут действовать в качестве иммуномодуляторов, которые обладают противоопухолевой  
15 активностью и которые могут повышать иммуногенность некоторых типов опухолей. Однако быстрый клиренс из крови и отсутствие специфичности для опухоли обуславливают необходимость системного введения в высоких дозах цитокинов для достижения концентрации цитокина в области локализации опухоли, достаточной для активации иммунного ответа или противоопухолевого  
20 действия. Такие высокие уровни обладающих системным действием цитокинов могут приводить к проявлению серьезной токсичности и нежелательных реакций.

Таким образом, для применения в терапии является желательным специфическое введение *in vivo* фактора пути трансдукции сигнала, такого как  
25 цитокин, в конкретную область (например, опухоль или микроокружение опухоли в случае противораковой терапии). Для достижения этого можно конъюгировать фактор с обеспечивающим направленный перенос фрагментом, например, антителом или фрагментом антитела, специфическим для данной области. Осуществляемые ранее стратегии, целью которых было введение  
30 факторов путей трансдукции сигналов, таких как цитокины, в конкретную область *in vivo*, предусматривали применение тяжелых цепей иммуноглобулинов, конъюгированных с различными цитокинами, такими как лимфотоксин, фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерлейкин-2 (IL-2) и

колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF) (см., например, обзор, Lode и др., *Pharmacol Ther* 80, 1998, сс. 277-292).

Исследователи установили, что они не только могли обеспечивать направленный перенос цитокинов к конкретным областями *in vivo*, но и обладали преимуществом, связанным с тем, что моноклональные антитела имели более продолжительное время полужизни в сыворотке, чем бóльшая часть других белков. Из-за системной токсичности, ассоциированной с высокими дозами определенных неконъюгированных цитокинов, например, IL-2, возможность применения слитого белка иммуноглобулин-цитокин в более низких дозах, обеспечивающих максимальное повышение благоприятного биологического действия в требуемой области, например, в опухоли, при поддержании системных побочных действий на минимальном уровне, позволила исследователям высказать предположение о том, что иммуноконъюгаты иммуноглобулин-цитокин являются оптимальными терапевтическими средствами.

Однако в данной области известно, что с иммуноконъюгатами иммуноглобулин-цитокин ассоциированы определенные недостатки. Например, в указанных иммуноконъюгатах имеется по меньшей мере один цитокин, связанный с каждой из двух тяжелых цепей иммуноглобулина, что приводит к получению иммуноконъюгата, обладающего способностью к двухвалентному связыванию с мишенью, и с двумя или большим количеством остатков цитокина (см., например, обзор Chang и др., *Expert Opin Drug Discovery* 4, 2009, сс. 181-194 или Ortiz-Sanchez и др., *Expert Opin Biol Ther* 8, 2008, сс. 609-632). На фиг. 1 представлен общепринятый иммуноконъюгат иммуноглобулин-цитокин, известный в данной области, в котором цитокин слит с С-концом каждой из двух тяжелых цепей антитела. Из-за присутствия двух или большего количества остатков цитокина указанный иммуноконъюгат обладает высокой avidностью в отношении рецептора соответствующего цитокина (например, аффинностью, характеризующейся пикомолярными величинами в случае IL-2), и в результате его мишенью являются скорее иммунные эффекторные клетки, которые экспрессируют рецептор цитокина, чем антиген, являющийся мишенью иммуноглобулина (аффинность, характеризующаяся наномолярными (нМ) величинами), с которым цитокин связан. Кроме того, известно, что с



общепринятыми иммуноконъюгатами могут быть ассоциированы реакции на инфузию (см., например, King и др., J Clin Oncol 22, 2004, сс. 4463-4473), которые по меньшей мере частично связаны с активацией цитокиновых рецепторов на иммунных эффекторных клетках в периферической крови входящими в иммуноконъюгат остатками цитокинов.

Кроме того, посредством их Fc-области иммуноконъюгаты иммуноглобулин-цитокин могут активировать комплемент и взаимодействовать с Fc-рецепторами. Эту присущую иммуноглобулинам особенность рассматривали как нежелательную, поскольку мишенью терапевтических иммуноконъюгатов могут являться клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы, а не клетки, несущие предпочтительный антиген. Кроме того, одновременная активация цитокиновых рецепторов и Fc-рецепторов путей передачи сигналов приводит к высвобождению цитокинов, прежде всего в сочетании с обладающими пролонгированным временем полужизни содержащими иммуноглобулин слитыми белками, что затрудняет их применение в терапевтических целях из-за системной токсичности.

Один из подходов, позволяющих преодолевать эту проблему, состоит в применении в иммуноконъюгатах фрагментов иммуноглобулина, лишенных Fc-области, таких как scFv- или Fab-фрагменты. Примеры иммуноконъюгатов фрагмент иммуноглобулина-цитокин включают иммуноконъюгат scFv-IL-2, описанный в публикации PCT WO 2001/062298, иммуноконъюгат scFv-IL-12-scFv, описанный в публикации PCT WO 2006/119897 (в которых каждый из двух scFv-фрагментов соединен с субъединицей гетеродимера IL-12, которые удерживаются вместе с помощью дисульфидного(ых) мостика(ов)) или иммуноконъюгаты Fab-IL-2-Fab, описанные в публикации PCT WO 2011/020783. В большинстве иммуноконъюгатов таких типов сохраняются как реактивность в отношении связывания с опухолью родительской молекулы иммуноглобулина, так и функциональная активность цитокина, однако время полужизни таких конструкций существенно короче по сравнению с содержащими иммуноглобулин слитыми белками.

Таким образом, сохраняется потребность в иммуноконъюгатах, обладающих улучшенными свойствами касательно более высокой терапевтической эффективности и пониженного уровня и серьезности побочных

действий этих продуктов (например, токсичность, деструкция неопухолевых клеток и т.д.).

В настоящем изобретении предложены иммуноглобулинподобные иммуноконъюгаты, обладающие повышенной эффективностью, высокой специфичностью действия, пониженной токсичностью и улучшенным временем полужизни и стабильностью в крови по сравнению с известными иммуноконъюгатами.

#### Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение основано, в частности, на полученных заявителями данных о том, что мишенью иммуноконъюгатов, содержащих более одного эффекторного фрагмента, такого, например, как цитокин, скорее может являться рецептор соответствующего эффекторного фрагмента, а не антиген-мишень антигенсвязывающего фрагмента иммуноконъюгата. Таким образом, одним из объектов изобретения является иммуноконъюгат, содержащий первый антигенсвязывающий фрагмент, Fc-домен, содержащий две субъединицы, и эффекторный фрагмент, в котором присутствует не более одного эффекторного фрагмента. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент слит с амино- или карбоксиконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена, необязательно через линкерный пептид. В одном из вариантов осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент слит с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена, необязательно через линкерный пептид или шарнирную область иммуноглобулина.

В одном из вариантов осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающий домен антитела. В конкретном варианте осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу Fab. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен содержит модификацию, усиливающую гетеродимеризацию двух неидентичных полипептидных цепей. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная модификация представляет собой модификацию типа «knob-in-hole» («выступ-впадина»), которая включает модификацию, приводящую к образованию «выступа» в одной из субъединиц Fc-домена и «впадины» в другой одной из двух субъединиц Fc-

домена. В конкретном варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент слит с амино- или карбоксиконцевой аминокислотой субъединицы Fc-домена, содержащей модификацию, приводящую к образованию «выступа».

5 В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG, в частности, Fc-домен IgG<sub>1</sub>. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен является человеческим.

10 В конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-домен конструируют так, чтобы он обладал измененной способностью связываться с Fc-рецептором, в частности измененной способностью связываться с Fcγ-рецептором, и/или измененной эффекторной функцией, в частности антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичностью (ADCC).

15 Хотя присутствие Fc-домена является важным для пролонгирования времени полужизни иммуноконъюгата, при создании изобретения рассматривалась концепция о том, что в некоторых ситуациях может оказаться целесообразным элиминировать эффекторные функции, ассоциированные с взаимодействием Fc-рецепторов с Fc-доменом. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления изобретения измененное связывание с Fc-рецептором и/или измененная эффекторная функция представляет собой пониженное связывание и/или пониженную эффекторную функцию. В конкретном указанном

20 варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит одну или несколько аминокислотную(ые) мутацию(ии), которая(ые) снижает(ют) связывание Fc-домена с Fc-рецептором, в частности Fcγ-рецептором. Предпочтительно указанная аминокислотная мутация не может снижать связывание с FcRn-рецепторами. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен

25 содержит аминокислотную замену в положении P329. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G в каждой из его субъединиц.

30 С другой стороны, могут иметь место ситуации, при которых требуется повышать эффекторные функции иммуноконъюгатов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, конструируют так, чтобы он обладал измененной способностью связываться с Fc-рецептором, в частности, с Fcγ-рецептором, более конкретно с FcγIIIa-рецептором, и/или измененной эффекторной

функцией, при этом, измененное связывание и/или измененная эффекторная функция представляет собой повышенное связывание и/или повышенную эффекторную функцию. В одном из таких вариантов осуществления изобретения Fc-домен конструируют так, чтобы он имел измененную олигосахаридную структуру по сравнению не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В конкретном таком варианте осуществления изобретения Fc-домен имеет повышенное относительное содержание нефукозилированных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В более конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 70% нефукозилированных олигосахаридов. В другом конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен имеет повышенное относительное содержание бисекционных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен имеет повышенное относительное содержание бисекционных нефукозилированных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная измененная олигосахаридная структура является результатом повышенной активности  $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII) в клетке-хозяине, применяемой для экспрессии иммуноконъюгата.

Конкретным объектом изобретения являются иммуноконъюгаты, которые содержат первый и второй антигенсвязывающий фрагмент, Fc-домен, состоящий из двух субъединиц, эффекторный фрагмент, в которых присутствует не более одного эффекторного фрагмента. В одном из вариантов осуществления изобретения первый и второй антигенсвязывающий фрагмент и Fc-домен представляют собой часть молекулы иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат практически состоит из молекулы иммуноглобулина и эффекторного фрагмента и необязательно одной или нескольких линкерных последовательностей. В конкретном варианте осуществления изобретения молекула иммуноглобулина представляет собой иммуноглобулин класса IgG. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин подкласса IgG<sub>1</sub>. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент

слит с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, необязательно через линкерный пептид.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит молекулу иммуноглобулина, которая  
5 содержит два антигенсвязывающих фрагмента и Fc-домен, и эффекторный фрагмент, слитый с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, в котором присутствует не более одного эффекторного  
фрагмента и в котором Fc-домен конструируют так, чтобы он обладал пониженной способностью связываться с Fc-рецептором, в частности,  
10 измененной способностью связываться с Fc $\gamma$ -рецептором, и/или пониженной эффекторной функцией.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный первый антигенсвязывающий фрагмент или указанные первый и второй антигенсвязывающие фрагменты направлены к антигену, ассоциированному с  
15 патологическим состоянием, такому как антиген, который презентуется на опухолевой клетке или в окружении опухолевой клетки, в области воспаления или в инфицированной вирусом клетке. В более конкретном варианте осуществления изобретения указанный антиген выбирают из группы, включающей белок активации фибробластов (фибробласт-активирующий белок)  
20 (FAP), A1-домен тенасцина-С (TNC A1), A2-домен тенасцина-С (TNC A2), экстра-домен В фибронектина (EDB), карциноэмбриональный антиген (CEA) и ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP).

В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный фрагмент представляет собой одноцепочечный эффекторный фрагмент. В конкретном  
25 варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент представляет собой цитокин. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный цитокин выбирают из группы, включающей IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ . В конкретном варианте осуществления изобретения указанный цитокин представляет собой IL-2. В еще более предпочтительном варианте  
30 осуществления изобретения указанный цитокин представляет собой мутантный полипептид IL-2, обладающий пониженной аффинностью связывания с  $\alpha$ -субъединицей IL-2-рецептора. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный мутантный полипептид IL-2 содержит аминокислотную

замену в одном или нескольких положениях, выбранных из положений, которые соответствуют остаткам 42, 45 и 72 человеческого IL-2. В другом конкретном варианте осуществления изобретения цитокин представляет собой IL-10. Еще в одном варианте осуществления изобретения цитокин представляет собой IL-15, прежде всего мутантный полипептид IL-15, обладающий пониженной способностью связываться с  $\alpha$ -субъединицей IL-15-рецептора. В другом варианте осуществления изобретения цитокин представляет собой IFN- $\alpha$ .

Другим объектом изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, или его фрагмент.

Изобретение относится также к экспрессионному вектору, содержащему выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, и клетке-хозяину, содержащей выделенный полинуклеотид или экспрессионный вектор, предлагаемый в изобретении. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, в частности, клетку млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетку-хозяина подвергают манипуляциям, приводящим к экспрессии повышенных уровней одного или нескольких полипептидов, обладающих активностью  $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII). В одном из указанных вариантов осуществления изобретения клетку-хозяина подвергают дополнительной манипуляции, приводящей к экспрессии повышенных уровней одного или нескольких полипептидов, обладающих активностью  $\alpha$ -маннозидазы II (ManII).

Другим объектом изобретения является способ получения иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, заключающийся в том, что осуществляют стадии, на которых а) культивируют клетку-хозяина, предлагаемую в изобретении, в условиях, пригодных для экспрессии иммуноконъюгата, и б) выделяют иммуноконъюгат. Изобретение относится также к иммуноконъюгату, полученному способом, предлагаемым в изобретении.

Изобретение относится также к фармацевтической композиции, содержащей иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель.

Изобретение относится также к способам применения иммуноконъюгатов и фармацевтических композиций, предлагаемых в изобретении. Одним из объектов изобретения является иммуноконъюгат или фармацевтическая композиция, предлагаемый/предлагаемая в изобретении, для применения в качестве лекарственного средства. Одним из объектов изобретения является иммуноконъюгат или фармацевтическая композиция, предлагаемый/предлагаемая в изобретении, для применения для лечения заболевания у индивидуума, который нуждается в этом. В конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В других вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой воспалительное нарушение. В указанном конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит эффекторный фрагмент IL-10.

Предложено также применения иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения заболевания у индивидуума, который нуждается в этом; а также способ лечения заболевания у индивидуума, заключающийся в том, что вводят указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве композицию, содержащую иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, в фармацевтически приемлемой форме. В конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В других вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой воспалительное нарушение. В указанном конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит эффекторный фрагмент IL-10.

В любом из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения индивидуум предпочтительно представляет собой млекопитающее, в частности человека.

Следующим объектом изобретения является конъюгат, содержащий первую молекулу Fab, которая не связывается специфически ни с каким антигеном, Fc-домен, состоящий из двух субъединиц, и эффекторный фрагмент, где в конъюгате присутствует не более одного эффекторного фрагмента. В конкретном варианте осуществления изобретения первая молекула Fab содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 297. В

одном из вариантов осуществления изобретения конъюгат содержит (I) молекулу иммуноглобулина, которая содержит первую и вторую молекулу Fab, которая не связывается специфически ни с каким антигеном, и Fc-домен и (II) эффекторный фрагмент, где в конъюгате присутствует не более одного эффекторного

5 фрагмента. В одном из вариантов осуществления изобретения молекула иммуноглобулина представляет собой иммуноглобулин класса IgG, в частности иммуноглобулин подкласса IgG1. В конкретном варианте осуществления изобретения молекула иммуноглобулина содержит последовательность

10 переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и последовательность переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 297. В частности, последовательность переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и последовательность переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 297 входят в первую и вторую молекулу Fab молекулы иммуноглобулина. В одном из

15 вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент слит с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, необязательно через линкерный пептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен конъюгата конструируют так, чтобы он обладал

20 пониженной способностью связываться с Fc-рецептором, в частности, пониженной способностью связываться с Fcγ-рецептором, и/или пониженной эффекторной функцией, в частности, пониженной ADCC. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен конъюгата содержит

25 аминокислотные замены L234A, L235A и P329G в каждой из его субъединиц. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен конъюгата содержит модификацию, усиливающую гетеродимеризацию двух неидентичных

30 полипептидных цепей. В конкретном варианте осуществления изобретения модификация представляет собой модификацию типа «knob-in-hole» («выступ-впадина»), которая включает модификацию, приводящую к образованию «выступа» в одной из субъединиц Fc-домена и «впадины» в другой из указанных

двух субъединиц Fc-домена. В конкретном варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент слит с амино- или карбоксиконцевой аминокислотой

субъединицы Fc-домена, содержащей модификацию, приводящую к образованию «выступа». В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент представляет собой цитокин, в частности, IL-2. Кроме



того, конъюгат может включать индивидуально или в сочетании друг с другом любую из характерных особенностей, указанных выше при описании форматов, Fc-домена или эффекторного фрагмента иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении.

5 Изобретение относится также к выделенному полинуклеотиду, кодирующему конъюгат, предлагаемый в изобретении, или его фрагмент. В конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид содержит последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 10 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 298 или SEQ ID NO: 300. В изобретении предложен также экспрессионный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид, и клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид или экспрессионный вектор, предлагаемый в изобретении. Другим объектом изобретения является способ получения конъюгата, предлагаемого в изобретении, заключающийся в том, что 15 осуществляют стадии, на которых а) культивируют клетку-хозяина, предлагаемую в изобретении, в условиях, пригодных для экспрессии конъюгата, и б) выделяют конъюгат. Изобретение относится также к конъюгату, полученному способом, предлагаемым в изобретении.

Изобретение относится также к фармацевтической композиции, которая 20 содержит конъюгат, предлагаемый в изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель. Кроме того, конъюгат можно использовать в указанных в настоящем описании способах применения иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении.

#### Краткое описание чертежей

25 На чертежах показано:

на фиг. 1 - схематическое изображение типичного иммуноконъюгата иммуноглобулин-цитокин, известного в данной области, в котором цитокин (обозначен точками) слит с С-концом каждой из двух тяжелых цепей иммуноглобулина;

30 на фиг. 2 – схематическое изображение новых иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, которые содержат не более одного эффекторного фрагмента (обозначен точками). Эффекторный фрагмент слит, необязательно через линкерный пептид (серые прямоугольники) с карбоксиконцевой (формат А

и Б) или аминоконцевой аминокислотой (формат В) Fc-домена. Иммуноконъюгат содержит один (формат Б и В) или большее количество (как правило, два, формат А) антигенсвязывающих фрагментов, которые могут представлять собой Fab-фрагменты, содержащие переменные домены тяжелой и легкой цепи антитела (обозначены косыми линиями). Fc-домен может содержать модификацию, усиливающую гетеродимеризацию двух неидентичных полипептидных цепей (черная точка), и/или модификацию, приводящую к изменению способности связываться с Fc-рецептором и/или к изменению эффекторной функции (черная звезда);

5 на фиг. 3 – результаты очистки иммуноконъюгата на основе IgG клона 4G8 и четырехмутантного (qm) IL-2 (IgG-IL-2 qm), мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex Бис-Трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS. Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с Супердекс 200 (содержание мономера 97%);

15 на фиг. 4 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе 28H1 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (в восстанавливающих условиях: NuPAGE Novex Бис-Трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS; в невосстанавливающих условиях: NuPAGE трис-ацетат (фирма Invitrogen), трис-ацетатный подвижный буфер). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с Супердекс 200 (содержание мономера 100%);

20 на фиг. 5 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе 28H1 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, из СНО-клеток. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex Бис-Трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS). Г) Результаты,

30

полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с Супердекс 200 (содержание мономера 100%);

на фиг. 6 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе 4B9 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный на 5 стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex Бис-Трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS. Г) Результаты, полученные с 10 помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с Супердекс 200 (содержание мономера 100%);

на фиг. 7 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе СН1А1А 98/99× 2F1 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является СЕА. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для 15 конечного продукта с помощью аналитического капиллярного электрофореза в присутствии ДСН (фирма Caliper). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с TSKgel G3000 SW XL (содержание мономера 98,8%);

на фиг. 8 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе 2B10 IgG-IL-2 20 qm, мишенью которого является ТНС А2. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического капиллярного электрофореза в присутствии ДСН (фирма Caliper). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель- 25 фильтрации конечного продукта на колонке с TSKgel G3000 SW XL (содержание мономера 100%);

на фиг. 9 - результаты очистки не имеющего специфической мишени («ненаправленного») иммуноконъюгата на основе DP47GS IgG-IL-2 qm. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. 30 Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex Бис-Трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер

МОПС). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с Супердекс 200 (содержание мономера 100%);

на фиг. 10 – результаты анализа связывания иммуноконъюгата на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, с человеческим FAP, экспрессируемым на стабильно трансфектированных клетках НЕК 293, полученные с помощью FACS, в сравнении с соответствующей конструкцией Fab-IL-2 qm-Fab;

на фиг. 11 – данные о высвобождении интерферона (IFN)- $\gamma$  из NK92-клеток, индуцированном иммуноконъюгатом на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, в растворе в сравнении с конструкцией на основе 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab;

на фиг. 12 – результаты определения фосфорилированного STAT5 с помощью FACS в различных типах клеток после стимуляции в течение 20 мин иммуноконъюгатом на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, в растворе в сравнении с конструкциями на основе 28H1 Fab-IL-2-Fab и Fab-IL-2 qm-Fab, а также с пролейкином. А) NK-клетки ( $CD3^-CD56^+$ ); Б)  $CD8^+$ -Т-клетки ( $CD3^+CD8^+$ ); В)  $CD4^+$ -Т-клетки ( $CD3^+CD4^+CD25^-CD127^+$ ); Г) регуляторные Т-клетки ( $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ );

на фиг. 13 - результаты анализа связывания иммуноконъюгата на основе 2B10 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является TNC A2, и соответствующего неконъюгированного IgG с TNC A2, экспрессируемым на U87MG-клетках, полученные с помощью FACS;

на фиг. 14 – данные об индукции пролиферации NK92-клеток с помощью иммуноконъюгатов на основе 2B10 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является TNC A2, на основе CH1A1A 98/99 $\times$  2F1 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является СЕА, и на основе CH1A1A 98/99 $\times$  2F1 IgG-IL-2 wt, мишенью которого является СЕА;

на фиг. 15 - данные об индукции пролиферации NK92-клеток с помощью иммуноконъюгатов, мишенью которого является FAP, таких как 4B9 IgG-IL-2 qm и 4B9 IgG-IL-2 wt;

на фиг. 16 – данные об уничтожении (полученные путем измерения высвобождения LDH) сверхэкспрессирующих СЕА опухолевых клеток линии A549 с помощью РВМС посредством ADCC, обусловленной созданными с

помощью гликоинженерии (ge) и дикого типа (wt) иммуноконъюгатами на основе CH1A1A IgG-IL-2 qm, в сравнении с неконъюгированным созданным с помощью гликоинженерии IgG CH1A1A;

на фиг. 17 – результаты очистки «ненаправленного» иммуноконъюгата DP47GS IgG-IL-2 wt. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex Бис-Трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с Супердекс 200 (содержание мономера 99,6%);

на фиг. 18 – результаты очистки иммуноконъюгата на основе 28H1 IgG-IL-2, мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex Бис-Трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS. Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с Супердекс 200 (содержание мономера 99,6%);

на фиг. 19 – результаты очистки иммуноконъюгата на основе CH1A1A 98/99× 2F1 IgG-IL-2 wt, мишенью которого является СЕА. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического капиллярного электрофореза в присутствии ДСН (фирма Caliper). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с TSKgel G3000 SW XL (содержание мономера 100%);

на фиг. 20 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе 4B9 IgG-IL-2 wt, мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный при объединении аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Б) Масштабированное изображение профиля элюции, полученного с помощью гель-фильтрации на стадии А. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex Бис-Трис-

минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с TSKgel G3000 SW XL (содержание мономера 98,5%);

на фиг. 21 – результаты анализа конструкции 2B10 IgG-IL-10M1, полученные с помощью А) аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex Бис-Трис-минигель (фирма Invitrogen), буфер для образца NuPAGE LDS (4×), который выдерживали в течение 10 мин при 70°C, MOPS-буфер, 160 В, 60 мин, маркер молекулярной массы (MW) Mark 12, неокрашенный стандарт (фирма Invitrogen, М) в восстанавливающих (1) и невосстанавливающих (2) условиях. Б) Результаты оценки аффинности конструкции 2B10 IgG-IL-10M1 к человеческому TNC A2 на основе SPR (ProteOn XPR36) путем глобальной аппроксимации с применением модели взаимодействия 1:1 (чип: NLC; лиганд: TNCA2 (250 RU); анализируемое вещество: 2B10 IgG-IL-10M1, мишенью которого является TNCA2 (TNCA2 2B10 IgG-IL-10M1), 164 кДа; диапазон концентраций анализируемого вещества: 50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0нМ; продолжительность ассоциации: 180 с; продолжительность диссоциации: 600 с; скорость потока: 50 мкл/мин;  $k_{on}$   $1,80 \times 10^6$  1/Мс;  $k_{off}$ :  $9,35 \times 10^{-5}$  1/с;  $K_D$ : 52пМ). В) Результаты оценки аффинности конструкции 2B10 IgG-IL-10M1 к человеческому IL-10R1 на основе SPR (ProteOn XPR36) путем глобальной аппроксимации с применением модели взаимодействия 1:1 (чип: NLC; лиганд: IL-10R1 (1600 RU); анализируемое вещество: 2B10 IgG-IL-10M1, мишенью которого является TNCA2, 164 кДа; диапазон концентраций анализируемого вещества: 50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0нМ; продолжительность ассоциации: 180 с; продолжительность диссоциации: 600 с; скорость потока: 50 мкл/мин;  $k_{on}$   $5,56 \times 10^5$  1/Мс;  $k_{off}$ :  $2,89 \times 10^{-4}$  1/с;  $K_D$ : 520пМ);

на фиг. 22 – результаты анализа конструкции 4G8 IgG-IL-10M1, полученные с помощью А) аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex Бис-Трис-минигель (фирма Invitrogen), буфер для образца NuPAGE LDS (4×), который выдерживали в течение 10 мин при 70°C, MOPS-буфер, 160 В, 60 мин, маркер молекулярной массы (MW) Mark 12, неокрашенный стандарт (фирма Invitrogen, М) в восстанавливающих (1) и невосстанавливающих (2) условиях. Б) Результаты оценки аффинности конструкции 4G8 IgG-IL-10M1 к человеческому FAP на основе SPR (ProteOn XPR36) путем глобальной аппроксимации с

применением модели взаимодействия 1:1 (чип: GLM; лиганд: huFAP (500 RU); анализируемое вещество: FAP 4G8 IgG-IL-10M1, 164 кДа; диапазон концентраций анализируемого вещества: 10, 2, 0,4, 0,08, 0нМ; продолжительность ассоциации: 180 с; продолжительность диссоциации: 600 с; скорость потока: 50 мкл/мин;  $k_{on}$   $6,68 \times 10^5$  1/Мс;  $k_{off}$ :  $1,75 \times 10^{-5}$  1/с;  $K_D$ : 26пМ).

5 В) Результаты оценки аффинности конструкции 4G8 IgG-IL-10M1 к человеческому IL-10R1 на основе SPR (ProteOn XPR36) путем глобальной аппроксимации с применением модели взаимодействия 1:1 (чип: NLC; лиганд: IL 10R1 (1600 RU); анализируемое вещество: 4G8 IgG-IL-10M1, мишенью которого является FAP, 164 кДа; диапазон концентраций анализируемого вещества: 50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0нМ; продолжительность ассоциации: 180 с; продолжительность диссоциации: 600 с; скорость потока: 50 мкл/мин;  $k_{on}$ :  $3,64 \times 10^5$  1/Мс;  $k_{off}$ :  $2,96 \times 10^{-4}$  1/с;  $K_D$ : 815пМ);

на фиг. 23 – результаты очистки иммуноконъюгата на основе 4B9 «1+1» IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный при объединении аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Б) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex Бис-Трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS). В) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с TSKgel G3000 SW XL (содержание мономера 99,2%);

на фиг. 24 – результаты очистки иммуноконъюгата на основе 28H1 «1+1» IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный при объединении аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Б) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex Бис-Трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS). В) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с TSKgel G3000 SW XL (содержание мономера 100%);

30 на фиг. 25 – результаты очистки иммуноконъюгата на основе 4B9 «1+1» IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный при объединении аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Б) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического

ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex Бис-Трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS). В) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с TSKgel G3000 SW XL (содержание мономера 98,6%);

5 на фиг. 26 – результаты очистки иммуноконъюгата на основе 4B9 «1+1» IgG IFN- $\alpha$ , мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического капиллярного электрофореза в присутствии ДСН  
10 (фирма Caliper). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с TSKgel G3000 SW XL (содержание мономера 92,8%);

на фиг. 27 – данные об индукции пролиферации NK92-клеток с помощью иммуноконъюгатов 4B9 «1+1» IgG-IL-2 qm и 28H1 «1+1» IgG-IL-2 wt, мишенью  
15 которых является FAP, в сравнении с соответствующими конструкциями IgG-IL-2;

на фиг. 28 - данные о пролиферации активированных ФГА (фитогеммагглютинин) CD4-Т-клеток (А) и CD8-Т-клеток (Б), индуцированной иммуноконъюгатами 4B9 «1+1» IgG-IL-7 и 4B9 «1+1» IgG-IL-2 qm в сравнении с  
20 конструкциями IgG-IL-2 qm и IgG-IL-2 wt;

на фиг. 29 - данные об индукции пролиферации клеток Дауди с помощью 4B9 «1+1» IgG-IFN- $\alpha$  в сравнении с рофероном А;

на фиг. 30 – концентрации в сыворотке включающих IL-2 иммуноконъюгатов после однократного i.v.-введения конструкций, мишенью  
25 которых является FAP (А), и «ненаправленных» конструкций IgG-IL-2 (Б), которые содержат либо дикого типа (wt), либо четырехмутантный (qm) IL-2;

на фиг. 31 – данные о распределении в тканях конструкций 28H1 IgG-IL qm, мишенью которых является FAP, в сравнении с неконъюгированными 28H1 IgG и 4B9 IgG, мишенью которых является FAP, а также с «ненаправленным»  
30 DP47GS IgG, через 24 ч после i.v.-инъекции;

на фиг. 32 - данные о связывании иммуноконъюгатов 28H1 IgG-IL-2 qm и 28H1 IgG-(IL-2 qm)<sub>2</sub> с NK92-клетками, полученные с помощью FACS;



на фиг. 33 – данные о пролиферации NK-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28H1-IL-2, мишенью которых является FAP, или с пролейкином в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней;

5 на фиг. 34 - данные о пролиферации CD4-T-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28H1-IL-2, мишенью которых является FAP, или с пролейкином в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней;

на фиг. 35 - данные о пролиферации CD8-T-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28H1-IL-2, мишенью которых является FAP, или с пролейкином в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней;

10 на фиг. 36 – данные о пролиферации предварительно активированных CD8- (А) и CD4-T-клеток (Б) после инкубации в течение 6 дней с различными содержащими IL-2 иммуноконъюгатами;

на фиг. 37 – данные об индуцированной активацией клеточной гибели CD3<sup>+</sup>-T-клеток после инкубации в течение 6 дней с различными содержащими IL-2 иммуноконъюгатами и обработки в течение ночи антителом к Fas;

15 на фиг. 38 – концентрации в сыворотке включающих IL-2 иммуноконъюгатов после однократного i.v.-введения «ненаправленных» конструкций DP47GS IgG-IL-2, содержащих либо дикого типа (А), либо четырехмутантный IL-2 (Б);

20 на фиг. 39 – данные о связывании DP47GS IgG с различными антигенами. Связывание оценивали с помощью анализа на основе ELISA с использованием антигенов, иммобилизованных на планшете. Человеческое антитело в виде IgG1, которое обладает способностью к неспецифическому связыванию практически со всеми иммобилизованными антигенами, применяли в качестве

25 положительного контроля, «пустые» образцы не содержали никакого антитела;

на фиг. 40 – данные о связывании DP47GS IgG с мутацией LALA P329G или без указанной мутации в Fc-домене, с субпопуляциями необработанных (А), активированных ФГА-L (Б) и повторно стимулированных (В) человеческих РВМС, полученные с помощью FACS-анализа. Левая верхняя панель: В-клетки (А, Б) или CD4<sup>+</sup>-Т клетки (В); верхняя правая панель: CD8<sup>+</sup>-Т-клетки; нижняя левая панель: NK-клетки; нижняя правая панель: CD14<sup>+</sup>-клетки (моноциты/нейтрофилы).

30

## Подробное описание изобретения

### Определения

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

5 В контексте настоящего описания понятие «конъюгат» относится к молекуле слитого полипептида, которая включает одну эффекторную молекулу и дополнительную пептидную молекулу, в частности, молекулу иммуноглобулина.

10 В контексте настоящего описания понятие «иммуноконъюгат» относится к молекуле слитого полипептида, которая включает один эффекторный фрагмент, по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент и Fc-домен, при условии, что присутствует не более одного эффекторного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит одну эффекторную молекулу, два антигенсвязывающих фрагмента и Fc-домен. В частности, иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, практически  
15 состоят из одного эффекторного фрагмента, двух антигенсвязывающих фрагментов и Fc-домена, сцепленных с помощью одной или нескольких линкерных последовательностей. Антигенсвязывающий фрагмент и эффекторный фрагмент могут быть связаны с Fc-доменом с помощью различных взаимодействий и в различных конфигурациях, указанных в настоящем  
20 описании. В конкретном варианте осуществления изобретения два антигенсвязывающих фрагмента и Fc-домен сцеплены друг с другом в такой конфигурации, чтобы образовывать полную молекулу иммуноглобулина. Иммуноконъюгат в контексте настоящего изобретения представляет собой слитый белок, т.е. компоненты иммуноконъюгата связаны друг с другом  
25 пептидными связями, либо непосредственно, либо через линкерные пептиды.

В контексте настоящего описания понятие «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептидной молекуле, которая специфически связывается с антигенной детерминантой. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью направлять  
30 субстанцию, к которой он присоединен (например, эффекторный фрагмент или второй антигенсвязывающий фрагмент), к сайту-мишени, например, к специфическому типу опухолевой клетки или стромы опухоли, несущей антигенную детерминанту. Антигенсвязывающие фрагменты включают антитела

и их фрагменты, что будет дополнительно описано ниже. Предпочтительные антигенсвязывающие фрагменты включают антигенсвязывающий домен антитела, который содержит переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты могут включать константные области антитела, что будет дополнительно описано ниже и известно в данной области. Пригодные константные области тяжелых цепей включают любой из пяти изотипов:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  или  $\mu$ . Пригодные константные области легких цепей включают любой из двух изотипов:  $\kappa$  и  $\lambda$ .

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

25 Понятие «специфически связывается» означает, что связывание является избирательным в отношении антигена и его можно отличать от нежелательных или неспецифических взаимодействий. Способность антигенсвязывающего фрагмента связываться со специфической антигенной детерминантой можно определять с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA) или других методик, известных специалисту в данной области, например, с помощью методики на основе резонанса поверхностного плазмона (осуществляя анализ с помощью устройства BIAcore) (Liljeblad и др., Glyco J 17, 2000, сс. 323-329), и традиционных анализов связывания (Heeley, Endocr Res 28, 2002, сс. 217-229). В 30 одном из вариантов осуществления изобретения уровень связывания антигенсвязывающего фрагмента с неродственным белком составляет менее чем примерно 10% от уровня связывания антигенсвязывающего фрагмента с

антигеном, измеренного, например, с помощью SPR. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с антигеном, или иммуноконъюгат, содержащий антигенсвязывающий фрагмент, характеризуется величиной константы диссоциации ( $K_D$ ), составляющей  $\leq 1\text{мкМ}$ ,  $\leq 100\text{нМ}$ ,  $\leq 10\text{нМ}$ ,  $\leq 1\text{нМ}$ ,  $\leq 0,1\text{нМ}$ ,  $\leq 0,01\text{нМ}$  или  $\leq 0,001\text{нМ}$  (например,  $10^{-8}\text{М}$  или менее, например, от  $10^{-8}\text{М}$  до  $10^{-13}\text{М}$ , например, от  $10^{-9}\text{М}$  до  $10^{-13}\text{М}$ ).

Понятие «аффинность» относится к суммарной силе всех нековалентных взаимодействий между индивидуальным сайтом связывания молекулы (например, рецептора) и ее партнера по связыванию (например, лиганда). Если не указано иное, то в контексте настоящего описания понятие «аффинность связывания» относится к присущей компонентам связывающейся пары (например, рецептору и лиганду) аффинности связывания, отражающей взаимодействие по типу 1:1. Аффинность молекулы X к ее партнеру Y можно, как правило, характеризовать с помощью константы диссоциации ( $K_D$ ), которая представляет собой отношение констант скорости реакции диссоциации и ассоциации ( $k_{\text{off}}$  и  $k_{\text{on}}$  соответственно). Так, эквивалентные аффинности могут соответствовать различным константам скорости, если соотношение констант скорости остается таким же. Аффинность можно оценивать общепринятыми методами, известными в данной области, включая представленные в настоящем описании. Конкретным методом измерения аффинности является резонанс поверхностного плазмона (SPR).

Понятие «пониженное связывание (пониженная способность к связыванию)», например, пониженная способность к связыванию с Fc-рецептором или CD25, относится к снижению аффинности касательно соответствующего взаимодействия, измеренной, например, с помощью SPR. Для ясности следует отметить, что понятие включает также снижение аффинности до нуля (или ниже предела обнаружения аналитического метода), т.е. полную элиминацию взаимодействия. И, наоборот, «повышенное связывание (повышенная способность к связыванию)» относится к повышению аффинности связывания касательно соответствующего взаимодействия.

В контексте настоящего описания понятия «первый» и «второй» касательно антигенсвязывающих фрагментов и т.д. применяют с целью удобства разделения, когда присутствует более одного типа каждого из фрагментов. Применение этих понятий не подразумевает их конкретный порядок или ориентацию в иммуноконъюгате, если специально не указано иное.

В контексте настоящего описания понятие «эффекторный фрагмент» относится к полипептиду, например, белку или гликопротеину, который оказывает влияние на клеточную активность, например, через трансдукцию сигналов или посредством других клеточных путей. Таким образом, эффекторный фрагмент, предлагаемый в изобретении, может быть ассоциирован с опосредуемой рецептором передачей сигналов, что приводит к передаче сигнала от наружной части клеточной мембраны, модулируя ответ в клетке, которая несет один или несколько рецепторов эффекторного фрагмента. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент может вызывать цитотоксический ответ в клетках, несущих рецепторы эффекторного фрагмента. В другом варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент может вызывать пролиферативный ответ в клетках, несущих один или несколько рецепторов эффекторного фрагмента. В другом варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент может вызывать дифференцировку клеток, несущих один или несколько рецепторов эффекторного фрагмента. В другом варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент может изменять экспрессию (т.е. может обладать способностью осуществлять повышающую регуляцию или понижающую регуляцию) эндогенного клеточного белка в клетках, несущих рецепторы эффекторного фрагмента. Примерами эффекторных фрагментов являются (но, не ограничиваясь только ими) цитокины, факторы роста, гормоны, ферменты, субстраты и кофакторы. Эффекторный фрагмент может быть ассоциирован с антигенсвязывающим фрагментом или Fc-доменом в различных конфигурациях с образованием иммуноконъюгата.

В контексте настоящего описания понятие «цитокин» относится к молекуле, которая опосредует и/или регулирует биологическую или клеточную функцию или процесс (например, иммунитет, воспаление и гематопоз). Понятие «цитокин» в контексте настоящего описания относится к «лимфокинам»,

«хемокинам», «монокинам» и «интерлейкинам». Примерами пригодных для применения цитокинов являются (но, не ограничиваясь только ими) GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  и TNF- $\beta$ . Конкретные цитокины представляют собой IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ . В конкретных вариантах осуществления изобретения цитокин представляет собой человеческий цитокин. В контексте настоящего описания подразумевается также, что понятие «цитокин» включает также варианты цитокина, содержащие одну или несколько аминокислотных мутаций в аминокислотных последовательностях соответствующего цитокина дикого типа, такие, например, как варианты IL-2, описанные у Sauvé и др., Proc Natl Acad Sci USA 88, 1991, сс. 4636-4640; Hu и др., Blood 101, 2003, сс. 4853-4861 и в публикации патента США № 2003/0124678; у Shanafelt и др., Nature Biotechnol 18, 2000, сс. 1197-1202; Heaton и др., Cancer Res 53, 1993, сс. 2597-2602 и в US № 5229109; в публикации патента США № 2007/0036752; WO 2008/0034473; WO 2009/061853; или публикации РСТ заявки на патент РСТ/EP2012/051991. Другие варианты цитокинов, например, варианты IL-15, представлены в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения цитокины подвергали мутации для элиминации гликозилирования.

В контексте настоящего описания понятие «одноцепочечный» относится к молекуле, содержащей аминокислотные мономеры, связанные линейно посредством пептидных связей. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент представляет собой одноцепочечный эффекторный фрагмент. Примерами одноцепочечных эффекторных фрагментов являются (но, не ограничиваясь только ими) цитокины, факторы роста, гормоны, ферменты, субстраты и кофакторы. Когда эффекторный фрагмент представляет собой цитокин, и представляющий собой интерес цитокин в норме в естественных условиях существует в виде мультимера, то каждая субъединица мультимерного цитокина последовательно кодируется одной цепью эффекторного фрагмента. Таким образом, примерами пригодных для применения одноцепочечных эффекторных фрагментов являются (но, не ограничиваясь только ими) GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-

7, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  и TNF- $\beta$ .

В контексте настоящего описания понятие «применяемый в качестве контроля эффекторный фрагмент» относится к неконъюгированному эффекторному фрагменту. Например, при осуществлении сравнения содержащего IL-2 иммуноконъюгата, предлагаемого в настоящем изобретении, и применяемого в качестве контроля эффекторного фрагмента, применяемый в качестве контроля эффекторный фрагмент представляет собой свободный неконъюгированный IL-2. Аналогично этому, например, при осуществлении сравнения содержащего IL-12 иммуноконъюгата, предлагаемого в настоящем изобретении, и применяемого в качестве контроля эффекторного фрагмента, применяемый в качестве контроля эффекторный фрагмент представляет собой свободный неконъюгированный IL-12 (например, существующий в виде гетеродимерного белка, когда субъединицы р40 и р35 соединены только дисульфидной(ыми) связью(ями)).

В контексте настоящего описания понятие «рецептор эффекторного фрагмента» относится к полипептидой молекуле, которая обладает способностью специфически связываться с эффекторным фрагментом. Например, когда эффекторный фрагмент представляет собой IL-2, рецептор эффекторного фрагмента, который связывается с IL-2 (например, с иммуноконъюгатом, который содержит IL-2), представляет собой рецептор IL-2. Аналогично этому, например, когда IL-12 представляет собой эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, то рецептором эффекторного фрагмента является рецептор IL-12. Когда рецепторный фрагмент специфически связывается более чем с одним рецептором, все рецепторы, которые специфически связываются с эффекторным фрагментом, представляют собой «рецепторы эффекторного фрагмента» для указанного эффекторного фрагмента.

Понятие «молекула иммуноглобулина» относится к белку, имеющему структуру встречающегося в естественных условиях антитела. Например, иммуноглобулины класса IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, связанных дисульфидными мостиками. В направлении от N-конца к C-концу каждая тяжелая цепь содержит переменную

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

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

Понятие «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примерами фрагментов антител являются (но, не ограничиваясь только ими) Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, димерные антитела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител (например, scFv) и однодоменные антитела. Обзор некоторых фрагментов антител см., например, у Hudson и др., Nat Med 9, 2003, сс. 129-134. Обзор scFv-фрагментов см., например, у Plückthun в: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, т. 113, под ред. Rosenberg и Moore, изд-во Springer-Verlag, New York, 1994, сс. 269-315; см. также WO 93/16185; и US №№ 5571894 и 5587458. Обсуждение Fab- и F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов, содержащих остатки эпитопа, связывающегося с рецептором спасения, и обладающих



удлиненным временем полужизни *in vivo*, см. в US № 5869046. Димерные антитела (диабоды) представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые могут быть двухвалентными или биспецифическими (см., например, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson и др., Nat Med 9, 2003, сс. 129-134; и Hollinger и др., Proc Natl Acad Sci USA 90, 1993, сс. 6444-6448. Тримерные (триабоды) и тетрамерные (тетрабоды) антитела описаны также у Hudson и др., Nat Med 9, 2003, сс. 129-134. Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь или часть переменного домена тяжелой цепи или весь или часть переменного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело (фирма Domantis, Inc., Waltham M.A.; см., например, US № 6248516 B1). Фрагменты антител можно создавать с помощью различных методик, включая (но, не ограничиваясь только ими) протеолитическое расщепление интактного антитела, а также получать с использованием рекомбинантных клеток-хозяев (например, *E. coli* или фага), как указано в настоящем описании.

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

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

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

Таблица 1. Определения CDR<sup>1</sup>

	Кэбот	Хотиа	АбМ <sup>2</sup>
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32	26-35
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	52-58	50-58
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	95-102	95-102

V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	24-32
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	50-56
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	89-97

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

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

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

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

«Каркасные участки» или «FR»-участки представляют собой участки переменных доменов, отличные от остатков гиперпеременных участков (HVR). FR переменной области, как правило, представлены четырьмя FR-доменами: FR1, FR2, FR3 и FR4. Таким образом, последовательности HVR и FR, как правило, расположены в VH (или VL) в следующем порядке: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Понятие «класс» антитела или иммуноглобулина относится к типу константного домена или константной области, содержащейся в тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них можно дополнительно подразделять на подклассы (изотипы),

например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub>. Константные домены тяжелых цепей, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, обозначают как  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$  соответственно.

В контексте настоящего описания понятие «Fc-домен» или «Fc-область» относится к C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Понятие относится к нативной последовательности Fc-областей и вариантам Fc-областей. Хотя пограничные последовательности Fc-области в тяжелой цепи IgG могут слегка варьироваться, как правило, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако C-концевой лизин (Lys447) Fc-области может либо присутствовать, либо отсутствовать. Если специально не указано иное, то нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константном участке соответствует системе EU-нумерации, которую называют также EU-индекс, описанной у Kabat и до., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Понятие «субъединица» Fc-домена в контексте настоящего описания относится к одному из двух полипептидов, образующих димерный Fc-домен, т.е. к полипептиду, который содержит C-концевые константные области тяжелой цепи иммуноглобулина, обладающие способностью к стабильной самоассоциации. Например, субъединица Fc-домена IgG содержит константный домен CH<sub>2</sub> IgG и CH<sub>3</sub> IgG.

«Модификация, усиливающая гетеродимеризацию» представляет собой манипуляцию с пептидным каркасом или пост-трансляционные модификации полипептида, которая уменьшает или препятствует ассоциации полипептида с идентичным полипептидом с образованием гомодимера. В контексте настоящего описания модификация, усиливающая гетеродимеризацию, включает, прежде всего, различные модификации, осуществляемые с каждым из двух полипептидов, которые требуются для образования димера, при этом, модификации дополняют друг друга таким образом, чтобы усиливать ассоциацию двух полипептидов. Например, модификация, усиливающая гетеродимеризацию, может изменять структуру или заряд одного или обоих полипептидов, требуемых для образования димера, таким образом, чтобы улучшать их ассоциацию стерически или электростатически соответственно.

Гетеродимеризация имеет место между двумя неидентичными полипептидами, такими как две субъединицы Fc-домена, при этом дополнительные компоненты иммуноконъюгата слитых друг с другом субъединиц (например, антигенсвязывающего фрагмента, эффекторного фрагмента) не являются  
5 одинаковыми. В иммуноконъюгатах, предлагаемых в настоящем изобретении, модификация, усиливающая гетеродимеризацию, затрагивает Fc-домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, усиливающая гетеродимеризацию, представляет собой аминокислотную мутацию, в частности, аминокислотную замену. В конкретном варианте осуществления изобретения  
10 модификация, усиливающая гетеродимеризацию, представляет собой индивидуальную аминокислотную мутацию, в частности, аминокислотную замену, в каждой из двух субъединиц Fc-домена.

Понятие «эффекторные функции», используемое в настоящем описании, относится к видам биологической активности, присущим Fc-области антитела, которые варьируются в зависимости от изотипа антитела. Примерами  
15 эффекторных функций антитела являются: способность связываться с C1q и комплементзависимая цитотоксичность (CDC), способность связываться с Fc-рецептором, антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC), антитело-обусловленный клеточнозависимый фагоцитоз (ADCP),  
20 секреция цитокинов, опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора); и активация B-клеток.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятия  
25 «конструирование, сконструированный, инженерия» включают любую манипуляцию с пептидным каркасом или пост-трансляционные модификации встречающегося в естественных условиях или рекомбинантного полипептида или его фрагмента. Инженерия включает модификации аминокислотной последовательности, схемы гликозилирования или группы боковых цепей  
30 индивидуальных аминокислот, а также комбинации указанных подходов.

Инженерия прежде всего с приставкой «глико», а также «инженерия гликозилирования (гликоинженерия)» (конструирование схемы гликозилирования) включает метаболическое конструирование механизма

гликозилирования клетки, в том числе генетические манипуляции, касающиеся путей олигосахаридного синтеза, с целью получения измененного гликозилирования гликопротеинов, экспрессируемых в клетках. Кроме того, конструирование схемы гликозилирования включает воздействия мутаций и клеточного окружения на гликозилирование. В одном из вариантов осуществления изобретения гликоинженерию осуществляют с целью изменения гликозилтрансферазной активности. В конкретном варианте осуществления изобретения инженерия позволяет изменять активность глюкозаминилтрансферазы и/или активность фукозилтрансферазы.

10 Гликоинженерию можно использовать для получения «клетки-хозяина, обладающей повышенной GnTIII-активностью», «клетки-хозяина, обладающей повышенной ManII-активностью» или «клетки-хозяина, обладающей повышенной  $\alpha(1,6)$  фукозилтрансферазной активностью».

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие «аминокислотная мутация» относится к аминокислотным заменам, делециям, инсерциям и модификациям. Можно применять любую комбинацию замены, делеции, инсерции и модификации для создания конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками, например, пониженной способностью связываться с Fc-рецептором или пониженной способностью связываться с CD25. Аминокислотная последовательность с делециями и инсерциями включает амино- и/или карбоксиконцевые делеции и инсерции аминокислот. Конкретными аминокислотными мутациями являются аминокислотные замены. Для изменения, например, характеристик связывания с Fc-областью или цитокином, таким как IL-2, наиболее предпочтительными являются неконсервативные аминокислотные замены, т.е. замена одной аминокислоты на другую аминокислоту, имеющую другие структурные и/или химические свойства. Аминокислотные замены включают замену на не встречающиеся в естественных условиях аминокислоты или на производные встречающихся в естественных условиях двадцати стандартных аминокислот (например, на 4-гидроксипролин, 3-метилгистидин, орнитин, гомосерин, 5-гидроксилизин). Аминокислотные мутации можно создавать с помощью генетических или химических методов, хорошо известных в данной области. Генетические методы могут включать

15

20

25

30

сайтнаправленный мутагенез, ПЦР, синтез генов и т.п. Подразумевается, что можно применять также методы изменения боковой группы аминокислоты, отличные от методов генетической инженерии, такие как химическая модификация. Для обозначения одной и той же аминокислотной мутации можно использовать различные обозначения. Например, замену пролина в положении 329 Fc-домена на глицин можно обозначать как 329G, G329, G<sub>329</sub>, P329G или Pro329Gly.

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

обозначают как полипептиды, имеющие укладку, а полипептиды, которые не обладают определенной трехмерной структурой, но которые легче могут адаптироваться к большому количеству различных конформаций, обозначают как полипептиды, не имеющие укладку.

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

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



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

$$100 \times \text{частное } X/Y,$$

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

последовательностей получают согласно процедуре, описанной в последнем из предшествующих параграфов, с помощью компьютерной программы ALIGN-2.

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

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

Выделенные молекулы РНК включают полученные *in vivo* или *in vitro* РНК-транскрипты, предлагаемые в настоящем изобретении, а также формы с  
25 позитивной и негативной цепью и двухцепочечные формы. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты, предлагаемые в настоящем изобретении, включают также указанные молекулы, полученные с помощью синтеза. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота может представлять собой или может включать регуляторный элемент, такой как  
30 промотор, сайт связывания рибосом или терминатор транскрипции.

Под нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом, имеющей/имеющим нуклеотидную последовательность, которая, например, на 95% «идентична» нуклеотидной референс-последовательности, предлагаемой в настоящем

изобретении, подразумевается, что нуклеотидная последовательность полинуклеотида идентична референс-последовательности за исключением того, что полинуклеотидная последовательность может включать вплоть до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов нуклеотидной референс-последовательности. Другими словами, для получения полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 95% нуклеотидной референс-последовательности, вплоть до 5% нуклеотидов в референс-последовательности можно изымать путем делеции или заменять на другой нуклеотид, или вплоть до 5% нуклеотидов от общего количества нуклеотидов в референс-последовательности можно встраивать в референс-последовательность. Эти изменения референс-последовательности могут иметь место в положениях на 5'- или 3'-конце нуклеотидной референс-последовательности или в ином положении между этими концевыми положениями, и их встраивают либо индивидуально между остатками в референс-последовательности, либо их встраивают в референс-последовательность в виде одной или нескольких смежных групп. На практике решение вопроса о том, идентична ли конкретная полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, можно решать, как правило, с использованием известных компьютерных программ, например, указанных выше для полипептидов (например, ALIGN-2).

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

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

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

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

В контексте настоящего описания понятия «клетка-хозяин», «клеточная линия-хозяин» и «клеточная культура-хозяин» используются взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые интродуцирована экзогенная нуклеиновая  
25 кислота, включая потомство указанных клеток. К клеткам-хозяевам относятся «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первичные трансформированные клетки, а также потомство, выведенное из них, независимо от количества пересевов. Потомство может не быть строго идентичным родительской клетке по составу нуклеиновых кислот, а может нести  
30 мутации. Под данное понятие подпадает мутантное потомство, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, что и отобранная путем скрининга или селекции исходная трансформированная клетка. Клетка-хозяин представляет собой клеточную систему любого типа, которую можно применять

для создания иммуноконъюгатов, предлагаемых в настоящем изобретении. В одном из вариантов осуществления изобретения клетку-хозяина конструируют так, чтобы можно было получать иммуноконъюгат с модифицированными олигосахаридами в его Fc-области. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки-хозяева можно подвергать манипуляциям для экспрессии повышенных уровней одного или нескольких полипептидов, обладающих активностью  $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозамилтрансферазы III (GnTIII). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки-хозяева подвергают дополнительным манипуляциям для экспрессии повышенных уровней одного или нескольких полипептидов, обладающих активностью  $\alpha$ -маннозидазы II (ManII). Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, такие как (но, не ограничиваясь только ими) CHO-клетки, ВНК-клетки, NS0-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы линии YO, клетки мышинной миеломы линии P3X63, PER-клетки, PER.C6-клетки или клетки гибридомы, клетки дрожжей, клетки насекомых и клетки растений, но также клетки, находящиеся в трансгенном животном, трансгенном растении или в культивируемой растительной или животной ткани.

В контексте настоящего описания понятие «полипептид, обладающий GnTIII-активностью» относится к полипептидам, которые обладают способностью катализировать добавление остатка N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) в  $\beta$ -1-4-связи к  $\beta$ -связанному маннозиду триманнозильного ядра N-связанных олигосахаридов. Понятие относится к слитым полипептидам, которые обладают ферментативной активностью, подобной, но не обязательно идентичной, активности  $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III, также известной под названием  $\beta$ -1,4-маннозил-гликопротеин-4-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза (КФ 2.4.1.144) согласно номенклатуре Комитета Международного союза по биохимии и молекулярной биологии (Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)), при оценке с помощью конкретного биологического анализа как в случае зависимости от дозы, так и без зависимости от дозы. В случае, когда существует зависимость от дозы, фермент не должен быть обязательно идентичен GnTIII, а скорее он должен быть практически подобен ей в отношении зависимости данной активности от дозы по сравнению с GnTIII (т.е.

полипептид-«кандидат» должен обладать более высокой активностью или не более чем примерно в 25 раз пониженной активностью, предпочтительно не более чем примерно в 10 раз пониженной активностью, и еще более предпочтительно не более чем примерно в 3 раза пониженной активностью по сравнению с GnTIII.). В конкретных вариантах осуществления изобретения полипептид, обладающий GnTIII-активностью, представляет собой слитый полипептид, содержащий каталитический домен GnTIII и домен локализации в комплексе Гольджи гетерологичного полипептида, присутствующего в комплексе Гольджи. В частности, домен локализации в комплексе Гольджи представляет собой домен локализации маннозидазы II или GnTI, наиболее предпочтительно домен локализации маннозидазы II. Альтернативно этому, домен локализации в комплексе Гольджи выбирают из группы, включающей: домен локализации маннозидазы I, домен локализации GnTII и домен коровой  $\alpha$ 1,6-фукозилтрансферазы. Методы создания указанных слитых полипептидов и их применение для получения антител с повышенными эффекторными функциями описаны в WO 2004/065540, предварительной заявке на патент США № 60/495142 и в публикации заявки на патент США № 2004/0241817, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

В контексте настоящего описания понятие «домен локализации в комплексе Гольджи» относится к аминокислотной последовательности расположенного в комплексе Гольджи полипептида, который ответствен за «заякоривание» полипептида в области, находящейся внутри комплекса Гольджи. Как правило, домены локализации содержат аминоконцевые «хвосты» фермента.

В контексте настоящего описания понятие «полипептид, обладающий ManII-активностью» относится к полипептидам, которые обладают способностью катализировать гидролиз концевых 1,3- и 1,6-связанных остатков  $\alpha$ -D-маннозы в разветвленном промежуточном продукте, т.е. GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-маннозе, N-связанных олигосахаридов. Они включают полипептиды, которые обладают ферментативной активностью, сходной, но не обязательно идентичной с активностью  $\alpha$ -маннозидазы II комплекса Гольджи, известной также как маннозилолигосахарид 1,3-1,6- $\alpha$ -маннозидаза II (КФ 3.2.1.114) согласно номенклатуре Комитета Международного союза по биохимии и молекулярной биологии (NC-IUBMB).

«Активирующий Fc-рецептор» представляет собой Fc-рецептор, который после взаимодействия с Fc-областью антитела (или иммуноконъюгата) осуществляет процесс передачи сигналов, которые стимулируют несущую рецептор клетку осуществлять эффекторные функции. Активирующие Fc-рецепторы включают FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) и FcαRI (CD89).

Антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC) представляет собой иммунный механизм, приводящий к лизису сенсibilизированных антителом клеток-мишеней иммунными эффекторными клетками. Клетки-мишени представляют собой клетки, с которыми антитела, иммуноконъюгаты или их фрагменты, содержащие Fc-область, специфически связываются, как правило, через область белка, которая является N-концевой относительно Fc-области. В контексте настоящего описания понятие «повышенная ADCC» относится либо к увеличению количества лизированных в данный момент времени клеток-мишеней при данной концентрации иммуноконъюгата в среде, окружающей клетки-мишени, путем указанного выше механизма ADCC, и/или к снижению концентрации иммуноконъюгата в среде, окружающей клетки-мишени, необходимой для достижения лизиса данного количества клеток-мишеней в данное время с помощью механизма ADCC.

Повышение ADCC-активности сравнивают относительно ADCC, опосредуемой таким же иммуноконъюгатом, который получен с помощью такого же типа клеток-хозяев с использованием одинаковых стандартных методов получения, очистки, приготовления композиций и хранения (которые известны специалистам в данной области), но которые не подвергали инженерии.

Например, повышение ADCC, опосредуемой иммуноконъюгатом, полученным в клетках-хозяевах, сконструированных так, чтобы они имели измененную схему гликозилирования (например, так, чтобы они экспрессировали гликозилтрансферазу, GnTIII или другие гликозилтрансферазы), с помощью методов, указанных в настоящем описании, сравнивают с ADCC, опосредуемой таким же иммуноконъюгатом, полученным с помощью такого же типа не подвергнутых инженерии клеток-хозяев.

Под «иммуноконъюгатом, обладающим повышенной антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичностью (ADCC)» подразумевается

иммуноконъюгат, обладающий повышенной ADCC при определении с помощью любого приемлемого метода, известного обычным специалистам в данной области. Один из приемлемых методов анализа *in vitro* ADCC заключается в том, что:

- 5 1) для анализа применяют клетки-мишени, для которых известно, что они экспрессируют антиген-мишень, распознаваемый антигенсвязывающим фрагментом иммуноконъюгата;
- 2) для анализа в качестве эффекторных клеток используют человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), выделенные из крови  
10 произвольно выбранных здоровых доноров;
- 3) анализ осуществляют с помощью следующего протокола:
- I) РВМС выделяют с помощью стандартных методов центрифугирования в градиенте плотности и суспендируют  $5 \times 10^6$  клеток/мл в RPMI-среде для культуры клеток;
- 15 II) выращивают клетки-мишени с помощью стандартных методов культивирования тканей, собирают на экспоненциальной фазе роста, когда жизнеспособность составляет более 90%, промывают в RPMI-среде для культуры клеток, меченной  $100 \text{ мкКи } ^{51}\text{Cr}$ , дважды промывают с помощью среды для культуры клеток и ресуспендируют в среде для культуры клеток с  
20 плотностью  $10^5$  клеток/мл;
- III) переносят по 100 мкл указанной выше конечной суспензии клеток-мишеней в каждую лунку 96-луночного титрационного микропланшета;
- IV) готовят серийные разведения с концентрацией иммуноконъюгата от 4000 до 0,04 нг/мл в среде для культуры клеток и добавляют 50 мкл  
25 образовавшихся растворов иммуноконъюгатов к клеткам-мишеням в 96-луночном титрационном микропланшете, оценивая в трех повторностях различные концентрации антител, охватывающие весь указанный выше диапазон концентраций;
- V) для создания контролей с максимальным высвобождением (MR)  
30 используют 3 дополнительные лунки в планшете, которые содержат меченые клетки-мишени, с добавлением 50 мкл 2 об.% водного раствора неионогенного детергента (Nonidet, фирма Sigma, Сент-Луис), вместо раствора иммуноконъюгата (указанного в п. IV, выше);



VI) для создания контролей со спонтанным высвобождением (SR), используют 3 дополнительные лунки в планшете, которые содержат меченые клетки-мишени, с добавлением 50 мкл RPMI-среды для культуры клеток вместо раствора иммуноконъюгата (указанного в п. IV, выше);

5 VII) затем 96-луночный титрационный микропланшет центрифугируют при  $50 \times g$  в течение 1 мин и инкубируют в течение 1 ч при  $4^{\circ}\text{C}$ ;

VIII) добавляют в каждую лунку по 50 мкл суспензии РВМС (указанной в п. I, выше), получая соотношение эффекторных клеток: клетки-мишени 25:1, и планшеты помещают в инкубатор в атмосферу, содержащую 5%  $\text{CO}_2$ , и  
10 выдерживают при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 4 ч;

IX) собирают бесклеточный супернатант из каждой лунки и количественно оценивают выделенную в процессе эксперимента радиоактивность (ER) с помощью счетчика гамма-лучей;

X) рассчитывают процент специфического лизиса для каждой  
15 концентрации иммуноконъюгата согласно формуле  $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$ , где ER обозначает среднюю радиоактивность, рассчитанную (см. п. IX, выше) для указанной концентрации иммуноконъюгата, MR означает среднюю радиоактивность, рассчитанную (см. п. IX, выше) для MR-контролей (см. п. V, выше), а SR означает среднюю радиоактивность, рассчитанную (см. п. IX, выше)  
20 для SR-контролей (см. п. VI, выше);

4) «повышенную ADCC» определяют либо как увеличение максимального процента специфического лизиса, обнаруженного для указанного выше диапазона концентраций иммуноконъюгата, и/или как снижение концентрации имуноконъюгата, необходимой для достижения половины от максимального  
25 процента специфического лизиса, обнаруженного для указанного выше диапазона концентраций иммуноконъюгата. Повышение ADCC оценивают относительно измеренной тем же самым методом ADCC, опосредованной таким же иммуноконъюгатом, продуцированным в том же типе клеток-хозяев, с использованием одних и тех же стандартных методов получения, очистки,  
30 приготовления композиций и хранения, которые хорошо известны специалистам в данной области, но который не продуцировался клеткой-хозяином, подвергнутой инженерии.

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

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

10 заболевания.

«Индивидуум» или «субъект» представляет собой млекопитающее. Млекопитающие представляют собой (но, не ограничиваясь только ими) одомашненных животных (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматов (например, люди и приматы кроме человека, такие как мартышки),

15 кроликов и грызунов (например, мыши и крысы). Предпочтительно индивидуум или субъект представляет собой человека.

Понятие «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, что он обеспечивает биологическую активность входящего в его состав действующего вещества, которое должно обладать

20 эффективностью, и который не содержит дополнительных компонентов, которые обладают неприемлемой токсичностью для индивидуума, которому следует вводить композицию.

«Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от действующего вещества, который

25 является нетоксичным для индивидуума. Фармацевтически приемлемые носители включают (но, не ограничиваясь только ими) буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

В контексте настоящего описания понятие «лечение» (и его грамматические вариации, такие как «лечить» или «процесс лечения») относится

30 к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения болезни у индивидуума, подлежащего лечению, и его можно осуществлять либо для профилактики или в процессе развития клинической патологии. Требуемыми действиями лечения являются (но, не ограничиваясь только ими)

предупреждение возникновения или рецидива болезни, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий болезни, предупреждение метастазов, снижение скорости развития болезни, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссия или  
5 улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, применяют для задержки развития болезни или замедления прогрессирования болезни.

Понятие «листовка-вкладыш в упаковку» в контексте настоящего описания относится к инструкциям, которые обычно помещают в поступающие в продажу  
10 упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозе, пути введения, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или мерах предосторожности при применении указанных терапевтических продуктов.

#### Подробное описание вариантов осуществления изобретения

15 Первым объектом изобретения является иммуноконъюгат, который содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, Fc-домен, состоящий из двух субъединиц, и эффекторный фрагмент, в котором не может присутствовать более одного эффекторного фрагмента. Отсутствие дополнительных  
20 эффекторных фрагментов может снижать направленный перенос иммуноконъюгата к областям, в которых присутствует рецептор соответствующего эффекторного фрагмента, что повышает направленный перенос и накопление в областях, в которых присутствует фактический антиген-мишень иммуноконъюгата, который распознается антигенсвязывающим  
25 фрагментом. Кроме того, отсутствие явления авидности касательно рецептора соответствующего эффекторного фрагмента может снижать активацию клеток, позитивных по рецептору эффекторного фрагмента в периферической крови при внутривенном введении иммуноконъюгата. Кроме того, время полужизни в сыворотке иммуноконъюгатов, которые содержат только один эффекторный  
30 фрагмент, вероятно, длиннее по сравнению с иммуноконъюгатами, содержащими два или большее количество эффекторных фрагментов.

#### Форматы иммуноконъюгатов

Компоненты иммуноконъюгата можно сливать друг с другом в различных конфигурациях. Примеры конфигураций представлены на фиг. 2. В одном из

вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент сливают с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент сливают с карбоксиконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена.

5 Эффекторный фрагмент можно сливать с Fc-доменом непосредственно или через линкерный пептид, содержащий одну или несколько аминокислот, как правило, примерно 2-20 аминокислот. Линкерные пептиды известны в данной области или представлены в настоящем описании. Приемлемыми неиммуногенными линкерными пептидами являются, например, линкерные пептиды  $(G4S)_n$ ,  $(SG4)_n$   
10 или  $G4(SG4)_n$ , в которых n обозначает число, как правило, от 1 до 10, как правило, от 2 до 4. Альтернативно этому, если эффекторную молекулу связывают с N-концом субъединицы Fc-домена, то ее можно связывать через шарнирную область иммуноглобулина или ее часть с помощью дополнительного линкерного пептида или без него.

15 Аналогично этому, первый антигенсвязывающий домен можно сливать с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. В одном из вариантов осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент сливают с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. Первый антигенсвязывающий фрагмент можно  
20 сливать с Fc-доменом непосредственно или через линкерный пептид. В конкретном варианте осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент сливают с Fc-доменом через шарнирную область иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения шарнирная область иммуноглобулина представляет собой шарнирную область человеческого IgG<sub>1</sub>.

25 В одном из вариантов осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающий домен антитела, который содержит переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела. В конкретном варианте осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент  
30 представляет собой молекулу Fab. В одном из вариантов осуществления изобретения молекулу Fab сливают на карбоксиконце ее тяжелой или легкой цепи с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. В конкретном варианте осуществления изобретения молекулу Fab сливают на

карбоксконце ее тяжелой цепи с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. В более конкретном варианте осуществления изобретения молекулу Fab сливают с Fc-доменом через шарнирную область иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения шарнирная область иммуноглобулина представляет собой шарнирную область человеческого IgG<sub>1</sub>.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат практически состоит из антигенсвязывающего фрагмента, Fc-домена, который состоит из двух субъединиц, эффекторного фрагмента и необязательно одного или нескольких линкерных пептидов, при этом указанный антигенсвязывающий домен представляет собой молекулу Fab и слит на карбоксконце его тяжелой цепи с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена, и при этом указанный эффекторный фрагмент слит либо с (I) аминоконцевой аминокислотой другой одной из двух субъединиц Fc-домена, или (II) с карбоксконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. В последнем случае эффекторный фрагмент и первый антигенсвязывающий фрагмент могут быть слиты либо с одной и той же субъединицей Fc-домена, либо каждый может быть слит с различными субъединицами Fc-домена.

Формат иммуноконъюгата с одним антигенсвязывающим фрагментом (например, представленный на фиг. 2Б и 2В), является ценным прежде всего в тех случаях, когда предполагается, что может происходить интернализация антигена-мишени после связывания с высокой аффинностью с антигенсвязывающим фрагментом. В таких случаях присутствие более одного антигенсвязывающего фрагмента в иммуноконъюгате может усиливать интернализацию, снижая тем самым доступность антигена-мишени.

Однако во многих других случаях является целесообразным наличие иммуноконъюгата, содержащего два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов и один эффекторный фрагмент для более оптимального направленного переноса к антигену-мишени относительно рецептора эффекторного фрагмента и оптимизации фармацевтического «окна» иммуноконъюгата.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит первый и второй

антигенсвязывающий фрагмент. В одном из вариантов осуществления изобретения каждый из указанных первого и второго антигенсвязывающих фрагментов слит с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. Первый и второй антигенсвязывающий фрагмент может быть слит с Fc-доменом непосредственно или через линкерный пептид. В конкретном варианте осуществления изобретения каждый из указанных первого и второго антигенсвязывающих фрагментов слит с субъединицей Fc-домена через шарнирную область иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения шарнирная область иммуноглобулина представляет собой шарнирную область человеческого IgG<sub>1</sub>.

В одном из вариантов осуществления изобретения каждый из указанных первого и второго антигенсвязывающих фрагментов содержит антигенсвязывающий домен антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела. В конкретном варианте осуществления изобретения каждый из указанных первого и второго антигенсвязывающих фрагментов представляет собой молекулу Fab. В одном из вариантов осуществления изобретения каждая из указанных молекул Fab слита на карбоксиконце ее тяжелой или легкой цепи с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. В конкретном варианте осуществления изобретения каждая из молекул Fab слита на ее карбоксиконце с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. В более конкретном варианте осуществления изобретения каждая из указанных молекул Fab слита с субъединицей Fc-домена через шарнирную область иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения шарнирная область иммуноглобулина представляет собой шарнирную область человеческого IgG<sub>1</sub>.

В одном из вариантов осуществления изобретения первый и второй антигенсвязывающий фрагмент и Fc-домен являются частью молекулы иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения молекула иммуноглобулина представляет собой иммуноглобулин класса IgG. В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин подкласса IgG<sub>1</sub>. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения иммуноглобулин

представляет собой человеческий иммуноглобулин. В других вариантах осуществления изобретения иммуноглобулин представляет собой химерный иммуноглобулин или гуманизированный иммуноглобулин. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент слит с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина. Эффекторный фрагмент может быть слит с тяжелой цепью иммуноглобулина непосредственно или через линкерный пептид. В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат практически состоит из молекулы иммуноглобулина, эффекторного фрагмента, слитого с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, и необязательно одного или нескольких линкерных пептидов.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептид, в котором тяжелая цепь Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, и полипептид, в котором субъединица Fc-домена объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом эффекторного фрагмента. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептид, в котором тяжелая цепь первого Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, и полипептид, в котором тяжелая цепь второго Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая, в свою очередь, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом эффекторного фрагмента. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептид, в котором тяжелая цепь Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, и полипептид, в котором полипептид эффекторного фрагмента объединен карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит также полипептид легкой цепи Fab. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды соединены ковалентной связью, например, с помощью дисульфидного мостика.

Согласно одному из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения компоненты иммуноконъюгата (например, эффекторный фрагмент, антигенсвязывающий фрагмент, Fc-домен) можно связывать непосредственно

или через различные линкеры, в частности, пептидные линкеры, которые содержат одну или большее количество аминокислот, как правило, примерно 2-20 аминокислот, которые представлены в настоящем описании или известны в данной области. Приемлемыми неиммуногенными линкерными пептидами являются, например, линкерные пептиды  $(G_4S)_n$ ,  $(SG_4)_n$  или  $G_4(SG_4)_n$ , в которых  $n$  обозначает число, как правило, от 1 до 10, как правило, от 2 до 4.

#### Fc-домен

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

В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата представляет собой Fc-домен IgG. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG<sub>1</sub>. В другом варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG<sub>4</sub>. В другом конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен является человеческим. Приведенная в качестве примера последовательность Fc-области человеческого IgG<sub>1</sub> представлена в SEQ ID NO: 1.

Fc-домен придает иммуноконъюгату в значительной степени удлиненное время полужизни в сыворотке по сравнению с форматами иммуноконъюгатов, в которых отсутствует Fc-домен. В частности, в случае, когда иммуноконъюгат содержит эффекторный фрагмент с относительной слабой активностью (но, например, с пониженной токсичностью) продолжительное время полужизни может иметь решающее значение для достижения оптимальной эффективности *in vivo*. Кроме того, Fc-домен может опосредовать эффекторные функции, что дополнительно будет описано ниже.



Модификации Fc-домена, усиливающие гетеродимеризацию

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, содержат только один эффекторный фрагмент, слитый с одной из двух субъединиц Fc-домена, таким образом, они содержат две неидентичные полипептидные цепи. Рекомбинантная совместная экспрессия этих полипептидов и последующая димеризация приводит к нескольким возможным комбинациям двух полипептидов, из которых только гетеродимеры двух неидентичных полипептидов применяют согласно изобретению. Для повышения выхода и чистоты иммуноконъюгатов при их получении методами рекомбинации целесообразным является интродукция в Fc-домен иммуноконъюгата модификации, которая препятствует образованию гомодимеров двух идентичных полипептидов (т.е. двух полипептидов, содержащих эффекторный фрагмент, или двух полипептидов, в которых отсутствует эффекторный фрагмент), и/или усиливает образование гетеродимеров полипептида, который содержит эффекторный фрагмент, и полипептида, в котором отсутствует эффекторный фрагмент.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата содержит модификацию, которая усиливает гетеродимеризацию двух неидентичных полипептидных цепей. Сайт наиболее сильного белок-белкового взаимодействия двух полипептидных цепей Fc-домена человеческого IgG находится в СН3-домене Fc-домена. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация находится в СН3-домене Fc-домена.

В конкретном варианте осуществления изобретения указанная модификация представляет собой модификацию типа «knob-in-hole» (типа «выступ-впадина»), которая включает модификацию, приводящую к образованию «выступа» в одной из двух субъединиц Fc-домена и к образованию «впадины» в другой одной из двух субъединиц Fc-домена. Технология «knob-into-hole» описана, например, в U.S. № 5731168; U.S. № 7695936; у Ridgway и др., Prot Eng 9, 1996, сс. 617-621 и Carter, J Immunol Meth 248, 2001, сс. 7-15). В целом, метод включает интродукцию выпуклости («выступ») на поверхности раздела первого полипептида и соответствующей полости («впадина») на поверхности раздела второго полипептида, в результате выпуклость может помещаться в полость, усиливая тем самым образование

гетеродимера и препятствуя образованию гомодимера. Выпуклости  
конструируют путем замены аминокислот с небольшими боковыми цепями на  
поверхности раздела первого полипептида на аминокислоты с более крупными  
боковыми цепями (например, на тирозин или триптофан). Компенсирующие  
5 полости идентичного или сходного размера с выпуклостями конструируют на  
поверхности раздела второго полипептида путем замены аминокислот с  
крупными боковыми цепями на аминокислоты с менее крупными боковыми  
цепями (например, аланин или треонин). Выпуклость и полость можно создавать  
путем изменения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды, например, с  
10 помощью сайтнаправленного мутагенеза, или посредством синтеза пептидов. В  
конкретном варианте осуществления изобретения модификация, приводящая к  
получению «выступа», представляет собой аминокислотную замену T366W в  
одной из двух субъединиц Fc-домена, а модификация, приводящая к получению  
«впадины», представляет собой аминокислотные замены T366S, L368A и Y407V  
15 в другой одной из двух субъединиц Fc-домена. В более конкретном варианте  
осуществления изобретения субъединица Fc-домена, содержащая модификацию,  
приводящую к получению «выступа», дополнительно содержит аминокислотную  
замену S354C, а субъединица Fc-домена, содержащая модификацию,  
приводящую к получению «впадины», дополнительно содержит  
20 аминокислотную замену Y349C. Интродукция этих двух остатков цистеина  
приводит к образованию дисульфидного мостика между двумя субъединицами  
Fc-домена, дополнительно стабилизирующего димер (Carter, J Immunol Methods  
248, 2001, сс. 7-15).

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

В конкретном варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент слит с амино- или карбоксиконцевой аминокислотой субъединицы Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «выступа». Не вдаваясь в какую-либо теорию, слияние эффекторного фрагмента с содержащей «выступ» субъединицей Fc-домена должно дополнительно минимизировать образование гомодимерных иммуноконъюгатов, содержащих два эффекторных фрагмента (стерическое «столкновение» двух содержащих «выступ» полипептидов).

#### Модификации Fc-домена, изменяющие связывание с Fc-рецептором

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата конструируют так, чтобы он обладал измененной аффинностью связывания с Fc-рецептором, прежде всего измененной аффинностью связывания с Fc $\gamma$ -рецептором, по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом.

Связывание с Fc-рецепторами можно легко определять, например, с помощью ELISA или резонанса поверхностного плазмона (SPR) с использованием стандартного оборудования, такого как устройство BIAcore (фирма GE Healthcare), и с применением таких Fc-рецепторов, которые можно получать методом рекомбинантной экспрессии. Приемлемый указанный анализ представлен в настоящем описании. Альтернативно этому, аффинность связывания Fc-доменов или иммуноконъюгатов, содержащих Fc-домен, с Fc-рецепторами можно оценивать с использованием клеточных линий, для которых известно, что они экспрессируют конкретные Fc-рецепторы, такие как NK-клетки, экспрессирующие Fc $\gamma$ IIIa-рецептор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата конструируют так, чтобы он обладал измененными эффекторными функциями, в частности, измененной ADCC, по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом.

Эффекторную функцию Fc-домена или иммуноконъюгата, содержащего Fc-домен, можно измерять методами, известными в данной области. Приемлемый анализ для оценки ADCC представлен в настоящем описании. Другие примеры анализов *in vitro*, предназначенных для оценки ADCC-активности представляющей интерес молекулы, описаны в U.S. № 5500362; у Hellstrom и

др., Proc Natl Acad Sci USA 83, 1986, сс. 7059-7063 и Hellstrom и др., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1985, сс. 1499-1502; U.S. № 5821337; у Bruggemann и др., J Exp Med 166, 1987, сс. 1351-1361. Альтернативно этому, можно применять методы, основанные на нерадиоактивном анализе (см., например, АСТІ™ -

5 нерадиоактивный анализ цитотоксичности с помощью проточной цитометрии (фирма CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, шт. Калифорния); и CytoTox 96® - нерадиоактивный анализ цитотоксичности (фирма Promega, Мэдисон, шт. Висконсин)). Приемлемыми эффекторными клетками для таких анализов являются мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) и  
10 естественные клетки-киллеры (NK). В альтернативном или дополнительном варианте ADCC-активность представляющей интерес молекулы можно оценивать *in vivo*, например, например, с использованием созданных на животных моделей, описанных у Clynes и др., Proc Natl Acad Sci USA 95, 1998, сс. 652-656.

15 В некоторых вариантах осуществления изобретения изменяют связывание Fc-домена с компонентом системы комплемента, в частности с C1q. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых Fc-домен конструируют так, чтобы он обладал измененной эффекторной функцией, указанная измененная эффекторная функция включает измененную CDC. Можно  
20 осуществлять анализы связывания C1q для решения вопроса о том, может ли иммуноконъюгат связываться с C1q и, как следствие, обладает ли он CDC-активностью (см., например, анализы связывания с C1q и C3c с помощью ELISA, описанные в WO 2006/029879 и WO 2005/100402). Для оценки активации комплемента можно осуществлять анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro  
25 и др., J Immunol Methods 202, 1996, с. 163; Cragg и др., Blood 101, 2003, сс. 1045-1052 и Cragg и Glennie, Blood 103, 2004, сс. 2738-2743).

а) Пониженная способность связываться с Fc-рецептором и/или пониженная эффекторная функция

30 Fc-домен придает иммуноконъюгату предпочтительные фармакокинетические свойства, включая продолжительное время полужизни в сыворотке, что обеспечивает хорошее накопление в ткани-мишени и предпочтительное соотношение распределений в ткани-крови. Однако в то же время он может приводить к нежелательной направленности иммуноконъюгата к

клеткам, которые экспрессируют Fc-рецепторы, а не предпочтительным несущим антиген клеткам. Кроме того, совместная активация путей передачи сигналов Fc-рецептора может приводить к высвобождению цитокинов, что в сочетании с эффекторным фрагментом и продолжительным временем полужизни иммуноконъюгата, приводит к избыточной активации цитокиновых рецепторов и серьезным побочным действиям при системном введении. В соответствии с этим описано, что с иммуноконъюгатами, содержащими канонический IgG-IL-2, связаны реакции на инфузию (см., например, King и др., J Clin Oncol 22, 2004, сс. 4463-4473).

10 Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата конструируют так, чтобы он обладал пониженной аффинностью связывания с Fc-рецептором. В одном из таких вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит одну или несколько

15 аминокислотных мутаций, которые снижают аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором. Как правило, одна или несколько одинаковых аминокислотных мутаций присутствует(ют) в каждой из двух субъединиц Fc-домена. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные аминокислотные мутации снижают аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз или по меньшей мере в 10 раз. Согласно

20 вариантам осуществления изобретения, в которых имеет место более одной аминокислотной мутации, которые снижают аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором, комбинация указанных аминокислотных мутаций может снижать аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз или по меньшей мере в 50 раз. В одном из

25 вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат, содержащий сконструированный Fc-домен, характеризуется аффинностью, составляющей менее чем 20%, в частности, менее чем 10%, более предпочтительно менее чем 5% от аффинности связывания с Fc-рецептором, характерной для иммуноконъюгата, содержащего не подвергнутый инженерии Fc-домен. В одном

30 из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой Fc $\gamma$ -рецептор, более конкретно Fc $\gamma$ RIIIa-, Fc $\gamma$ RI- или Fc $\gamma$ RIIa-рецептор. Предпочтительно уменьшается связывание с каждым из

этих рецепторов. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения снижается также аффинность связывания с компонентом системы комплемента, в частности, аффинность связывания с C1q. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения не снижается аффинность связывания с

5 неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Практически такое же связывание с FcRn, т.е. сохранение аффинности связывания Fc-домена с указанным рецептором, достигается, когда Fc-домен (или иммуноконъюгат, содержащий указанный Fc-домен) характеризуется аффинностью связывания с FcRn, составляющей более чем примерно 70% от аффинности связывания с FcRn не подвергнутого

10 инженерии Fc-домена (или иммуноконъюгата, содержащего не подвергнутую инженерии форму Fc-домена). Fc-домены или иммуноконъюгаты, содержащие указанные Fc-домены, могут характеризоваться аффинностью, составляющей более чем примерно 80% и даже более чем примерно 90% от указанной выше аффинности. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная

15 мутация представляет собой аминокислотную замену. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении P329. В более конкретном варианте осуществления изобретения аминокислотная замена представляет собой P329A или P329G, в частности P329G. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит

20 дополнительную аминокислотную замену в положении, выбранном из S228, E233, L234, L235, N297 и P331. В более конкретном варианте осуществления изобретения дополнительная аминокислотная замена представляет собой S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D или P331S. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные замены в

25 положениях P329, L234 и L235. В более конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные мутации L234A, L235A и P329G (LALA P329G). Такая комбинация аминокислотных замен практически полностью аннулирует связывание с Fc $\gamma$ -рецептором Fc-домена человеческого IgG, что описано в заявке на европейский патент EP 11160251.2, которая

30 полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. В EP 11160251.2 описаны также методы получения указанных мутантных Fc-доменов и методы определения их свойств, таких как связывание с Fc-рецептором или эффекторные функции.

Мутантные Fc-домены можно получать с помощью аминокислотной делеции, замены, инсерции или модификации, используя генетические или химические методы, хорошо известные в данной области. Генетические методы могут включать сайтспецифический мутагенез кодирующей последовательности ДНК, ПЦР, синтез генов и т.п. Правильность нуклеотидных замен можно 5 подтверждать, например, секвенированием.

В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен конструируют так, чтобы он обладал пониженной эффекторной функцией по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. Пониженная эффекторная функция может 10 представлять собой (но, не ограничиваясь только ими) пониженную(ые) одну или несколько из следующих функций: пониженная комплементзависимая цитотоксичность (CDC), пониженная антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность(ADCC), пониженный антитело-обусловленный клеточнозависимый фагоцитоз (ADCP), пониженная секреция 15 цитокинов, пониженное опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, пониженное связывание с NK-клетками, пониженное связывание с макрофагами, пониженное связывание с моноцитами, пониженное связывание с полиморфоядерными клетками, пониженная непосредственная передача сигнала, индуцирующего апоптоз, 20 пониженное перекрестное связывание связанных с мишенью антител, пониженное созревание дендритных клеток или пониженное Т-клеточное примирование.

В одном из вариантов осуществления изобретения пониженная эффекторная функция представляет собой одну или несколько функций, 25 выбранных из группы, включающей пониженную CDC, пониженную ADCC, пониженный ADCP и пониженную секрецию цитокинов. В конкретном варианте осуществления изобретения пониженная эффекторная функция представляет собой пониженную ADCC. В одном из вариантов осуществления изобретения пониженная ADCC составляет меньше 20% от ADCC, индуцируемой не 30 подвергнутым инженерии Fc-доменом (или иммуноконъюгатом, содержащим не подвергнутый инженерии Fc-домен).

Помимо Fc-доменов, описанных выше и в заявке на европейский патент EP 11160251.2, Fc-домены с пониженной способностью связываться с Fc-

рецептором и/или пониженной эффекторной функцией включают также Fc-домены с заменой в одном или нескольких Fc-доменов остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (U.S. № 6737056). К указанным мутантам Fc относятся мутанты Fc с заменами в двух или большем количестве аминокислот в положениях 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый мутант «DANA» Fc-области, несущий замену остатков 265 и 297 на аланин (U.S. №. 7332581).

Антитела подтипа IgG<sub>4</sub> обладают пониженной аффинностью к связыванию с Fc-рецепторами и пониженными эффекторными функциями по сравнению с антителами подтипа IgG<sub>1</sub>. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен Т-клеточных активирующих биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, представляет собой Fc-домен IgG<sub>4</sub>, в частности Fc-домен человеческого IgG<sub>4</sub>. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен IgG<sub>4</sub> содержит аминокислотные замены в положении S228, конкретно аминокислотную замену S228P. Для дополнительного снижения аффинности связывания с Fc-рецептором и/или его эффекторной функции в одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен IgG<sub>4</sub> содержит аминокислотную замену в положении L235, в частности, аминокислотную замену L235E. В другом варианте осуществления изобретения Fc-домен IgG<sub>4</sub> содержит аминокислотную замену в положении P329, в частности, аминокислотную замену P329G. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен IgG<sub>4</sub> содержит аминокислотные замены в положениях S228, L235 и P329, в частности, аминокислотные замены S228P, L235E и P329G. Указанные мутанты Fc-домена IgG<sub>4</sub> и их особенности связывания с Fcγ-рецептором описаны в заявке на европейский патент EP 11160251.2, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

**б) Повышенная способность связываться с Fc-рецептором и/или повышенная эффекторная функция**

Могут встречаться ситуации, когда, в противоположность вышеописанному, требуется поддерживать или даже повышать способность связываться с Fc-рецептором и/или эффекторные функции иммуноконъюгатов, например, когда мишенью иммуноконъюгата является высокоспецифический



опухолевый антиген. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, конструируют так, чтобы он обладал повышенной аффинностью связывания с Fc-рецептором. Повышенная аффинность связывания может представлять собой

5 повышение аффинности связывания Fc-домена с Fc-рецептором по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз или по меньшей мере в 10 раз. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой Fc $\gamma$ -рецептор. В одном из вариантов

10 осуществления изобретения Fc-рецептор выбирают из группы, включающей Fc $\gamma$ RIIIa, Fc $\gamma$ RI и Fc $\gamma$ RIIa. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой Fc $\gamma$ RIIIa.

В одном из указанных вариантов осуществления изобретения Fc-домен конструируют так, чтобы он имел измененную олигосахаридную структуру по

15 сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В частности, в таком варианте осуществления изобретения Fc-домен имеет повышенное относительное содержание нефукозилированных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В более конкретном варианте

20 осуществления изобретения по меньшей мере примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95% или примерно 100%, в частности, по меньшей мере примерно 50%, более предпочтительно по

25 меньшей мере примерно 70% N-связанных олигосахаридов в Fc-домене иммуноконъюгата являются нефукозилированными. Нефукозилированные олигосахариды могут быть гибридного или комплексного типа. В другом конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен имеет повышенное относительное содержание бисекционных олигосахаридов по сравнению с не

30 подвергнутым инженерии Fc-доменом. В более конкретном варианте осуществления изобретения по меньшей мере примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%,

примерно 95% или примерно 100%, в частности, по меньшей мере примерно 50%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 70% N-связанных олигосахаридов в Fc-доме иммуноконъюгата являются бисекционными. Бисекционные олигосахариды могут быть гибридного или комплексного типа. В

5 следующем конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен имеет повышенное относительное содержание бисекционных нефукозилированных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В более конкретном варианте осуществления изобретения по меньшей мере

10 примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95% или примерно 100%, в частности, по меньшей мере примерно 15%, более предпочтительно по меньшей мере

15 примерно 25% , по меньшей мере примерно 35% или по меньшей мере примерно 50% N-связанных олигосахаридов в Fc-доме иммуноконъюгата являются бисекционными нефукозилированными. Бисекционные нефукозилированные олигосахариды могут быть гибридного или комплексного типа.

Структуры олигосахаридов в Fc-доме иммуноконъюгата можно анализировать с помощью методов, хорошо известных в данной области,

20 например, методом MALDI TOF-масс-спектрометрии, описанным у Umana и др., Nat Biotechnol 17, 1999, сс. 176-180 или Ferrara и др., Biotechn Bioeng 93, 2006, сс. 851-861. Процент нефукозилированных олигосахаридов представляет собой количество олигосахаридов, у которых отсутствуют остатки фукозы, относительно всех олигосахаридов, присоединенных к Asp 297 (например,

25 комплексных, гибридных, с высоким содержанием маннозы структур), и идентифицированных в обработанном N-гликозидазой F образце (например, комплексных, гибридных структур и структур с высоким содержанием маннозы), которое измеряют с помощью MALDI-TOF-МС. Asp297 обозначает остаток аспарагина, локализованный в положении 297 в Fc-доме (согласно

30 EU-нумерации остатков в Fc); однако Asp297 может быть локализован в пределах примерно  $\pm 3$  аминокислоты в обратном или прямом направлении относительно положения 297, т.е. между положениями 294 и 300, что связано с минорными вариациями в последовательности иммуноглобулинов. Аналогично

определяют процент бисекционных или бисекционных нефукозилированных олигосахаридов.

Для достижения модификации гликозилирования в Fc-домене иммуноконъюгата можно получать иммуноконъюгат в клетке-хозяине, которую подвергали манипуляции для экспрессии измененных уровней одного или нескольких полипептидов, обладающих гликозилтрансферазной активностью.

В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата конструируют так, чтобы он обладал измененной структурой олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом, путем получения иммуноконъюгата в клетке-хозяине с измененной активностью одной или нескольких гликозилтрансфераз. Гликозилтрансферазы включают, например,  $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозамилтрансферазу III (GnTIII),  $\beta(1,4)$ -галактозилтрансферазу (GalT),  $\beta(1,2)$ -N-ацетилглюкозамилтрансферазу I (GnTI),  $\beta(1,2)$ -N-ацетилглюкозамилтрансферазу II (GnTII) и  $\alpha(1,6)$ -фукозилтрансферазу.

В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата конструируют так, чтобы он имел повышенное относительное содержание нефукозилированных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом, путем получения иммуноконъюгата в клетке-хозяине, обладающей повышенной активностью  $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозамилтрансферазы III (GnTIII). В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения клетка-хозяин имеет также повышенную активность  $\alpha$ -маннозидазы II (ManII). Методология гликоинженерии, которую можно использовать для создания путем гликоинженерии иммуноконъюгатов, предлагаемых в настоящем изобретении, описана более подробно у Umana и др., Nat Biotechnol 17, 1999, сс. 176-180; Ferrara и др., Biotechn Bioeng 93, 2006, сс. 851-861; WO 99/54342 (U.S. № 6602684; EP 1071700); WO 2004/065540 (публикация патента США № 2004/0241817; EP 1587921), WO 03/011878 (публикация патента США № 2003/0175884), содержание каждого из которых полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Как правило, для создания клеточных линий, предназначенных для получения иммуноконъюгатов с измененной схемой гликозилирования, можно применять любой тип культивируемой линии клеток, включая клеточные линии, указанные в настоящем описании. Конкретные линии клеток включают CHO-

клетки, ВНК-клетки, NS0-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы YO, клетки мышинной миеломы P3X63, PER-клетки, PER.C6-клетки или клетки гибридомы и другие клетки млекопитающих. В определенных вариантах осуществления изобретения клетки-хозяева подвергали манипуляциям, приводящим к экспрессии повышенных уровней одного или нескольких полипептидов, обладающих активностью  $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозамилтрансферазы III (GnTIII). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки-хозяева подвергали дополнительным манипуляциям для обеспечения повышенных уровней экспрессии одного или нескольких полипептидов, обладающих активностью  $\alpha$ -маннозидазы II (ManII). В конкретном варианте осуществления изобретения полипептид, обладающий GnTIII-активностью, представляет собой слитый полипептид, который содержит каталитический домен GnTIII и домен локализации в комплексе Гольджи гетерологичного полипептида, присутствующего в комплексе Гольджи. В частности, указанный домен локализации в комплексе Гольджи представляет собой домен локализации в комплексе Гольджи маннозидазы II. Методы создания указанных слитых полипептидов и их применение для получения антител с повышенными эффекторными функциями описаны у Ferrara и др., *Biotechn Bioeng* 93, 2006, сс. 851-861 и в WO 2004/065540, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Клетки-хозяева, которые содержат кодирующую последовательность иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, и/или кодирующую последовательность полипептидов, обладающих гликозилтрансферазной активностью, и которые экспрессируют биологически активные генные продукты, можно идентифицировать, например, с помощью гибридизации ДНК-ДНК или ДНК-РНК; по присутствию или отсутствию функций определенных «маркерных» генов; путем оценки уровня транскрипции, измеряемого по экспрессии соответствующих мРНК-транскриптов в клетке-хозяине; или путем выявления генного продукта с помощью иммуноанализа или по его биологической активности – т.е. методов, хорошо известных в данной области. Активность GnTIII или Man II можно определять, например, применяя лектин, который связывается с продуктами биосинтеза GnTIII или ManII соответственно. Примером указанного лектина является лектин E<sub>4</sub>-РНА, который связывается

предпочтительно с олигосахаридами, содержащими двурассекающий GlcNAc. Продукты биосинтеза (т.е. специфические олигосахаридные структуры) полипептидов, обладающих активностью GnTIII или ManII, можно выявлять также с помощью масс-спектрометрического анализа олигосахаридов, высвобождающихся из гликопротеинов, которые продуцируются клетками, экспрессирующими указанные полипептиды. В альтернативном варианте можно использовать функциональный анализ, в котором измеряют повышенную эффекторную функцию и/или повышенную способность связываться с Fc-рецептором, опосредуемую иммуноконъюгатами, которые продуцируются клетками, созданными с использованием полипептидов, обладающих активностью GnTIII.

В другом варианте осуществления изобретения Fc-домен конструируют так, чтобы он имел повышенное относительное содержание нефукозилированных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом, путем получения иммуноконъюгата в клетке-хозяине с пониженной  $\alpha(1,6)$ -фукозилтрансферазной активностью. Клетка-хозяин с пониженной  $\alpha(1,6)$ -фукозилтрансферазной активностью может представлять собой клетку, в которой ген  $\alpha(1,6)$ -фукозилтрансферазы разрушен или деактивирован иным образом, например, «выключен» (см. Yamane-Ohnuki и др., *Biotech Bioeng* 87, 2004, с. 614; Kanda и др., *Biotechnol Bioeng* 94(4), 2006, сс. 680-688; Niwai др., *J Immunol Methods* 306, 2006, сс. 151-160).

Другими примерами клеточных линий, которые обладают способностью продуцировать дефукозилированные иммуноглобулины, являются Lec13 CHO-клетки с дефицитом белкового фукозилирования (Ripka и др., *Arch. Biochem. Biophys.* 249, 1986, сс. 533-545; заявка на патент США № US 2003/0157108 и WO 2004/056312, прежде всего в примере 11). В альтернативном варианте иммуноконъюгаты, предлагаемые в настоящем изобретении, можно подвергать гликоинженерии, что приводит к присутствию у них пониженного количества фукозных остатков в Fc-домене, с использованием методик, описанных в EP 1176195 A1, WO 03/084570, WO 03/085119 и опубликованных заявках на патент США №№ 2003/0115614, 2004/093621, 2004/110282, 2004/110704, 2004/132140, U.S. № 6946292 (на имя фирмы Kyowa), например, путем снижения или

элиминации активности белка-транспортера ГДФ-фукозы, в клетках-хозяевах, которые применяют для получения иммуноконъюгата.

Подвергнутые гликоинженерии иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно получать также в системах экспрессии, которые  
5 продуцируют модифицированные гликопротеины, например, описанных в WO 2003/056914 (фирма GlycoFi, Inc.) или WO 2004/057002 и WO 2004/024927 (на имя фирмы Greenovation).

В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата конструируют так, чтобы он обладал повышенной  
10 эффекторной функцией по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. Повышенная эффекторная функция может представлять собой (но, не ограничиваясь только ими) одну или несколько функций, выбранных из группы, включающей: повышенную комплементзависимую цитотоксичность (CDC),  
15 повышенную антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC), повышенный антитело-обусловленный клеточнозависимый фагоцитоз (ADCP), повышенную секрецию цитокинов, повышенное опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими  
клетками, повышенное связывание с NK-клетками, повышенное связывание с макрофагами, повышенное связывание с моноцитами, повышенное связывание с  
20 полиморфоядерными клетками, повышенную непосредственную передачу сигнала, индуцирующего апоптоз, повышенное перекрестное связывание связанных с мишенью антител, повышенное созревание дендритных клеток или повышенное Т-клеточное примирование. В конкретном варианте осуществления изобретения повышенная эффекторная функция представляет собой одну или  
25 несколько функций, выбранных из группы, включающей повышенную CDC, повышенную ADCC, повышенный ADCP и повышенную секрецию цитокинов. В конкретном варианте осуществления изобретения повышенная эффекторная функция представляет собой повышенную ADCC. В одном из вариантов осуществления изобретения ADCC, индуцированная сконструированным Fc-  
30 доменом (или иммуноконъюгатом, который содержит сконструированный Fc-домен) по меньшей мере в 2 раза выше, чем ADCC, индуцируемая не подвергнутым инженерии Fc-доменом (или иммуноконъюгатом, содержащим не подвергнутый инженерии Fc-домен).

### Эффекторные фрагменты

Эффекторные фрагменты, предназначенные для применения в изобретении, представляют собой, как правило, полипептиды, которые влияют на клеточную активность, например, через пути трансдукции сигналов. Таким образом, эффектормый фрагмент иммуноконъюгата, применяемого в изобретении, может быть ассоциирован с опосредуемой рецептором передачей сигналов, что приводит к передаче сигнала от наружной части клеточной мембраны, модулируя ответ в клетке. Например, эффектормый фрагмент иммуноконъюгата может представлять собой цитокин. В конкретных вариантах осуществления изобретения эффектормый фрагмент является человеческим.

В некоторых вариантах осуществления изобретения эффектормый фрагмент представляет собой одноцепочечный эффектормый фрагмент. В конкретном варианте осуществления изобретения эффектормый фрагмент представляет собой цитокин. Примерами приемлемых цитокинов являются (но, не ограничиваясь только ими) GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-21, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  и TNF- $\beta$ . В одном из вариантов осуществления изобретения эффектормый фрагмент иммуноконъюгата представляет собой цитокин, выбранный из группы, включающей GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  и TGF- $\beta$ . В одном из вариантов осуществления изобретения эффектормый фрагмент иммуноконъюгата представляет собой цитокин, выбранный из группы, включающей IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения цитокиновый эффектормый фрагмент подвергают мутации для удаления N-и/или O-связанных сайтов гликозилирования. Элиминация гликозилирования повышает выход гомогенного продукта, получаемого с помощью методов рекомбинации.

В конкретном варианте осуществления изобретения эффектормый фрагмент иммуноконъюгата представляет собой IL-2. В конкретном варианте осуществления изобретения эффектормый фрагмент IL-2 может обуславливать один или несколько клеточных ответов, выбранных из группы, включающей: пролиферацию активированного T-лимфоцита, дифференцировку активированного T-лимфоцита, активность цитотоксической T-клетки (CTL), пролиферацию активированной B-клетки, дифференцировку активированной B-

клетки, пролиферацию естественной клетки-киллера (NK), дифференцировку NK-клетки, секрецию цитокинов активированной Т-клеткой или NK-клеткой и противоопухолевую цитотоксичность NK/лимфоцит-активированных клеток-киллеров (LAK). В другом конкретном варианте осуществления изобретения

5 эффекторный фрагмент IL-2 представляет собой мутантный эффекторный фрагмент IL-2, обладающий пониженной аффинностью связывания с  $\alpha$ -субъединицей IL-2-рецептора. В сочетании с  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицами (которые известны также как CD122 и CD132 соответственно)  $\alpha$ -субъединица (известная также как CD25) образует гетеротримерный высокоаффинный IL-2-рецептор, в

10 то время как димерный рецептор, состоящий только из  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц, обозначают как IL-2-рецептор с промежуточной аффинностью. Как описано в заявке на патент PCT PCT/EP2012/051991, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки, мутантный полипептид IL-2, обладающий пониженной способностью связываться с  $\alpha$ -субъединицей IL-2

15 рецептор обладает пониженной способностью индуцировать передачу сигналов IL-2 в регуляторных Т-клетках, индуцирует пониженную индуцированную активацией клеточную гибель (AICD) Т-клеток и обладает пониженным профилем токсичности *in vivo* по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. Применение такого эффекторного фрагмента, обладающего пониженной

20 токсичностью, наиболее целесообразно в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, который обладает продолжительным временем полужизни в сыворотке из-за присутствия Fc-домена. В одном из вариантов осуществления изобретения представляющий собой мутантный IL-2 эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, содержит по меньшей мере

25 одну аминокислотную мутацию, которая снижает или элиминирует аффинность содержащего мутантный IL-2 эффекторного фрагмента к  $\alpha$ -субъединице IL-2-рецептора (CD25), но сохраняет аффинность содержащего мутантный IL-2 эффекторного фрагмента к IL-2-рецептору с промежуточной аффинностью (который состоит из  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц IL-2-рецептора) по сравнению с

30 содержащим немутантный IL-2 эффекторным фрагментом. В одном из вариантов осуществления изобретения одна или несколько аминокислотных мутаций представляют собой аминокислотные замены. В конкретном варианте осуществления изобретения представляющий собой мутантный IL-2



эффекторный фрагмент несет одну, две или три аминокислотные замены в одном, двух или трех положении(ях), выбранных из положений, которые соответствуют остаткам 42, 45 и 72 человеческого IL-2. В более конкретном варианте осуществления изобретения представляющий собой мутантный IL-2

5 эффекторный фрагмент несет три аминокислотные замены в положениях, соответствующих остатку 42, 45 и 72 человеческого IL-2. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения представляющий собой мутантный IL-2 эффекторный фрагмент представляет собой человеческий IL-2, который содержит аминокислотные замены F42A, Y45A и L72G. В одном из

10 вариантов осуществления изобретения представляющий собой мутантный IL-2 эффекторный фрагмент дополнительно содержит аминокислотную мутацию в положении, соответствующем положению 3 человеческого IL-2, которая приводит к элиминации сайта O-гликозилирования в IL-2. В частности, указанная дополнительная аминокислотная мутация представляет собой

15 аминокислотную замену остатка треонина на остаток аланина. Конкретный представляющий собой мутантный IL-2 эффекторный фрагмент, который можно применять в изобретении, содержит четыре аминокислотные замены в положениях, соответствующих остаткам 3, 42, 45 и 72 человеческого IL-2. Конкретные аминокислотные замены представляют собой T3A, F42A, Y45A и

20 L72G. Как продемонстрировано в заявке на патент РСТ РСТ/EP2012/051991 и в прилагаемых к ней примерах, указанный четырехмутантный полипептид IL-2 (IL-2 qm) не обладает выявляемой способностью к связыванию с CD25, обладает пониженной способностью индуцировать апоптоз Т-клеток, пониженной способностью индуцировать передачу сигналов IL-2 в T<sub>reg</sub>-клетках и

25 пониженным профилем токсичности *in vivo*. Однако он сохраняет способность активировать передачу сигналов IL-2 в эффекторных клетках, индуцировать пролиферацию эффекторных клеток и создание НК-клетками IFN- $\gamma$  в качестве вторичного цитокина.

IL-2 или мутантный IL-2, представляющий собой эффекторный фрагмент, указанный в любом из перечисленных выше вариантов осуществления изобретения, может содержать дополнительные мутации, которые обеспечивают дополнительные преимущества, такие как повышенный уровень экспрессии или повышенная стабильность. Например, цистеин в положении 125 можно заменять

30

на нейтральную аминокислоту, такую как аланин, что позволяет избежать образования связанных дисульфидными мостиками димеров IL-2. Так, в некоторых вариантах осуществления изобретения IL-2 или мутантный IL-2, представляющий собой эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, содержит дополнительную аминокислотную мутацию в положении, соответствующем остатку 125 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная дополнительная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену C125A.

В конкретном варианте осуществления изобретения IL-2, представляющий собой эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2. В другом конкретном варианте осуществления изобретения IL-2, представляющий собой эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3.

В другом варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент иммуноконъюгата представляет собой IL-12. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный IL-12, представляющий собой эффекторный фрагмент, представляет собой содержащий одноцепочечный IL-12 эффекторный фрагмент. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения одноцепочечный IL-12, представляющий собой эффекторный фрагмент, содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 4. В одном из вариантов осуществления изобретения IL-12, представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать один или несколько клеточных ответов, выбранных из группы, включающей: пролиферацию NK-клетки, дифференцировку NK-клетки, пролиферацию Т-клетки и дифференцировку Т-клетки.

В другом варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент иммуноконъюгата представляет собой IL-10. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный IL-10, представляющий собой эффекторный фрагмент, представляет собой содержащий одноцепочечный IL-10 эффекторный фрагмент. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения одноцепочечный IL-10, представляющий собой эффекторный фрагмент, содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5. В другом конкретном варианте осуществления изобретения IL-10,

представляющий собой эффекторный фрагмент, является мономерным IL-10, представляющим собой эффекторный фрагмент. В более конкретном варианте осуществления изобретения мономерный IL-10, представляющий собой эффекторный фрагмент, содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6. В одном из вариантов осуществления изобретения IL-10, представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать один или несколько клеточных ответов, выбранных из группы, включающей: ингибирование секреции цитокинов, ингибирование презентации антигена антигенпрезентирующими клетками, снижение высвобождения кислородных радикалов и ингибирование Т-клеточной пролиферации. Иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, в котором эффекторный фрагмент представляет собой IL-10, наиболее предпочтительно применять для понижающей регуляции воспаления, например, при лечении воспалительного нарушения.

В другом варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент иммуноконъюгата представляет собой IL-15. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный IL-15, представляющий собой эффекторный фрагмент, является мутантным IL-15, представляющим собой эффекторный фрагмент, который обладает пониженной аффинностью связывания с  $\alpha$ -субъединицей IL-15-рецептора. Не вдаваясь в теорию, мутантный полипептид IL-15 с пониженной способностью связываться с  $\alpha$ -субъединицей IL-15-рецептора, обладает пониженной способностью связываться с фибробластами в организме, что приводит к улучшенным фармакокинетическим характеристикам и улучшенному профилю токсичности по сравнению с полипептидом IL-15 дикого типа. Применение эффекторного фрагмента, обладающего пониженной токсичностью, такого как мутантный IL-2 и мутантный IL-15, которые представляют собой описанные эффекторные фрагменты, наиболее целесообразно в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, который обладает продолжительным временем полужизни в сыворотке из-за присутствия Fc-домена. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный IL-15, представляющий собой эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, содержит по меньшей мере одну аминокислотную мутацию, которая снижает или элиминирует аффинность мутантного IL-15, представляющего собой эффекторный фрагмент, к  $\alpha$ -

субъединице IL-15- рецептора, но сохраняет аффинность мутантного IL-15, представляющего собой эффекторный фрагмент, к IL-15/IL-2-рецептору с промежуточной аффинностью (который состоит из  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц IL-15/IL-2-рецептора), по сравнению с немутантным IL-15, представляющим собой эффекторный фрагмент. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену. В конкретном варианте осуществления изобретения мутантный IL-15, представляющий собой эффекторный фрагмент, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 53 человеческого IL-15. В более конкретном варианте осуществления изобретения мутантный IL-15, представляющий собой эффекторный фрагмент, представляет собой человеческий IL-15, который содержит аминокислотную замену E53A. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный IL-15, представляющий собой эффекторный фрагмент, дополнительно содержит аминокислотную мутацию в положении, соответствующем положению 79 человеческого IL-15, которая приводит к элиминации сайта N-гликозилирования в IL-15. В частности, указанная дополнительная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену, приводящую к замене остатка аспарагина на остаток аланана. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения IL-15, представляющий собой эффекторный фрагмент, содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7. В одном из вариантов осуществления изобретения IL-15, представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать один или несколько клеточных ответов, выбранных из группы, включающей: пролиферацию активированного Т-лимфоцита, дифференцировку активированного Т-лимфоцита, активность цитотоксической Т-клетки (CTL), пролиферацию активированной В-клетки, дифференцировку активированной В-клетки, пролиферацию естественной клетки-киллера (NK), дифференцировку NK-клетки, секрецию цитокинов активированной Т-клеткой или NK-клеткой и противоопухолевую цитотоксичность NK/лимфоцит-активированной клетки-киллера (LAK).

Мутантные молекулы цитокинов, применяемые в качестве эффекторных фрагментов в иммуноконъюгатов, можно получать путем делеции, замены, инсерции или модификации с использованием генетических или химических

методов, хорошо известных в данной области. Генетические методы могут включать сайтспецифический мутагенез кодирующих последовательностей ДНК, ПЦР, синтез генов и т.п. Правильность нуклеотидных замен можно 5 подтвердить, например, секвенированием. Замена или инсерция может затрагивать встречающиеся в естественных условиях или не встречающиеся в естественных условиях аминокислотные остатки. Модификацию аминокислот осуществляют с помощью хорошо известных методов химической модификации, таких как добавление или удаление сайтов гликозилирования или присоединения углеводов и т.п.

10 В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент, прежде всего одноцепочечный эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, представляет собой GM-CSF. В конкретном варианте осуществления изобретения GM-CSF, представляющий собой эффекторный фрагмент, может 15 вызывать пролиферацию и/или дифференцировку гранулоцита, моноцита или дендритной клетки. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент, прежде всего одноцепочечный эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, представляет собой IFN- $\alpha$ . В конкретном варианте осуществления изобретения IFN- $\alpha$ , представляющий собой эффекторный 20 фрагмент, может вызывать один или несколько клеточных ответов, выбранных из группы, включающей: ингибирование вирусной репликации в зараженной вирусом клетке и повышающую регуляцию экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости I (ГКГ I). В другом конкретном варианте осуществления изобретения IFN- $\alpha$ , представляющий собой эффекторный фрагмент, может ингибировать пролиферацию опухолевой клетки. В одном из 25 вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент, прежде всего одноцепочечный эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, представляет собой IFN- $\gamma$ . В конкретном варианте осуществления изобретения IFN- $\gamma$ , представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать один или несколько клеточных ответов, выбранных из группы, включающей: повышенную 30 активность макрофагов, повышенную экспрессию молекул ГКГ и повышенную активность NK-клеток. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент, прежде всего одноцепочечный эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, представляет собой IL-7. В конкретном варианте

осуществления изобретения IL-7, представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать пролиферацию Т- и/или В-лимфоцитов. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент, прежде всего одноцепочечный эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, представляет собой IL-8. В конкретном варианте осуществления изобретения IL-8, представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать хемотаксис нейтрофилов. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент, прежде всего одноцепочечный эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, представляет собой MIP-1 $\alpha$ . В конкретном варианте осуществления изобретения MIP-1 $\alpha$ , представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать хемотаксис моноцитов и Т-лимфоцитов. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент, прежде всего одноцепочечный эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, представляет собой MIP-1 $\beta$ . В конкретном варианте осуществления изобретения MIP-1 $\beta$ , представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать хемотаксис моноцитов и Т-лимфоцитов. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент, прежде всего одноцепочечный эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, представляет собой TGF- $\beta$ . В конкретном варианте осуществления изобретения TGF- $\beta$ , представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать один или несколько клеточных ответов, выбранных из группы, включающей: хемотаксис моноцитов, хемотаксис макрофагов, повышающую регуляцию экспрессии IL-1 в активированных макрофагах и повышающую регуляцию экспрессии IgA в активированных В-клетках.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, с рецептором эффекторного фрагмента характеризуется константой диссоциации ( $K_D$ ), которая по меньшей мере примерно в 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 раз выше по сравнению с применяемым в качестве контроля эффекторным фрагментом. В другом варианте осуществления изобретения связывание иммуноконъюгата с рецептором эффекторного фрагмента характеризуется величиной  $K_D$ , которая по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз выше по сравнению с соответствующей молекулой иммуноконъюгата, содержащей два или большее количество эффекторных фрагментов. В другом варианте

осуществления изобретения связывание иммуноконъюгата с рецептором эффекторного фрагмента характеризуется константной диссоциации  $K_D$ , которая примерно в 10 раз выше по сравнению с соответствующей молекулой иммуноконъюгата, содержащей два или большее количество эффекторных фрагментов.

#### Антигенсвязывающие фрагменты

Имуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, содержат по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгаты содержат два антигенсвязывающих фрагмента, т.е. первый и второй антигенсвязывающий фрагмент. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит не более двух антигенсвязывающих фрагментов.

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

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент направлен к антигену, ассоциированному с патологическим состоянием, такому как антиген, презентуемый на опухолевой клетке или в окружении опухолевой клетки, в области воспаления или в инфицированной вирусом клетке.

Примерами опухолевых антигенов являются (но, не ограничиваясь только ими) MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, дипептидилпептидаза IV (DPPIV), белок, связывающий аденозиндеаминазу (ADAbp), циклофилин b, антиген, ассоциированный с колоректальным раком (CRC)-C017-1A/GA733, карциноэмбриональный антиген (CEA) и его иммуногенные эпитопы CAP-1 и

CAP-2, etv6, aml1, простатический антиген (PSA) и его иммуногенные эпитопы PSA-1, PSA-2 и PSA-3, простатический специфический мембранный антиген (PSMA), Т-клеточный рецептор/CD3-зета-цепь, семейство MAGE опухолевых антигенов (например, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), семейство GAGE опухолевых антигенов (например, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, тирозиназа, p53, семейство MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1,  $\alpha$ -фетопротейн, Е-кадхерин,  $\alpha$ -катенин,  $\beta$ -катенин и  $\gamma$ -катенин, p120ctn, gp100 Pmel117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, белок аденоматозного полипоза coli (APC), фодрин, коннексин 37, Ig-идиотип, p15, gp75, ганглиозиды GM2 и GD2, вирусные продукты, такие как белки человеческого вируса папилломы, семейство Smad опухолевых антигенов, Imp-1, P1A, кодируемый EBV ядерный антиген (EBNA)-1, гликогенфосфолипаза головного мозга, SSX-1, SSX-2 (НОМ-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 и CT-7 и c-erbB-2.

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

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

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, могут связываться со следующими специфическими антигенами клеточной поверхности, включающими (но, не ограничиваясь только ими): FAP, Her2, EGFR, IGF-1R, CD22 (В-клеточный рецептор), CD23 (низкоаффинный IgE-рецептор), CD30 (цитокиновый рецептор), CD33 (поверхностный антиген клеток миелоидного ряда), CD40 (рецептор фактора некроза опухолей), IL-6R (IL6-рецептор), CD20, MCSP и PDGF $\beta$ R (рецептор тромбоцитарного фактора роста  $\beta$ ). В конкретных вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой человеческий антиген.



В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент направлен к антигену, презентуемому на опухолевой клетке или в окружении опухолевой клетки. В других вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент направлен к антигену, презентуемому в области воспаления. В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент направлен к антигену, выбранному из группы, включающей фибробласт-активирующий белок (FAP), A1-домен тенасцина-C (TNC A1), A2-домен тенасцина-C (TNC A2), экстра-домен В фибронектина (EDB), карциноэмбриональный антиген (CEA) и ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP).

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

Антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой антитело любого типа или его фрагмент, который сохраняет специфичность связывания с антигенной детерминантой. Фрагменты антитела включают (но, не ограничиваясь только ими)  $V_H$ -фрагменты,  $V_L$ -фрагменты, Fab-фрагменты,  $F(ab')_2$ -фрагменты, scFv-фрагменты, Fv-фрагменты, минитела (минибоди), димерные антитела, тримерные антитела и тетрамерные антитела (см., например, Hudson и Souriau, Nature Med 9, 2003, сс. 129-134). В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу Fab. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула Fab является человеческой. В другом варианте осуществления изобретения указанная молекула Fab является гуманизированной. В следующем варианте осуществления изобретения указанная молекула Fab содержит константные области человеческой тяжелой и легкой цепи.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые являются специфическими для экстра-домена В фибронектина (EDB). В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два

или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые могут конкурировать с моноклональным антителом L19 за связывание с эпитопом EDB (см., например, публикацию PCT WO 2007/128563 A1, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

5 В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, полученного из моноклонального антитела L19, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую в образованию «выступа», которая в свою очередь объединена  
10 карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-2. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215 или ее вариант, который сохраняет функциональность. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой  
15 тяжелая цепь Fab, полученного из моноклонального антитела L19, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «впадины». В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 213 или ее вариант, который  
20 сохраняет функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит легкую цепь Fab, полученного из моноклонального антитела L19. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 217 или ее вариант, который сохраняет функциональность. В следующем варианте  
25 осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 215 и SEQ ID NO: 217 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика. В некоторых вариантах  
30 осуществления изобретения каждая из субъединиц Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной

последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 216. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 216. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 214. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 214. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 218. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 218.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые являются специфическими в отношении A1-домена тенацина (TNC-A1). В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые могут конкурировать с моноклональным антителом F16 за связывание с эпитопом TNC-A1 (см., например, публикацию PCT WO 2007/128563 A1, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые являются специфическими в отношении A1- и/или A4-домена тенацина (TNC-A1 или TNC-A4, или TNC-A1/A4).

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

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

варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью либо SEQ ID NO: 30, либо SEQ ID NO: 32.

5 В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении A1-домена теназина С, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «выступа», которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-2. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении A1-домена теназина С, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «впадины». В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит обе указанные полипептидные последовательности. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит также легкую цепь Fab, специфического в отношении A1-домена теназина С. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, дисульфидным мостиком. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из субъединиц Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, специфических для A2-домена теназина С (TNC-A2). В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 183 и SEQ ID NO: 187, или их вариантам,

сохраняющим функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%

5 идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 181 и SEQ ID NO: 185, или их вариантам, сохраняющим функциональность. В более конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты

10 иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 183 и SEQ ID

15 NO: 187, или их вариантам, сохраняющим функциональность, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 165, SEQ ID

20 NO: 169, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 181 и SEQ ID NO: 185, или их вариантам, сохраняющим функциональность. В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 27 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 25.

25 В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, выбранной из

30 группы, включающей SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 184 и SEQ ID NO: 188. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающих

фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 184 и SEQ ID NO: 188. В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 182 и SEQ ID NO: 186. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 182 и SEQ ID NO: 186.

В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении A1-домена теназина С, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «впадины», которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-10. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 235 или SEQ ID NO: 237 или ее вариант, сохраняющий функциональность. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении A1-домена теназина С, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «выступа». В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит легкую цепь Fab, специфического в отношении A2-домена теназина С. В более конкретном варианте осуществления изобретения

иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 239 или ее вариант, сохраняющий функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 235 и SEQ ID NO: 239 или их варианты, сохраняющие функциональность. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237 и SEQ ID NO: 239 или их варианты, сохраняющие функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из субъединиц Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 236 или SEQ ID NO: 238. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 236 или SEQ ID NO: 238. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 234. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 234. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 240. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 240.



В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении A2-домена тенастина С, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «выступа», которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-2. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 285 или ее вариант, сохраняющий функциональность. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении A2-домена тенастина С, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «впадины». В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 287 или ее вариант, сохраняющий функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит легкую цепь Fab, специфического в отношении A2-домена тенастина С. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 239 или ее вариант, сохраняющий функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 287 и SEQ ID NO: 239 или их варианты, сохраняющие функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из субъединиц Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 286. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат

содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 286. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 288. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 288. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 240. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 240.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или более количество антигенсвязывающих фрагментов, специфических в отношении фибробласт-активирующего белка (FAP). В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 151 и SEQ ID NO: 155, или их вариантам, сохраняющим функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной

области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей: SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 149 и SEQ ID NO: 153, или их вариантам, сохраняющим функциональность. В более конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 151 и SEQ ID NO: 155, или их вариантам, сохраняющим функциональность, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей: SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 149 и SEQ ID NO: 153, или их вариантам, сохраняющим функциональность. В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой

цепи SEQ ID NO: 111 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 109. В другом конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 143 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 141. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 51 и последовательность вариабельной области легкой SEQ ID NO: 49.

10 В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей: SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 156. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, включающей: SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 156. В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной

последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей: SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 150 и SEQ ID NO: 154. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, включающей: SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 150 и SEQ ID NO: 154.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении FAP, объединена карбокиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «выступа», которая в свою очередь объединена карбокиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-2. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 271 и SEQ ID NO: 273 или их варианты, сохраняющие функциональность. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении FAP, объединена карбокиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая

содержит модификацию, приводящую к образованию «выступа», которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-15. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 199 или ее вариант, сохраняющий функциональность. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении FAP, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «впадины». В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 201 и SEQ ID NO: 207, или ее вариант, сохраняющий функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит легкую цепь Fab, специфического в отношении FAP. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 205 или SEQ ID NO: 211 или ее вариант, сохраняющий функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 205, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 193 и полипептидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 и SEQ ID NO: 269, или их варианты, сохраняющие функциональность. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203 и SEQ ID NO: 205 или их варианты, сохраняющие функциональность. В еще одном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 209 и SEQ ID NO: 211 или их варианты, сохраняющие функциональность. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 193 и SEQ ID NO: 269 или варианты, сохраняющие функциональность. Еще в одном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 207 и SEQ ID NO: 271 или их

варианты, сохраняющие функциональность. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 207 и SEQ ID NO: 273 или их варианты, сохраняющие функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из субъединиц Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G.

В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении FAP, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «впадины», которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-10. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 243 или SEQ ID NO: 245 или ее вариант, сохраняющий функциональность. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении FAP, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «выступа». В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 241 или ее вариант, который сохраняет функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит легкую цепь Fab, специфического в отношении FAP. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 205 или ее вариант, который сохраняет функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 241 и SEQ ID NO: 243 или их варианты, сохраняющие функциональность. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 241 и SEQ ID NO: 245 или их варианты,

сохраняющие функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из субъединиц Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G.

5 В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, выбранной из

10 группы, включающей SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 270, SEQ ID NO: 272 и SEQ ID NO: 274. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 198, SEQ ID

15 NO: 200, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 270, SEQ ID NO: 272 и SEQ ID NO: 274. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, выбранной из

20 группы, включающей SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 242. В еще одном конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 242. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую

25 полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 206 или SEQ ID NO: 212. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную

30



последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 206 или SEQ ID NO: 212.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые являются специфическими для карциноэмбрионального антигена (CEA). В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 191 или SEQ ID NO: 295 или ее варианту, сохраняющему функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 189 или SEQ ID NO: 293 или ее варианту, сохраняющему функциональность. В более конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 191 или ее варианту, сохраняющему функциональность, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 189 или ее варианту, сохраняющему функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 295 или ее варианту, сохраняющему функциональность, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 293 или ее варианту, сохраняющему функциональность.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 192 или SEQ ID NO: 296. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 192 или SEQ ID NO: 296. В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 190 или SEQ ID NO: 294. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 190 или SEQ ID NO: 294.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении СЕА, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «выступа», которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-2. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 277 и SEQ ID NO: 279 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении СЕА, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «впадины». В более конкретном варианте осуществления изобретения

иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 227 или SEQ ID NO: 281, или ее вариант, который сохраняет функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит легкую цепь Fab, специфического в отношении СЕА. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 231 или SEQ ID NO: 283, или ее вариант, который сохраняет функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 229 и SEQ ID NO: 231 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 281 и SEQ ID NO: 283 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 281 и SEQ ID NO: 283 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 281 и SEQ ID NO: 283 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидная цепь Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, которая кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO: 276, SEQ ID NO: 278 и SEQ ID NO: 280. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, которая кодируется полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO: 276, SEQ ID NO: 278 и SEQ ID NO: 280. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую

полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 228 или SEQ ID NO: 282. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 228 или SEQ ID NO: 282. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 232 или SEQ ID NO: 284. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 232 или SEQ ID NO: 284.

В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой полипептид эффекторного фрагмента объединен карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, содержащей модификацию, которая приводит к образованию «выступа». В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 249 и SEQ ID NO: 251 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит также полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении FAP, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, содержащей модификацию, которая приводит к образованию «впадины». В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит также полипептидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 201 и SEQ ID NO: 207 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом указанном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит также полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении EDB, TNC A1, TNC A2 или SEA, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-

домена, содержащей модификацию, которая приводит к образованию «впадины». В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из субъединиц Fc- домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G. Согласно любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат может содержать также легкую цепь Fab, специфического в отношении соответствующего антигена.

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, включают иммуноконъюгаты, имеющие последовательности, которые по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 293, 295, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 и 287, включая их функциональные фрагменты или варианты. Изобретение относится также к иммуноконъюгатам, которые содержат указанные последовательности с консервативными аминокислотными заменами.

#### Полинуклеотиды

Изобретение относится также к выделенным полинуклеотидам, кодирующим иммуноконъюгаты, указанные в настоящем описании, или их фрагменты.

Полинуклеотиды, предлагаемые в изобретении, включают полинуклеотиды, которые по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 294, 296, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250,

252, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286 и 288, включая их функциональные фрагменты или варианты.

Полинуклеотиды, кодирующие иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно экспрессировать в виде индивидуального полинуклеотида, который кодирует полный иммуноконъюгат, или в виде нескольких (например, 5 двух или большего количества) совместно экспрессируемых полинуклеотидов. Полипептиды, кодируемые совместно экспрессируемыми полинуклеотидами, можно соединять, например, через дисульфидные мостики или другими путями с образованием функционального иммуноконъюгата. Например, представляющая 10 собой легкую цепь часть антигенсвязывающего фрагмента может кодироваться полинуклеотидом, отличным от полинуклеотида, кодирующего часть иммуноконъюгата, содержащего область тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента, субъединицы Fc-домена и необязательно эффекторного фрагмента. При совместной экспрессии полипептиды тяжелой цепи должны связываться с 15 полипептидами легкой цепи с образованием антигенсвязывающего фрагмента. В другом примере часть иммуноконъюгата, содержащая область тяжелой цепи первого антигенсвязывающего фрагмента, одну из двух субъединиц Fc-домена и эффекторный фрагмент, может кодироваться полинуклеотидом, отличным от полинуклеотида, который кодирует часть иммуноконъюгата, содержащую 20 область тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента и вторую из двух субъединиц Fc-домена. При совместной экспрессии субъединицы Fc-домена должны связываться с образованием Fc-домена.

В одном из вариантов осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует фрагмент 25 иммуноконъюгата, содержащий первый антигенсвязывающий фрагмент, Fc-домен, состоящий из двух субъединиц, и один эффекторный фрагмент, при этом, антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий домен, который содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, в частности, молекулы Fab. В одном из вариантов осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует 30 тяжелую цепь первого антигенсвязывающего фрагмента, субъединицу Fc-домена и эффекторный фрагмент. В другом варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует тяжелую

цепь первого антигенсвязывающего фрагмента и субъединицу Fc-домена. В следующем варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует субъединицу Fc-домена и эффекторный фрагмент. В более конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, в котором тяжелая цепь Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена. В другом конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, в котором субъединица Fc-домена объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом эффекторного фрагмента. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, в котором тяжелая цепь Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом эффекторного фрагмента. В другом конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, в котором полипептид эффекторного фрагмента объединен карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует последовательность вариабельной области, представленную в SEQ ID NO 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 293 или 295. Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует полипептидную последовательность, представленную в SEQ ID NO 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 или 287. Следующим вариантом осуществления изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий

иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 294, 296, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286 или 288. Другим вариантом осуществления изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 294, 296, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286 или 288. Другим вариантом осуществления изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует последовательность вариабельной области, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 293 или 295. Другим вариантом осуществления изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую полипептидную последовательность, которая



по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 или 287. Изобретение  
5 относится также к выделенному полинуклеотиду, кодирующему иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует последовательности вариабельной области SEQ ID NO 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99,  
10 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 293 или 295, имеющие консервативные аминокислотные замены. Изобретение относится также к выделенному полинуклеотиду, который кодирует иммуноконъюгат,  
15 предлагаемый в изобретении, или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует полипептидные последовательности SEQ ID NO: 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 или 287, имеющие консервативные аминокислотные замены.

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

«Ненаправленные» (не имеющие специфической мишени) конъюгаты

Изобретение относится не только к иммуноконъюгатам, направленным к специфическому антигену (например, опухолевому антигену), но также и к «ненаправленным» конъюгатам, которые содержат одну или несколько молекул  
30 Fab, которые не связываются специфически с каким-либо антигеном, в частности, не связываются с каким-либо человеческим антигеном. Отсутствие способности к специфическому связыванию у этих конъюгатов с каким-либо антигеном (т.е. отсутствие какого-либо связывания, которое можно отличить от

неспецифического взаимодействия) можно оценивать, например, с помощью методов ELISA или резонанса поверхностного плазмона, которые представлены в настоящем описании. Указанные конъюгаты, в частности, можно применять, например, для удлинения времени полужизни в сыворотке эффекторного фрагмента по сравнению со временем полужизни в сыворотке неконъюгированного эффекторного фрагмента, когда не требуется направленный перенос к конкретной ткани.

В частности, в изобретении предложен конъюгат, который содержит первую молекулу Fab, которая не связывается специфически с каким-либо антигеном, Fc-домен, состоящий из двух субъединиц, и эффекторный фрагмент, где к конъюгату присутствует не более одного эффекторного фрагмента. Более конкретно, в изобретении предложен конъюгат, который содержит первую молекулу Fab, содержащую последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 297, Fc-домен, состоящий из двух субъединиц, и эффекторный фрагмент, где в конъюгате присутствует не более одного эффекторного фрагмента. Подобно предлагаемым в изобретении иммуноконъюгатам, конъюгаты могут иметь различные конфигурации, описанные в разделе «Форматы иммуноконъюгатов» (антигенсвязывающ фрагмент иммуноконъюгата можно заменять на молекулу Fab, которая не связывается специфически с каким-либо антигеном, такую как молекула Fab, которая содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 297). Аналогично этому, особенности Fc-домена, а также эффекторного фрагмента, описанные выше в разделах «Fc-домен» и «Эффекторные фрагменты» для иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, равным образом применимы, индивидуально или в комбинации, к «ненаправленным» конъюгатам, предлагаемым в изобретении.

В конкретном варианте осуществления изобретения конъюгат содержит (I) молекулу иммуноглобулина, содержащую первую и вторую молекулу Fab, которая не связывается специфически с каким-либо антигеном, и Fc-домен, и (II) эффекторный фрагмент, где в конъюгате присутствует не более одного эффекторного фрагмента и где молекула иммуноглобулина представляет собой человеческий иммуноглобулин подкласса IgG1; Fc-домен содержит

модификацию, приводящую к образованию «выступа», в одной из его двух субъединиц и модификацию, приводящую к образованию «впадины», в другой из указанных субъединиц, и аминокислотные замены L234A, L235A и P329G в каждой из его субъединиц; и эффекторный фрагмент представляет собой молекулу IL-2, слитую с карбоксиконцевой аминокислотной одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, необязательно через линкерный пептид. В конкретном варианте осуществления изобретения конъюгат содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 297.

В определенных вариантах осуществления изобретения конъюгат содержит (I) молекулу иммуноглобулина, которая содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 297, (II) эффекторный фрагмент, где в конъюгате присутствует не более одного эффекторного фрагмента. В одном из таких вариантов осуществления изобретения молекула иммуноглобулина представляет собой человеческий иммуноглобулин подкласса IgG1. В одном из таких вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит модификацию, приводящую к образованию «выступа», в одной из его двух субъединиц и модификацию, приводящую к образованию «впадины», в другой из его двух субъединиц. В конкретном указанном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G в каждой из его субъединиц. В следующем указанном варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент представляет собой молекулу IL-2, слитую с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, необязательно через линкерный пептид.

В одном из вариантов осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, который не связывается специфически с каким-либо антигеном, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, содержащей модификацию, приводящую к образованию «выступа», которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-2. В более конкретном варианте осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ

ID NO: 221, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 289 и SEQ ID NO: 291, или ее вариант, который сохраняет функциональность. В одном из вариантов осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab-фрагмента, который не связывается специфически с каким-либо антигеном, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, содержащей модификацию, приводящую к образованию «впадины». В более конкретном варианте осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 219 или ее вариант, который сохраняет функциональность. В другом варианте осуществления изобретения конъюгат содержит легкую цепь Fab-фрагмента, который не связывается специфически с каким-либо антигеном. В более конкретном варианте осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 225 или ее вариант, который сохраняет функциональность. В другом варианте осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 221 и SEQ ID NO: 225 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом варианте осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223 и SEQ ID NO: 225 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом варианте осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 289 и SEQ ID NO: 225 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом варианте осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 291 и SEQ ID NO: 225 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные цепи Fc-домена содержат аминокислотные замены L234A, L235A и P329G.

В конкретном варианте осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, выбранной из

группы, включающей SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 290 и SEQ ID NO: 292. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 290 и SEQ ID NO: 292.

Изобретение относится также к выделенному полинуклеотиду, который кодирует конъюгат, предлагаемый в изобретении, или его фрагмент. В конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид содержит последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 290 и SEQ ID NO: 292. Изобретение относится также к экспрессионному вектору, содержащему выделенный полинуклеотид, и клетке-хозяину, содержащей выделенный полинуклеотид или экспрессионный вектор, предлагаемый в изобретении. Следующим объектом изобретения является способ получения конъюгата, предлагаемого в изобретении, заключающийся в том, что осуществляют стадии, на которых а) культивируют клетку-хозяина, предлагаемую в изобретении, в условиях, пригодных для экспрессии конъюгата, и б) выделяют конъюгат. Изобретение относится также к конъюгату, полученному способом, предлагаемым в изобретении. В настоящем описании представлены способы получения иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении (см., например, раздел «Методы рекомбинации»), которые равным образом можно применять к конъюгатам, предлагаемым в изобретении.

Изобретение относится также к фармацевтической композиции, которая содержит конъюгат, предлагаемый в изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель. В настоящем описании представлены фармацевтические композиции иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении (см., например, раздел «Композиции, препаративные формы и пути введения»), которые равным образом можно применять к конъюгатам, предлагаемым в изобретении.

Кроме того, конъюгаты можно применять в способах применения, представленных в настоящем описании для иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении. В настоящем описании представлены способы применения иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, для лечения заболевания (см., например, разделы «Терапевтические методы и композиции», «Другие агенты и пути лечения» и «Изделия»), которые равным образом можно применять к конъюгатам, предлагаемым в изобретении.

#### Методы рекомбинации

Имуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно получать, например, путем твердофазного пептидного синтеза (например, твердофазный синтез Меррифилда) или методом рекомбинации. Для рекомбинантного получения один или несколько полинуклеотидов, кодирующих иммуноконъюгат (фрагмент), например, описанный выше, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для дополнительного клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Указанный полинуклеотид легко выделять и секвенировать с помощью общепринятых процедур. Одним из вариантов осуществления изобретения является вектор, предпочтительно экспрессионный вектор, содержащий один или несколько полинуклеотидов, предлагаемых в изобретении. Методы, хорошо известные специалистам в данной области, можно применять для конструирования экспрессионных векторов, содержащих кодирующую последовательность иммуноконъюгата (фрагмента) наряду с приемлемыми контролирующими транскрипцию/трансляцию сигналами. Эти методы включают технологии рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и рекомбинации/генетической рекомбинации *in vivo* (см., например, методы, описанные у Maniatis и др., Maniatis и др., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989; и Ausubel и др., *Current Protocols in Molecular Biology*, изд-во Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989). Экспрессионный вектор может представлять собой часть плазмиды, вируса или может представлять собой фрагмент нуклеиновой кислоты. Экспрессионный вектор включает кассету экспрессии, в которой полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат (фрагмент) (т.е. кодирующую область), клонируют с обеспечением функциональной связи с промотором и/или другими элементами, контролирующими транскрипцию или трансляцию. В

контексте настоящего описания «кодирующая область» представляет собой часть нуклеиновой кислоты, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя «стоп-кодон» (TAG, TGA или TAA) не транслируется в аминокислоту, он, в случае его присутствия, может рассматриваться как часть

5 кодирующей области, однако любые фланкирующие последовательности, например, промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны, 5'- и 3'-нетранслируемые области и т.п., не являются частью кодирующей области. Две или большее количество кодирующих областей может присутствовать в индивидуальной полинуклеотидной конструкции, например,

10 индивидуальном векторе, или в отдельных полинуклеотидных конструкциях, например, отдельных (различных) векторах. Кроме того, любой вектор может содержать одну кодирующую область или может содержать две или большее количество кодирующих областей, например, вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, может кодировать один или несколько полипептидов, которые

15 пост- или котрансляционно разделяются на конечные белки посредством протеолитического расщепления. Кроме того, вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кислота, предлагаемый/предлагаемая в изобретении, может кодировать гетерологичные кодирующие области, либо слитые, либо не слитые с полинуклеотидом, который кодирует иммуноконъюгат (фрагмент),

20 предлагаемый в изобретении, или его вариант или производное. Гетерологичные кодирующие области включают (но, не ограничиваясь только ими) специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен. Функциональная связь имеет место, когда кодирующая область генного продукта, например

25 полипептида, ассоциирована с одной или несколькими регуляторными последовательностями таким образом, чтобы экспрессия генного продукта находилась под воздействием или контролем регуляторной(ых) последовательности(ей). Два ДНК-фрагмента (таких как кодирующая область полипептида и ассоциированный с ней промотор) являются «функционально

30 связанными», если индукция промоторной функции приводит к транскрипции мРНК, кодирующей требуемый генный продукт, и если природа связи между двумя ДНК-фрагментами не оказывает воздействия на способность регулирующих экспрессию последовательностей направлять экспрессию генного

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



репликации и/или интегрированные в хромосому элементы, такие как длинные концевые повторы (LTR) ретровирусов, или инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV).

Кодирующие области полинуклеотида и нуклеиновой кислоты, предлагаемые в настоящем изобретении, могут быть ассоциированы с дополнительными кодирующими областями, которые кодируют секреторные или сигнальные пептиды, которые направляют секрецию полипептида, кодируемого полинуклеотидом, предлагаемым в настоящем изобретении. Например, если требуется секреция иммуноконъюгата, то ДНК, кодирующая сигнальную последовательность, можно помещать против хода транскрипции относительно нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, или их фрагмент. Согласно гипотезе, касающейся сигналов, белки, секреторируемые клетками млекопитающих, имеют сигнальный пептид или секреторную лидерную последовательность, который/которая отщепляется от зрелого белка после инициации экспорта растущей белковой цепи через шероховатый эндоплазматический ретикулум. Обычным специалистам в данной области должно быть очевидно, что полипептиды, секреторируемые клетками позвоночных животных, как правило, имеют сигнальный пептид, слитый с N-концом полипептида, который отщепляется от транслируемого полипептида с образованием секреторируемой или «зрелой» формы полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения используют нативный сигнальный пептид, например, сигнальный пептид тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина или функциональное производное указанной последовательности, которое сохраняет способность обеспечивать секрецию полипептида, функционально связанного с ним. Альтернативно этому, можно применять гетерологичный сигнальный пептид млекопитающих или его функциональное производное. Например, лидерную последовательность дикого типа можно заменять на лидерную последовательность человеческого тканевого активатора плазминогена (ТРА) или мышинной  $\beta$ -глюкуронидазы. Примеры аминокислотных и полинуклеотидных последовательностей секреторных сигнальных пептидов представлены в SEQ ID NO: 8-16.

ДНК, кодирующую короткую белковую последовательность, которую можно применять для облегчения дальнейшей очистки (например, гистидиновую

метку), или предназначенную для мечения иммуноконъюгата, можно включать внутрь или на концы полинуклеотида, кодирующего иммуноконъюгат (фрагмент).

5           Дополнительным вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяин, содержащая один или несколько полинуклеотидов, предлагаемых в изобретении. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является клетка-хозяин, содержащая один или несколько векторов, предлагаемых в изобретении. Полинуклеотиды и векторы могут обладать любыми особенностями, индивидуально или в сочетании, указанными в настоящем  
10 описании касательно полинуклеотидов и векторов соответственно. В одном из таких вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин содержит (например, трансформирована или трансфектирована) вектором, содержащим полинуклеотид, который кодирует (часть) иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении. В контексте настоящего описания понятие «клетка-хозяин»  
15 относится к любому типу клеточной системы, которую можно конструировать для получения иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, и их фрагментов. Клетки-хозяева, пригодные для репликации и для поддержания экспрессии иммуноконъюгатов, хорошо известны в данной области. Такие клетки можно трансфектировать или трансдуцировать соответствующим  
20 образом конкретным экспрессионным вектором и можно выращивать большее количество содержащих вектор клеток с целью внесения в ферментеры для крупномасштабных процессов получения иммуноконъюгата в достаточных для клинических применений количествах. Приемлемыми клетками-хозяевами являются прокариотические микроорганизмы, такие как *E. coli*, или различные  
25 эукариотические клетки, такие как клетки яичника китайского хомячка (СНО), клетки насекомых или т.п. Например, полипептиды можно получать в бактериях, в частности, когда отсутствует потребность в гликозилировании. После экспрессии полипептид можно выделять из пасты бактериальных клеток в растворимую фракцию и можно дополнительно очищать. Помимо прокариот, в  
30 качестве хозяев для клонирования или экспрессии векторов, которые кодируют полипептид, можно использовать эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были «гуманизированы», что позволяет получать

полипептид с частично или полностью человеческой схемой гликозилирования (см. Gerngross, Nat. Biotech. 22, 2004, сс. 1409-1414 и Li и др., Nat. Biotech. 24, 2006, сс. 210-215). Клетки-хозяева, которые можно использовать для экспрессии (гликозилированных) полипептидов, получают также из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных животных). Примерами клеток беспозвоночных являются клетки насекомых, а также можно применять клетки растений. Были выявлены многочисленные бакуловирусные штаммы и соответствующие пригодные для них в качестве хозяев клетки насекомых, прежде всего для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. В качестве хозяев можно применять также культуры растительных клеток (см., например, U.S. №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описание технологии PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях). В качестве хозяев можно применять также клетки позвоночных животных. Например, можно использовать клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы к росту в суспензии. Другими примерами приемлемых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная с помощью SV40 (COS-7); линия клеток почки эмбриона человека (293 или клетки линии 293, субклонированные с целью выращивания в суспензионной культуре, Graham и др., J. Gen. Virol., 36, 1977, с. 59); клетки почки детеныша хомяка (ВНК); клетки Сертоли мыши (ТМ4-клетки, описанные, например, у Mather, Biol. Reprod., 23, 1980, сс. 243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76,); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени бычьей крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, у Mather и др., Annals N.Y. Acad. Sci., 383, 1982, сс. 44-68); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другими ценными линиями клеток-хозяев млекопитающих являются клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая dhfr<sup>-</sup>-CHO-клетки (Urlaub и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1980, с. 4216); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор конкретных линий клеток-хозяев млекопитающих, которые можно применять для производства белка, см., например, у Yazaki и Wu, в: Methods in Molecular Biology под ред. В.К.С. Lo, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс.

255-268. Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых, клетки бактерий и клетки растений (но не ограничиваясь только ими), а также клетки, находящиеся в организме трансгенного животного, трансгенного растения или культивируемой растительной или животной ткани. В одном из вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, предпочтительно клетку млекопитающего, такую как клетка яичника китайского хомячка (CHO), клетка почки человеческого эмбриона (HEK) или лимфоидная клетка (например, клетка Y0, NS0, Sp20).

В данной области известны стандартные технологии для экспрессии чужеродных генов в этих системах. Клетки, экспрессирующие полипептид, содержащий либо тяжелую, либо легкую цепь антигенсвязывающего домена, такого как антитело, можно конструировать таким образом, чтобы в них происходила экспрессия других цепей антитела, например, таким образом, чтобы экспрессируемый продукт представлял собой антитело, которое имеет как тяжелую, так и легкую цепь.

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

Компоненты иммуноконъюгата генетически слиты друг с другом.

Имуноконъюгаты можно создавать так, чтобы их компоненты сливать друг с другом непосредственно или косвенно через линкерную последовательность. Состав и длину линкера можно определять с помощью методов, хорошо известных в данной области, и можно оценивать эффективность. Примеры линкерных последовательностей, расположенных между эффекторным фрагментом и Fc-доменом, представлены в последовательностях SEQ ID NO 195, 197, 199, 203, 209, 215, 229, 235, 237, 243, 245, 247, 249, 251, 269, 271, 273, 275, 277, 279 и 285. Можно включать также дополнительные последовательности для встраивания сайта расщепления, если требуется разделение индивидуальных

компонентов слияния, например, последовательность, распознаваемую эндопептидазой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата содержит(ат) по меньшей мере 5 вариабельную область антитела, обладающую способностью связываться с антигенной детерминантой. Вариабельные области могут образовывать часть встречающихся в естественных условиях или не встречающихся в естественных условиях антител или их фрагментов или могут быть выведены из них. Методы получения поликлональных антител и моноклональных антител хорошо известны в данной области (см., например, Harlow и Lane, «Antibodies: a Laboratory Manual», изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Не встречающиеся в естественных условиях антитела можно создавать с помощью твердофазного пептидного синтеза, можно получать с помощью методов рекомбинации (например, описанных в U.S. № 4186567) или можно получать, например, путем скрининга комбинаторных библиотек, содержащих 15 вариабельные области тяжелых цепей и вариабельные области легких цепей (см., например, U.S. №. 5969108 на имя McCafferty). Антигенсвязывающие фрагменты и методы их получения подробно описаны также в публикации PCT WO 2011/020783, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки. 20

Любые виды антител, фрагментов антител, антигенсвязывающих доменов или вариабельных областей животного происхождения можно применять в иммуноконъюгатах, предлагаемых в изобретении. Примерами антител, фрагментов антител, антигенсвязывающих доменов или вариабельных областей, 25 которые можно применять согласно настоящему изобретению, являются (но, не ограничиваясь только ими) конструкции, полученные из организма мышей, приматов или человека. Если иммуноконъюгат предназначен для применения на человеке, то можно применять химерную форму антитела, в которой константные области антитела получают из человеческого антитела. 30 Гуманизированную или полностью человеческую форму антитела можно получать также с помощью методов, хорошо известных в данной области (см., например, U.S. № 5565332 на имя Winter). Для осуществления гуманизации можно применять различные методы, такие как (но, не ограничиваясь только

ими) (а) трансплантация нечеловеческих (например, из антитела-донора) CDR в человеческий (например, антитело-реципиент) каркасный участок и константные области, сохраняющие или не сохраняющие имеющие решающее значение остатки каркасного участка (например, остатки, важные для сохранения хорошей антигенсвязывающей аффинности или функций антитела), (б) трансплантация только нечеловеческих определяющих специфичность участков (SDR или a-CDR; остатки имеют решающее значение для взаимодействия антитело-антиген) в человеческий каркасный участок и константные области, или (в) трансплантация полных нечеловеческих переменных доменов, но их «маскировка» напоминающим человеческий сегментом путем замены поверхностных остатков. Обзор гуманизованных антител и методов их получения см., например, у Almagro и Fransson, *Front Biosci* 13, 12008, сс. 1619-1633, и они описаны также, например, у Riechmann и др., *Nature* 332, 1988, сс. 323-329; Queen и др., *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1989, сс. 10029-10033; U.S. №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Jones и др., *Nature* 321, 1986, сс. 522-525; Morrison и др., *Proc Natl Acad Sci* 81, 1984, сс. 6851-6855; Morrison и Oi, *Adv Immunol* 44, 1988, сс. 65-92; Verhoeven и др., *Science* 239, 1988, сс. 1534-1536; Padlan, *Molec Immunol* 31(3), 1994, сс. 169-217; Kashmiri и др., *Methods* 36, 2005, сс. 25-34) (описание трансплантации SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 1991, сс. 489-498 (описание «повторного покрытия»); Dall'Acqua и др., *Methods* 36, 2005, сс. 43-60 (описание «перестановки FR») и Osbourn и др., *Methods* 36, 2005, сс. 61-68, и Klimka и др., *Br J Cancer* 83, 2000, сс. 252-260 (описание подхода на основе «целенаправленной селекции» для перестановки FR).

Человеческие антитела и человеческие переменные области можно получать с помощью различных методик, известных в данной области. Человеческие антитела описаны в целом у van Dijk и van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 2001, сс. 368-374 и Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 2008, сс. 450-459.

Человеческие переменные области могут образовывать часть человеческих моноклональных антител или могут быть получены из них с помощью метода гибридом (см., например, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, сс. 51-63).

Человеческие антитела и человеческие переменные области можно получать также путем введения иммуногена трансгенному животному, которое

модифицировано таким образом, что может продуцировать интактные человеческие антитела или интактные антитела с человеческими переменными областями в ответ на контрольное заражение антигеном (см., например, Lonberg, Nat Biotech 23, 2005, сс. 1117-1125). Человеческие антитела и человеческие 5 переменные области можно создавать также путем выделения последовательностей переменных областей Fv-клона, отобранных из человеческих фаговых дисплейных библиотек (см., например, Hoogenboom и др. в: Methods in Molecular Biology, под ред. O'Brien и др., изд-во Human Press, Totowa, NJ, 178, 2001, сс. 1-37); и McCafferty и др., Nature 348, 552-554; Clackson 10 и др., Nature 352, 1991, сс. 624-628). Фаг, как правило, экспонирует фрагменты антител либо в виде одноцепочечных Fv- (scFv)-фрагментов, либо в виде Fab-фрагментов. Подробное описание получения антигенсвязывающих фрагментов для иммуноконъюгатов с помощью фагового дисплея представлено в примерах, прилагаемых к публикации PCT WO 2011/020783.

15 В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты, пригодные для применения согласно настоящему изобретению, создают так, чтобы они обладали повышенной аффинностью связывания, например, с помощью методов, описанных в публикации PCT WO 2011/020783 (см. примеры, касающиеся созревания аффинности) или публикации заявки на 20 патент США № 2004/0132066, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки. Способность иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, связываться со специфической антигенной детерминантой можно оценивать количественно либо с помощью твердофазного ферментного анализа (ELISA), либо другими методиками, известными 25 специалисту в данной области, например, с помощью метода резонанса поверхностно плазмона (осуществляя анализ с использованием системы BIACORE T100) (Liljeblad и др., Glyco J 17, 2000, сс. 323-329), и традиционных анализов связывания (Heeley, Endocr Res 28, 2002, сс. 217-229). Анализы в условиях конкуренции можно применять для идентификации антитела, 30 фрагмента антитела, антигенсвязывающего домена или переменного домена, конкурирующего с референс-антителом за связывание с конкретным антигеном, например, антитела, которое конкурирует с антителом L19 за связывание с экстра-доменом В фибронектина (EDB). В некоторых вариантах осуществления

изобретения указанное конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается референс-антитело. Подробные приведенные в качестве примеров методы картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены у Morris, «Epitope Mapping Protocols», в: Methods in Molecular Biology, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 66, 1996. При осуществлении приведенного в качестве примера анализа в условиях конкуренции иммобилизованный антиген (например, EDB) инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с антигеном (например, антитело L19), и вторым немеченым антителом, которое подлежит тестированию в отношении его способности конкурировать с первым антителом за связывание с антигеном. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный антиген инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не содержащем второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, обеспечивающих связывание первого антитела с антигеном, избыток несвязанного антитела удаляют и оценивают количество метки, ассоциированной с иммобилизованным антигеном. Если количество метки, ассоциированной с иммобилизованным антигеном, существенно снижено в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом, то это свидетельствует о том, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с антигеном (см. Harlow и Lane. Antibodies: A Laboratory Manual, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, гл. 14, 1988).

Имуноконъюгаты, полученные с помощью представленных в настоящем описании методов, можно очищать с использованием известных в данной области методик, таких как жидкостная хроматография высокого разрешения, ионообменная хроматография, гель-электрофорез, аффинная хроматография, гель-фильтрация и т.п. Фактические условия, применяемые для очистки конкретного белка, зависят, в частности, от таких факторов, как чистый заряд, гидрофобность, гидрофильность и т.д., и они должны быть очевидны специалисту в данной области. Для очистки антитела с помощью аффинной хроматографии можно использовать лиганд, рецептор или антиген, с которым связывается иммуноконъюгат. Например, для очистки с помощью аффинной хроматографии иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, можно



использовать матрикс с белком А или белком G. Например, последовательное применение аффинной хроматографии на белке А или G и гель-фильтрации можно применять для выделения иммуноконъюгата, практически согласно методу, описанному в разделе «Примеры». Чистоту иммуноконъюгатов можно определять с помощью любого из широкого разнообразия хорошо известных аналитических методов, включая гель-электрофорез, жидкостную хроматографию высокого давления и т.п. Например, установлено, что содержащие тяжелые цепи слитые белки, которые экспрессировали согласно описанным в разделе «Примеры» методам, являются интактными и правильно собранными, что продемонстрировано с помощью ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях (см., например, фиг. 4). Разделяли три полосы, соответствующие примерно Mr 25000, Mr 50000 и Mr 60000, которые соответствовали предсказанным молекулярным массам легкой цепи, тяжелой цепи иммуноглобулина и слитому белку тяжелая цепь /эффекторный фрагмент.

#### 15 Анализы

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

#### 20 Анализы аффинности

Аффинность иммуноконъюгата к рецептору эффекторного фрагмента (например, IL-10R или различных форм IL-2R), Fc-рецептору или антигену-мишени можно определять согласно методу, описанному в разделе «Примеры» с помощью резонанса поверхностного плазмона (SPR), используя стандартную инструментальную базу, например, устройство BIAcore (фирма GE Healthcare), и рецепторы или белки-мишени, которые можно получать с помощью рекомбинантной экспрессии. Альтернативно этому, связывание иммуноконъюгатов с различными рецепторами или антигенами-мишенями можно оценивать с использованием клеточных линий, экспрессирующих конкретный рецептор или антиген-мишень, например, с помощью проточной цитометрии (FACS). Конкретный иллюстративный и приведенный в качестве примера вариант измерения аффинности связывания описан ниже в разделе «Примеры».

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения величину  $K_D$  измеряли методом резонанса поверхностного плазмона с помощью устройства BIACORE® T100 (фирма GE Healthcare) при 25°C с использованием лиганда (например, рецептора эффекторного фрагмента, Fc-рецептора или антигена-мишени), иммобилизованного на CM5-чипах. В целом, метод состоял в следующем: биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, фирма GE Healthcare) активировали с помощью гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимида (NHS) согласно инструкциям поставщика. Рекомбинантный лиганд разводили 10мМ ацетатом натрия, pH 5,5 до концентрации 0,5-30 мкг/мл перед инъекцией со скоростью потока 10 мкл/мин для достижения примерно 100-5000 единиц ответа (RU) связанного белка. После инъекции лиганда инъецировали 1М этаноламин для блокады непрореагировавших групп. Для кинетических измерений инъецировали трех- пятикратные серийные разведения иммуноконъюгата (диапазон от ~0,01 до 300нМ) в буфере HBS-EP+ (фирма GE Healthcare, 10мМ HEPES, 150мМ NaCl, 3мМ ЭДТК, 0,05% сурфактанта P20, pH 7,4) при 25°C со скоростью потока примерно 30-50 мкл/мин. Скорость реакции ассоциации ( $k_{on}$ ) и реакции диссоциации ( $k_{off}$ ) рассчитывали с использованием простой модели связывания Ленгмюра 1:1 (программа BIACORE® T100 Evaluation Software, версия 1.1.1) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесия реакции диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывали как соотношение  $k_{off}/k_{on}$  (см., например, Chen и др., J Mol Biol 293, 1999, сс. 865-881).

#### Анализы активности

Биологическую активность иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, можно определять с помощью различных анализов, описанных в разделе «Примеры». Виды биологической активности могут включать, например, индукцию пролиферации несущих рецептор эффекторного фрагмента клеток, индукцию передачи сигнала несущих рецептор эффекторного фрагмента клеток, индукцию секреции цитокинов несущими рецептор эффекторного фрагмента клетками, и индукцию регресса опухоли и/или повышение времени выживания.

Композиции, препаративные формы и пути введения

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

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

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат в терапевтически эффективном количестве один или несколько иммуноконъюгатов, который(ые) растворен(ы) или диспергирован(ы) в фармацевтически приемлемом носителе. Понятия «фармацевтически или фармакологически приемлемый» относится к молекулярным субстанциям и композициям, которые, в целом нетоксичны для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях, т.е. не вызывают вредные, аллергические или другие нежелательные реакции при введении при необходимости животному, такому, например, как человек. Приготовление фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере один иммуноконъюгат и необязательно дополнительное действующее вещество, должно быть очевидно специалистам в данной области в свете настоящего описания, например, из справочника Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-ое изд., изд-во Mack Printing Company, 1990, включенного в настоящее описание в качестве ссылки. Кроме того, очевидно, что препараты, предназначенные для введения животному (например, человеку), должны удовлетворять требованиям стандартов стерильности,

пирогенности и общей безопасности и чистоты, разработанных отделением биологических стандартов (Управление контроля пищевых продуктов и лекарственных средств) FDA или соответствующим уполномоченным органом других стран. Предпочтительными композициями являются лиофилизированные 5 препаративные формы или водные растворы. В контексте настоящего описания «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, буферы, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты), агенты для придания изотоничности, замедляющие 10 абсорбцию агенты, соли, белки, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственных средств, полимеры, гели, связующие вещества, эксципиенты, разрыхлители, замасливатели, подслащивающие вещества, корригенты, красители и подобные материалы и их комбинации, которые должны быть известны обычному специалисту в данной области (см., например, Remington's 15 Pharmaceutical Sciences, 18-ое изд., изд-во Mack Printing Company, 1990, сс. 1289-1329, включенный в настоящее описание в качестве ссылки). В терапевтических или фармацевтических композициях можно применять любой общепринятый носитель, если только он совместим с действующим веществом.

Композиция может содержать различные типы носителей в зависимости от 20 того, вводят ли ее в твердой, жидкой или аэрозольной форме, и от того, должна ли она быть стерильной, как в случае использования таких путей введений, как инъекция. Иммуноконъюгаты, предлагаемые в настоящем изобретении (и дополнительное терапевтическое средство), можно вводить внутривенно, внутривожно, внутриартериально, внутрибрюшинно, внутрь повреждения, 25 внутрь черепа, внутрь сустава, внутрь предстательной железы, внутрь селезенки, внутриренально, внутривезикулярно, внутритрахеально, внутриназально, внутрь стекловидного тела, внутривагинально, внутривидеально, внутримышечно, внутрибрюшинно, подкожно, подконъюнктивально, интравезикулярно, в слизистую оболочку, интраперикардially, внутрь 30 пуповины, интраокулярно, орально, топикально, место, путем ингаляции (например, аэрозольной ингаляции), инъекции, инфузии, непрерывной инфузии, локализованной перфузии, омывающей непосредственно клетки-мишени, через катетер, посредством лаважа, в виде кремов, в липидных композициях

(например, липосомах), или с помощью любого другого метода или любой комбинации вышеуказанных путей, известных обычному специалисту в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-ое изд., изд-во Mack Printing Company, 1990, включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Для введения молекул полипептидов, таких как иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, наиболее часто применяют парентеральное введение, в частности, внутривенную инъекцию.

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

жидкой среды. При необходимости жидкая среда перед осуществлением инъекции должна быть соответствующим образом забуферена и жидкому разбавителю сначала придана изотоничность с помощью достаточного количества соляного раствора или глюкозы. Композиция должны быть

5 стабильной с условиях приготовления и хранения и защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Принято поддерживать загрязнение эндотоксинами на минимальном безопасном уровне, например, менее 0,5 нг/мг белка. Пригодные фармацевтически приемлемые носители

10 включают (но, не ограничиваясь только ими): буферы, такие как фосфатный, цитратный и буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как

октадецилдиметилбензиламмонийхлорид; гексаметонийхлорид; бензалконийхлорид; бензетонийхлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол,

15 резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и *мета*-крезол); низкомолекулярные (содержащие менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и

20 другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Водные суспензии для

25 инъекций могут содержать соединения, которые повышают вязкость суспензии, такие как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, сорбит, декстран или т.п. Необязательно суспензия может содержать также стабилизаторы или агенты, которые повышают растворимость соединений, что позволяет получать высококонцентрированные растворы. Кроме того, суспензии действующих

30 веществ можно получать в виде соответствующих масляных предназначенных для инъекции суспензий. Приемлемые липофильные растворители или наполнители включают жирные нелетучие масла, такие как кунжутное масло,

или синтетические эфиры жирных кислот, такие как этилолеаты или триглицериды, или липосомы.

5 Действующие вещества можно заключать в микрокапсулы, например, полученные с помощью методов коацервации или межфазной полимеризации, например в гидроксипропилметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно, в коллоидные системы введения лекарственного средства (например, в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 10 под ред. А. Osol, 1980. Можно приготавливать препараты с замедленным высвобождением. Приемлемыми примерами препаратов с замедленным высвобождением являются полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, включающие полипептид, такие матрицы представляют собой изделия определенной формы, например, пленки или микрокапсулы. В 15 конкретном варианте осуществления изобретения для достижения пролонгированной абсорбции инъеклируемой композиции можно применять в композиции агенты, замедляющие абсорбцию, такие, например, как моностеарат алюминия, желатин или их комбинации.

20 Помимо описанных выше композиций, иммуноконъюгаты можно приготавливать также в виде препарата в форме депо. Указанные препаративные формы длительного действия можно применять путем имплантации (например, подкожной или внутримышечной) или внутримышечной инъекции. Так, например, иммуноконъюгаты можно включать в препаративные формы в сочетании с приемлемыми полимерными или гидрофобными материалами 25 (например, в виде эмульсии в приемлемом масле) или ионообменными смолами, или в виде умеренно растворимых производных, например, умеренно растворимой соли.

30 Фармацевтические композиции, содержащие иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно приготавливать с помощью общепринятых процессов смешения, растворения, эмульгирования, капсулирования, захвата или лиофилизации. Фармацевтические композиции можно включать в препаративные формы с помощью общепринятого метода с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, разбавителей,

эксципиентов или вспомогательных веществ, которые облегчают обработку белков, с получением препаратов, которые можно применять в фармацевтических целях. Соответствующая форма зависит от выбранного пути введения.

5 Иммуноконъюгаты можно включать в композиции в виде свободной кислоты или свободного основания, в нейтральной форме или в форме соли. Фармацевтически приемлемые соли представляют собой соли, которые практически сохраняют биологическую активность свободной кислоты или  
10 свободного основания. Они включают кислотнo-аддитивные соли, например, соли, образованные со свободными аминогруппами белковой композиции, или образованные с неорганическими кислотами, такими, например, как соляная или фосфорная кислота, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная или миндальная кислота. Соли, образованные со свободной карбоксильной группой, можно получать также из неорганических оснований,  
15 таких, например, как гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа; или таких органических оснований как изопропиламин, триметиламин, гистидин или прокаин. Фармацевтические соли имеют тенденцию к более высокой растворимости в водных и других протонных растворителях по сравнению с соответствующими формами в виде свободных оснований.

#### 20 Способы и композиции для терапевтического применения

Любые иммуноконъюгаты, представленные в настоящем описании, можно применять в терапевтических методах. Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно использовать в качестве иммунотерапевтических агентов, например, при лечении различных видов рака.

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



Одним из объектов изобретения являются иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения в качестве лекарственного средства. Следующими объектами изобретения являются иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения для лечения 5 заболевания. Некоторыми вариантами осуществления изобретения являются иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения в способе лечения. Одним из вариантов осуществления изобретения является иммуноконъюгат, представленный в настоящем описании, предназначенный для применения при лечении заболевания у индивидуума, 10 который нуждается в этом. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является иммуноконъюгат, предназначенный для применения в способе лечения индивидуума, который имеет заболевание, заключающемся в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве иммуноконъюгат. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее 15 лечению, представляет собой пролиферативное нарушение. В конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В других вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой воспалительное нарушение. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ заключается также в том, что 20 вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, противораковое средство, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. «Индивидуум» в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека.

25 Следующим объектом изобретения является применение иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, для производства или приготовления лекарственного средства, которое предназначено для лечения заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом. В одном из вариантов осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе 30 лечения заболевания, заключающемся в том, что вводят индивидууму, который имеет заболевание, в терапевтически эффективном количестве лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение. В

конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В других вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой воспалительное нарушение. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения способ заключается также в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, противораковое средство, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. «Индивидуум» в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека.

Следующим объектом изобретения является способ лечения заболевания у индивидуума, заключающийся в том, что вводят указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении. В одном из вариантов осуществления изобретения указанному индивидууму вводят композицию, которая содержит иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, в фармацевтически приемлемой форме. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение. В предпочтительном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В других вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой воспалительное нарушение. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ заключается также в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, противораковое средство, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. «Индивидуум» в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения может представлять собой млекопитающее, предпочтительно человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение, предпочтительно рак. Примерами рака являются (но, не ограничиваясь только ими) рак мочевого пузыря, рак головного мозга, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак

матки, рак шейки матки, рак эндометрия, рак пищевода, рак ободочной кишки, колоректальный рак, ректальный рак, рак желудка, рак предстательной железы, рак крови, рак кожи, плоскоклеточная карцинома, рак кости и рак почки. Другие нарушения клеточной пролиферации, которые можно лечить с использованием иммуноконъюгата, предлагаемого в настоящем изобретении, включают (но, не ограничиваясь только ими) неоплазмы, локализованные в: животе, кости, молочной железе, пищеварительной системе, печени, поджелудочной железе, брюшине, эндокринных железах (надпочечник, паращитовидная, гипофиз, яички, яичник, тимус, щитовидная), глазу, голове и шеи, нервной системе (центральной и периферической), лимфатической системе, тазовой области, коже, мягкой ткани, селезенке, грудном отделе и мочеполовой системе. Также под объем изобретения подпадают предраковые состояния или повреждения и метастазы рака. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак выбирают из группы, включающей почечноклеточный рак, рак кожи, рак легкого, колоректальный рак, рак молочной железы, рак головного мозга, рак головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в частности, когда эффекторный фрагмент иммуноконъюгата представляет собой IL-10, подлежащее лечению заболевание представляет собой воспалительное нарушение. Примерами воспалительных нарушений являются (но, не ограничиваясь только ими) ревматоидный артрит, псориаз или болезнь Крона.

Специалисту в данной области должно быть очевидно, что во многих случаях иммуноконъюгаты не могут обеспечивать исцеление, а могут только оказывать частичное благоприятное воздействие. В некоторых вариантах осуществления изобретения физиологические изменения, обладающие некоторым благоприятным действием, рассматриваются также как терапевтически ценные. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения количество иммуноконъюгата, которое обеспечивает физиологическое изменение, рассматривается как «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество». Субъект, пациент или индивидуум, нуждающийся в лечении, представляет собой, как правило, млекопитающее, более конкретно человека.

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно применять также в качестве диагностических реагентов. Связывание иммуноконъюгата с

антигенной детерминантой можно легко выявлять, используя вторичное антитело, специфическое в отношении эффекторного фрагмента. В одном из вариантов осуществления изобретения вторичное антитело и иммуноконъюгат облегчают выявление связывания иммуноконъюгата с антигенной детерминантой, локализованной на поверхности клетки или ткани.

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

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

Иммуноконъюгат можно вводить пациенту в виде одной обработки или серий обработок. В зависимости от типа и серьезности заболевания возможная начальная доза иммуноконъюгата для введения пациенту, например, с использованием одного или нескольких индивидуальных введений или с помощью непрерывной инфузии, может составлять примерно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1–10 мг/кг). Типичная суточная доза может составлять от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от отмеченных выше факторов. Для повторных введений в течение нескольких дней или более

продолжительного периода в зависимости от состояния лечение, как правило, должно продолжаться до достижения требуемого подавления имеющихся симптомов заболевания. В качестве примера, доза иммуноконъюгата может составлять от примерно 0,005 до примерно 10 мг/кг. В другом примере (но, не ограничиваясь только указанным) доза на одно введение может составлять от примерно 1, примерно 5, примерно 10, примерно 50, примерно 100, примерно 200, примерно 350, примерно 500 мкг/кг веса тела, примерно 1, примерно 5, примерно 10, примерно 50, примерно 100, примерно 200, примерно 350, примерно 500 до примерно 1000 мг/кг/веса тела или более, и находиться в любом указанном диапазоне. В качестве примеров (но, не ограничиваясь только ими) указанного диапазона значений, можно вводить от примерно 5 до примерно 100 мг/кг веса тела, от примерно 5 мкг/кг веса тела до примерно 500 мг/кг веса тела и т.д. с учетом указанных выше уровней доз. Так, пациенту можно вводить одну или несколько доз, составляющих примерно 0,5, 2,0, 5,0 или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Указанные дозы можно вводить прерывисто, например, каждую неделю или каждые три недели (например, таким образом, чтобы пациент получал от примерно двух до примерно двадцати или, например, примерно шесть доз иммуноконъюгата). Можно вводить начальную более высокую ударную дозу, после которой применять одну или несколько более низких доз. Однако можно использовать другие схемы введения доз. Успех такой терапии легко оценивать с помощью общепринятых методик и анализов.

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

Для системного введения терапевтически эффективную дозу можно сначала определять с помощью анализов *in vitro*, например, анализов с использованием клеточных культур. Затем дозу можно включать в форму для изучения на животных моделях для достижения концентрации в кровотоке, находящейся в

диапазоне, включающем значение  $IC_{50}$ , определенное на клеточной культуре. Указанную информацию можно использовать для более точного определения доз, которые можно применять на людях.

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

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

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

Применение в терапевтически эффективной дозе иммуноконъюгатов, представленных в настоящем описании, должно, как правило, обеспечивать терапевтическую пользу, не вызывая существенной токсичности. Токсичность и терапевтическую эффективность иммуноконъюгата можно определять с  
25 помощью стандартных фармацевтических процедур на культурах клеток или экспериментальных животных. Анализы на клеточных культурах или опыты на животных можно применять для определения значений  $LD_{50}$  (доза, смертельная для 50% популяции) и  $ED_{50}$  (доза, терапевтически эффективная для 50% популяции). Соотношение доз, характеризующих токсические и терапевтические действия, обозначают как терапевтический индекс, который можно выразить в  
30 виде соотношения  $LD_{50}/ED_{50}$ . Иммуноконъюгаты, имеющие высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в настоящем

изобретении, характеризуется высоким терапевтическим индексом. Данные, полученные в анализах с использованием клеточных культур и в опытах на животных, можно применять для определения диапазона доз, которые можно применять на людях. Доза лежит предпочтительно в диапазоне концентраций в кровотоке, которые включают ED<sub>50</sub>, обладающих невысокой токсичностью или не обладающих токсичностью. Доза может варьироваться в зависимости от различных факторов, например, от применяемой лекарственной формы, применяемого пути введения, состояния индивидуума и т.п. Точную препаративную форму, путь введения и дозу может выбирать индивидуально врач в зависимости от состояния пациента (см., например, Fingl и др., в: The Pharmacological Basis of Therapeutics, гл. 1, 1975, с. 1, публикация полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

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

#### Другие средства и варианты лечения

Имуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, при лечении можно вводить в сочетании с одним или несколькими другими средствами. Например, иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством. Понятие «терапевтическое средство» включает любое средство, которое вводят для лечения симптома или заболевания у индивидуума, который нуждается в таком лечении. Указанное дополнительное терапевтическое средство может представлять собой любое действующее вещество, которое можно применять

при конкретном показании, подлежащем лечению, предпочтительно с дополнительными видами активности, которые не оказывают отрицательное действие друг на друга. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой

5 иммуномодулятор, цитостатическое средство, ингибитор клеточной адгезии, цитотоксическое средство, активатор клеточного апоптоза или средство, повышающее чувствительность клеток к индукторам апоптоза. В конкретном варианте осуществления изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой противораковое средство, например, агент, разрушающий

10 микротрубочки, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы, интеркалятор ДНК, алкилирующий агент, средство гормональной терапии, ингибитор киназ, антагонист рецептора, активатор апоптоза опухолевых клеток или антиангиогенное средство.

Указанные другие средства могут присутствовать в комбинации в

15 количествах, эффективных для указанных целей. Эффективное количество указанных других средств зависит от количества применяемого иммуноконъюгата, типа нарушения или лечения, и других указанных выше факторов. Иммуноконъюгаты, как правило, применяют в таких же дозах и с использованием указанных в настоящем описании путей введения, или в дозах,

20 составляющих примерно от 1 до 99% от указанных в настоящем описании доз, или в любой дозе и с использованием любого пути введения, которые согласно эмпирическим/клиническим данным рассматриваются как приемлемые.

Отмеченные выше комбинированные терапии предусматривают совместное введение (когда два или большее количество терапевтических средств включают

25 в одну и ту же или в отдельные композиции) и отдельное введение, в этом случае введение иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, можно осуществлять до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адъюванта. Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно применять также в сочетании с лучевой терапией.

### 30 Изделия

Другим объектом изобретения является изделие, которое содержит продукты, применяемые для лечения, предупреждения и/или диагностирования указанных выше нарушений. Изделие представляет собой контейнер и этикетку



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

#### Примеры

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

## Пример 1

### Общие методы

#### Методы рекомбинантной ДНК

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у  
5 Sambrook J. и др., Molecular cloning: A laboratory manual; изд-во Cold Spring  
Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для  
молекулярной биологии применяли согласно инструкциям производителей.  
Общую информацию, касающуюся нуклеотидных последовательностей легких и  
тяжелых цепей человеческих иммуноглобулинов, см. у: Kabat E.A. и др.,  
10 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во NIH, публикация  
N 91-3242, 1991.

#### Секвенирование ДНК

Последовательности ДНК определяли с помощью секвенирования двух  
цепей.

#### Синтез генов

Требуемые сегменты генов либо создавали с помощью ПЦР с  
использованием соответствующих матриц, либо синтезировали на фирме Geneart  
AG (Регенсбург, Германия) из синтетических олигонуклеотидов и ПЦР-  
продуктов посредством автоматического синтеза генов. В случаях, когда точная  
20 генная последовательность не была доступна, создавали олигонуклеотидные  
праймеры на основе последовательностей ближайших гомологов и гены  
выделяли с помощью ОТ-ПЦР из РНК, полученной из соответствующей ткани.  
Сегменты генов, фланкированные единичными сайтами, распознаваемыми  
рестриктазами, клонировали в стандартных клонирующих/секвенирующих  
25 векторах. Плазмидную ДНК очищали из трансформированных бактерий и  
определяли концентрацию с помощью УФ-спектроскопии. Последовательность  
ДНК субклонированных фрагментов генов подтверждали ДНК-секвенированием.  
Создавали сегменты генов с требуемыми сайтами рестрикции, позволяющими  
субклонировать их в соответствующих экспрессионных векторах. Все  
30 конструкции создавали с 5'-концевой последовательностью ДНК, кодирующей  
лидерный пептид, который направляет секрецию белков в эукариотических  
клетках. В SEQ ID NO: 8-16 представлены примеры лидерных пептидов и  
кодирующих их полинуклеотидных последовательностей.

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

Для изучения аффинности связывания рецептора IL-2 создавали инструмент, который позволяет экспрессировать гетеродимерный рецептор IL-2;  $\beta$ -субъединицу рецептора IL-2 сливали с молекулой Fc, которую создавали таким образом, что она обладала способностью к гетеродимеризации (Fc(«впадина»)) (см. SEQ ID NO: 17 и 18), используя технологию «knobs-into-holes» (Merchant и др., Nat Biotech. 16, 1998, сс. 677-68). Затем  $\gamma$ -субъединицу рецептора IL-2 сливали с вариантом Fc(«выступ») (см. SEQ ID NO: 19 и 20), гетеродимеризованным с Fc(«впадина»). Затем указанный гетеродимерный содержащий Fc-слияние белок применяли в качестве субстрата для анализа взаимодействия IL-2/IL-2-рецептор.  $\alpha$ -Субъединицу IL-2R экспрессировали в виде мономерной цепи, несущей сайт расщепления AcTev и Avi His-метку (SEQ ID NO: 21 и 22). Соответствующие субъединицы IL-2R кратковременно экспрессировали в клетках НЕК EBNA 293 с сывороткой в случае конструкции  $\beta\gamma$ -субъединицы IL-2R и без сыворотки в случае конструкции  $\alpha$ -субъединицы. Конструкцию  $\beta\gamma$ -субъединицы IL-2R очищали на белке А (фирма GE Healthcare) с последующей гель-фильтрацией (фирма GE Healthcare, Супердекс 200).  $\alpha$ -Субъединицу IL-2R очищали с использованием His-метки на колонке NiNTA (фирма Qiagen) с последующей гель-фильтрацией (фирма GE Healthcare, Супердекс 75). Аминокислотные и соответствующие нуклеотидные последовательности различных конструкций рецепторов представлены в SEQ ID NO: 17-22 и 255-268.

Получение иммуноконъюгатов

Более подробное описание создания и процесса созревания аффинности антигенсвязывающих фрагментов, мишенью которых является FAP, представлено в разделе «Примеры», прилагаемом к публикации PCT WO 2012/020006, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Как описано в указанной публикации, различные антигенсвязывающие домены, мишенью которых является FAP, создавали с помощью метода фагового дисплея, включая клоны, обозначенные как 4G8, 28H1 и 4B9, которые применяли в описанных ниже примерах. Клон 28H1 представлял собой антитело с созревшей аффинностью, основой которого является родительский клон 4G8, а

клон 4В9 представлял собой антитело с созревшей аффинностью, основой которого являлся родительский клон 3F2. Мишенью антигенсвязывающего домена, обозначенного в контексте настоящего описания 2В10, является А2-домен тенасцина С (TNC А2). Подробное описание этого и других антигенсвязывающих фрагментов, мишенью которых является TNC А2, представлено в публикации РСТ WO 2012/020038, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Антигенсвязывающий домен, обозначенный как L19, мишенью которого является экстра-домен В (EDB) фибронектина, получали из антитела L19, которое описано в публикации РСТ WO 2007/128563. Мишенью антигенсвязывающих доменов, обозначенных в контексте настоящего описания как СН1А1А и СН1А1А 98/99 2F1, является СЕА, и они описаны более подробно в опубликованной заявке на патент РСТ РСТ/ЕР2012/053390, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Четырехмутантный IL-2 (qm), применяемый в качестве эффекторного фрагмента в некоторых из приведенных ниже примеров, описан более подробно в опубликованной заявке на патент РСТ РСТ/ЕР2012/051991, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. В целом, для IL-2 qm характерны следующие мутации:

1. Т3А – обеспечивает «выключение» предсказанного сайта O-гликозилирования,
2. F42A - обеспечивает «выключение» взаимодействия IL-2/IL-2R  $\alpha$ ,
3. Y45A - обеспечивает «выключение» взаимодействия IL-2/IL-2R  $\alpha$ ,
4. L72G - обеспечивает «выключение» взаимодействия IL-2/IL-2R  $\alpha$ ,
5. С125А – мутация, препятствующая связыванию посредством дисульфидного мостика димеров IL-2.

Т3А-мутация выбрана для элиминации сайта O-гликозилирования и получения белкового продукта с более высокой гомогенностью и чистотой, когда содержащий ее полипептид или иммуноконъюгат IL-2 qm экспрессируется в эукариотических клетках, таких как CHO или HEK293-клетки. Три мутации F42A, Y45A и L72G выбраны для воздействия на связывание с CD25, т.е.  $\alpha$ -субъединицей IL-2-рецептора. Снижение или элиминация связывания с CD25 приводит к пониженной индуцированной активацией клеточной гибели (AICD),

отсутствию предпочтительной активации регуляторных Т-клеток, а также к пониженной токсичности (как описано в EP 11153964.9).

Создавали последовательности ДНК путем генного синтеза и/или с помощью классических методов молекулярной биологии и субклонировали в экспрессионных векторах млекопитающих под контролем промотора MPSV и против хода транскрипции относительно синтетического полиА-сайта, каждый вектор нес последовательность EBV OriP. Иммуноконъюгаты, которые применяли в описанных ниже примерах, получали путем котрансфекции находящихся на экспоненциальной фазе роста клеток HEK293-EBNA экспрессионными векторами млекопитающих, применяя трансфекцию, опосредуемую фосфатом кальция. Альтернативно этому, клетки HEK293, выращиваемые в суспензии, трансфектировали полиэтиленимином (ПЭИ) в сочетании с соответствующими экспрессионными векторами. Альтернативно этому, пулы стабильно трансфектированных CHO-клеток или клоны CHO-клеток применяли для получения в бессывороточных средах. Затем слитые белки IgG-цитокин очищали из супернатанта. В целом, слитые белки IgG-цитокин очищали с использованием одной стадии очистки на основе аффинности с использованием белка А (колонка HiTrap ProtA, фирма GE Healthcare), применяя для уравнивания 20мМ фосфат натрия, 20мМ цитрат натрия, рН 7,5. После внесения супернатанта колонку сначала промывали 20мМ фосфатом натрия, 20мМ цитратом натрия, рН 7,5, а затем промывали 13,3мМ фосфатом натрия, 20мМ цитратом натрия, 500мМ хлоридом натрия, рН 5,45. Слитый белок IgG-цитокин элюировали 20мМ цитратом натрия, 100мМ хлоридом натрия, 100мМ глицином, рН 3. Фракции нейтрализовали, объединяли и очищали с помощью гель-фильтрации (колонка HiLoad 16/60 Супердекс 200, фирма GE Healthcare) в буфере для конечного продукта: 25мМ фосфат калия, 125мМ хлорид натрия, 100мМ глицин, рН 6,7. Ниже представлено подробное описание приведенных в качестве примеров процессов очистки и результаты, полученные для отобранных конструкций. Концентрацию белка в очищенных белковых образцах определяли, измеряя оптическую плотность (ОП) при 280 нм, используя молярный коэффициент экстинкции, рассчитанный на основе аминокислотной последовательности. Чистоту и молекулярную массу иммуноконъюгатов анализировали с помощью ДСН-ПААГ в присутствии восстановителя (5мМ 1,4-

дितिотреитол) или без него и окрашивали кумасси бриллиантовым голубым (SimpleBlue™ SafeStain, фирма Invitrogen). Гелевую систему NuPAGE® Pre-Cast (фирма Invitrogen) применяли согласно инструкциям производителя (4-20% Трис-глициновые гели или 3-12% Бис-Трис). Содержание агрегатов в образцах иммуноконъюгатов анализировали, используя колонку для аналитической гель-5  
фильтрации Супердекс 200 10/300GL (фирма GE Healthcare), в подвижном буфере, содержащем 2мМ MOPS, 150мМ NaCl, 0,02% NaN<sub>3</sub>, pH 7,3 при 25°C. Целостность аминокислотного каркаса восстановленных легких и тяжелых цепей антител можно подтверждать с помощью масс-спектрометрии с использованием наноэлектроспрея (NanoElectrospray Q-TOF) после удаления N-гликанов путем 10  
обработки ферментом гликозидазой F пептида-N (фирма Roche Molecular Biochemicals). Олигосахариды, присоединенные к Fc-домену иммуноконъюгатов, анализировали с помощью описанного ниже метода MALDI TOF-МС. Олигосахариды высвобождали из иммуноконъюгатов путем обработки 15  
ферментом с помощью расщепления PNGазойF. Полученный после расщепления раствор, содержащий высвободившиеся олигосахариды, либо непосредственно подготавливали для анализа с помощью MALDI TOF-МС, либо дополнительно расщепляли гликозидазой EndoH перед подготовкой образца для анализа с помощью MALDI TOF-МС.

## 20 Пример 2

Слитые белки IgG-IL-2 qm, мишенью которых является FAP, создавали на основе антител к FAP 4G8, 28H1 и 4B9, при этом только один четырехмутантный (qm) IL-2 сливали с С-концом одной из гетеродимерных тяжелых цепей, как 25  
показано на фиг. 2А. Для достижения направленного переноса к строме опухоли, в которой происходит избирательная экспрессия FAP, применяли Fab-область двухвалентного антитела (явление авидности). Для достижения гетеродимеризации, приводящей к образованию индивидуального четырехмутантного IL-2, применяли технологию «knob-into-hole». Для того, чтобы минимизировать создание гомодимерных слияний IgG-цитокин, цитокин 30  
сливали с С-концом (с делецией С-концевого остатка Lys) содержащей «выступ» тяжелой цепи IgG через (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>- или G<sub>4</sub>-(SG<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-линкер. Слитый белок антитело-цитокин обладал IgG-подобными свойствами. Для снижения связывания с FcγR/эффекторной функции и предупреждения коактивации FcR в Fc-домен

интродуцировали мутации P329G L234A L235A (LALA). Последовательности этих иммуноконъюгатов представлены в SEQ ID NO: 193, 269 и 205 (28H1 с линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>), SEQ ID NO: 193, 195 и 205 (28H1 с линкером G<sub>4</sub>-(SG<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), SEQ ID NO: 201, 203 и 205 (4G8 с линкером G<sub>4</sub>-(SG<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), SEQ ID NO: 207, 209 и 211 (4B9 с линкером G<sub>4</sub>-(SG<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), SEQ ID NO: 207, 271 и 211 (4B9 с линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>).

Кроме того, создавали слитый белок, мишенью которого является СЕА, такой как IgG-IL-2 qm, на основе антитела к СЕА CH1A1A 98/99 2F1, контрольный на основе DP47GS «ненаправленный» слитый белок IgG-IL-2 qm, в котором IgG не связывается со специфической мишенью, а также специфический слитый белок на основе 2B10, такой как IgG-IL-2 qm, мишенью которого является А2-домен теназина-С. Последовательности этих иммуноконъюгатов представлены в SEQ ID NO: 275, 281 и 283 (CH1A1A 98/99 2F1 с линкером G<sub>4</sub>-(SG<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), SEQ ID NO: 277, 281 и 283 (CH1A1A 98/99 2F1 с линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>), SEQ ID NO: 219, 221 и 225 (DP47GS с линкером G<sub>4</sub>-(SG<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), SEQ ID NO: 219, 289 и 225 (DP47GS с линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>), SEQ ID NO: 285, 287 и 239 (2B10 с линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>). Конструкции создавали путем кратковременной экспрессии в клетках линии HEK293 EBNA и очищали в целом согласно методу, описанному выше. На фиг. 3-9 приведены примеры хроматограмм и профилей элюции, полученные при очистке (А, Б), а также результаты аналитического ДСН-ПААГ и гель-фильтрации конечных очищенных конструкций (В, Г). Выходы кратковременной экспрессии составляли 42 мг/л для содержащих IgG-IL-2 qm иммуноконъюгатов на основе 4G8, 20 мг/л на основе 28H1, 10 мг/л на основе 4B9, 5,3 мг/л на основе CH1A1A 98/99 2F1, 36,7 мг/л на основе 2B10 и 13,8 мг/л на основе DP47GS.

Кроме того, создавали иммуноконъюгат на основе 28H1 IgG-IL-15, мишенью которого является FAP, последовательности которого представлены в SEQ ID NO: 193, 199 и 205. В последовательности полипептида IL-15 остаток глутаминовой кислоты в положении 53 заменяли на аланин для снижения способности связываться в α-субъединицей IL-15-рецептора, а остаток аспарагина в положении 79 заменяли на аланин для элиминации гликозилирования. Слитый белок IgG-IL-15 получали путем кратковременной экспрессии и очищали согласно описанному выше методу.

### Аффинность связывания FAP

Способность связывать FAP иммуноконъюгатов IgG-IL-2 qm на основе антител к FAP 4G8 и 28H1 определяли на основе резонанса поверхностного плазмона (SPR) с использованием устройства Biacore в сравнении с соответствующими немодифицированными антителами типа IgG. В целом, метод состоял в следующем: антитело к His (Penta-His, фирма Qiagen 34660) иммобилизовали на CM5-чипах для захвата 10нМ человеческого меченного с помощью His FAP (20 с). Температура составляла 25°C и применяли HBS-EP в качестве буфера. Концентрация анализируемого вещества составляла от 50 до 0,05нМ, скорость потока составляла 50 мкл/мин (ассоциация: 300 с, диссоциация: 900 с, регенерация: 60 с, 10мМ глицин pH 2). Аппроксимацию осуществляли на основе модели связывания 1: 1, RI = 0, Rmax = локальное значение (поскольку применяли формат захвата). Ниже в таблице представлены установленные кажущиеся значения аффинности двухвалентных компонентов (авидность, пМ) по данным SPR при аппроксимации на основе модели связывания 1:1, RI = 0, Rmax = локальное.

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

Данные демонстрируют, что в пределах ошибки метода аффинность к человеческому FAP сохранялась для иммуноконъюгата на основе 28H1 или только в незначительной степени снижалась для иммуноконъюгата на основе 4G8 по сравнению с соответствующими немодифицированными антителами.

Аналогично с помощью SPR при 25°C определяли аффинность ( $K_D$ ) конструкций 4B9 IgG-IL-2 qm (16пМ), CH1A1A 98/99 2F1 IgG-IL-2 qm (400пМ), CH1A1A 98/99 2F1 IgG-IL-2 wt (см. пример 4; 470пМ) и 2B10 IgG-IL-2 qm (150пМ ср. 300пМ для неконъюгированного 2B10 IgG) к человеческим FAP, SEA и TNC A2 соответственно. Подтверждали также перекрестную реактивность антител 4B9 и 2B10 к FAP или TNC A2 человека, мышей и обезьян циномоглус соответственно.

Далее определяли аффинность иммуноконъюгатов на основе 4G8 и 28H1 IgG-IL-2 qm к гетеродимеру  $\beta\gamma$  IL-2R и к  $\alpha$ -субъединице IL-2R с помощью



резонанса поверхностного плазмона (SPR) при непосредственном сравнении с  $\alpha$ -форматом иммуноконъюгата Fab-IL-2 qm-Fab, который описан в опубликованной заявке на патент РСТ № РСТ/EP2012/051991. В целом, метод состоял в следующем: лиганды – либо  $\alpha$ -субъединицу человеческого IL-2R, либо гетеродимер  $\beta\gamma$  человеческого IL-2R – иммобилизовали на CM5-чипе. Затем на чип вносили в качестве анализируемых веществ иммуноконъюгаты на основе 4G8 и 28H1 IgG-IL-2 qm или для сравнения иммуноконъюгаты на основе 4G8 и 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab при 25°C в буфере HBS-EP, используя их в диапазоне концентраций от 300нМ до 1,2нМ (разведение 1:3). Скорость потока составляла 30 мкл/мин и использовали следующие условия: ассоциация: 180 с, диссоциации: 300 с и регенерация:  $2 \times 30$  с с помощью 3М MgCl<sub>2</sub> для гетеродимера  $\beta\gamma$  IL-2R, 10 с с помощью 50мМ NaOH для  $\alpha$ -субъединицы IL-2R. Для аппроксимации использовали модель связывания 1:1 (связывание 1:1 RI  $\neq$  0, R<sub>max</sub> = локальное для IL-2R  $\beta\gamma$ , кажущееся значение K<sub>D</sub>, связывание 1:1 RI = 0, R<sub>max</sub> = локальное для IL-2R  $\alpha$ ). Соответствующие значения K<sub>D</sub> представлены ниже в таблице.

Кажущееся значение K <sub>D</sub> [нМ]	Hu IL-2R $\beta\gamma$	Hu IL-2R $\alpha$
4G8 IgG-IL-2 qm	5,9	нет связывания
4G8 Fab-IL-2 qm-Fab	10,4	нет связывания
28H1 IgG-IL-2 qm	6,2	нет связывания
28H1 Fab-IL-2 qm-Fab	11,4	нет связывания

Данные демонстрируют, что иммуноконъюгаты на основе 4G8 и 28H1 IgG-IL-2 qm связываются по меньшей мере с такой же высокой аффинностью, что и иммуноконъюгаты Fab-IL-2 qm-Fab с гетеродимером  $\beta\gamma$  IL-2R, но они не связываются с  $\alpha$ -субъединицей IL-2R из-за интродукции мутаций, воздействующих на связывание с CD25. По сравнению с соответствующими иммуноконъюгатами Fab-IL-2 qm-Fab аффинность слитых белков IgG-IL-2 qm оказалась несколько повышенной, в пределах ошибки метода.

Аналогично с помощью SPR при 25°C определяли аффинность других конструкций (4B9, DP47GS, 2B10, CH1A1A 98/99 2F1), которые содержат либо IL-2 wt (см. пример 4), либо IL-2 qm, к гетеродимеру  $\beta\gamma$  IL-2R и к  $\alpha$ -субъединице IL-2R. Для всех конструкций кажущееся значение K<sub>D</sub> в отношении гетеродимера  $\beta\gamma$  человеческого IL-2R составляло от 6 до 12нМ (вне зависимости от того, содержала конструкция IL-2 wt или IL-2 qm), при этом только конструкции,

содержащие IL-2 wt, связывались с  $\alpha$ -субъединицей IL-2R ( $K_D$  для человеческой IL-2R  $\alpha$  составляло около 20нМ).

Анализы биологической активности иммуноконъюгатов IgG-цитокин

5 Биологическую активность слитых конструкций на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, мишенью которых является FAP, изучали с использованием нескольких клеточных анализов в сравнении с поступающим в продажу IL-2 (пролейкин, фирма Novartis/Chiron) и/или иммуноконъюгатами Fab-IL-2-Fab, которые описаны в EP 11153964.9.

Связывание с экспрессирующими FAP клетками

10 Связывание иммуноконъюгата на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, с экспрессирующими человеческий FAP стабильно трансфектированными клетками НЕК293 измеряли с помощью FACS. В целом, метод состоял в следующем: 250000 клеток на лунку инкубировали с взятыми в указанных концентрациях иммуноконъюгатами в круглодонном 96-луночном  
15 планшете в течение 30 мин при 4°C и однократно отмывали 3ФР/0,1% БСА. Связанные иммуноконъюгаты определяли после инкубации в течение 30 мин при 4°C с конъюгированным с ФИТЦ F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом козьего антитела, специфического в отношении F(ab')<sub>2</sub>, AffiniPure (фирма Jackson Immuno Research Lab, № 109-096-097, рабочий раствор: разведение 1:20 в 3ФР/0,1% БСА,  
20 свежеприготовленный), используя устройство FACS CantoII (программное обеспечение FACS Diva). Результаты представлены на фиг. 10. Данные демонстрируют, что связывание иммуноконъюгата IgG-IL-2 qm с экспрессирующими FAP клетками характеризуется значением EC<sub>50</sub>, составляющим 0,9нМ, что сопоставимо со значением (0,7нМ) соответствующей  
25 конструкции на основе 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab.

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

Далее изучали способность иммуноконъюгата на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, индуцировать высвобождение IFN- $\gamma$  НК92-клетками путем активации передачи сигналов IL-2R  $\beta\gamma$ . В целом, метод состоял  
30 в следующем: НК92-клетки с дефицитом IL-2 (100000 клетки/лунку в 96-луночном планшете с U-образным дном) инкубировали с иммуноконъюгатами IL-2 в различных концентрациях, которые содержали четырехмутантный IL-2, в течение 24 ч в НК-среде (среда MEM-альфа фирмы Invitrogen (№ 22561-021),

дополненная 10% FCS, 10% лошадиной сыворотки, 0,1мМ 2-меркаптоэтанолом, 0,2мМ инозитом и 0,02мМ фолиевой кислотой). Супернатанты собирали и высвобождение IFN- $\gamma$  анализировали с использованием набора II для ELISA, содержащего антитело к человеческому IFN- $\gamma$ , фирма Becton Dickinson (№ 550612). Пролейкин (фирма Novartis) служил в качестве положительного контроля при оценке опосредуемой IL-2 активации клеток. На фиг. 11 продемонстрировано, что иммуноконъюгат на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, обладал такой же эффективностью в отношении индукции высвобождения IFN- $\gamma$ , что иммуноконъюгат на основе клона с созревшей аффинностью 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab.

#### Анализ фосфорилирования STAT5

В последней проведенной при создании изобретения серии экспериментов исследовали воздействие иммуноконъюгата на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, на индукцию фосфорилирования STAT5 в сравнении с иммуноконъюгатами на основе 28H1 Fab-IL-2-Fab и Fab-IL-2 qm-Fab, а также с пролейкином с использованием человеческих NK-клеток, CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, CD8<sup>+</sup>-Т-клеток и T<sub>reg</sub>-клеток из человеческих PBMC. В целом, метод состоял в следующем: получали образцы крови здоровых добровольцев в содержащие гепарин шприцы и выделяли PBMC. PBMC обрабатывали указанными иммуноконъюгатами в указанных концентрациях или пролейкином (фирма Novartis) в качестве контроля. После 20-минутной инкубации при 37°C PBMC фиксировали предварительно нагретым Cytotfix-буфером (фирма Becton Dickinson, № 554655) в течение 10 мин при 37°C, после чего повышали проницаемость клеток с помощью буфера III Phosflow Perm (фирма Becton Dickinson, № 558050) в течение 30 мин при 4°C. Клетки отмывали дважды ЗФР, содержащим 0,1% БСА, перед осуществлением FACS-окрашивания, для которого использовали смеси антител для проточной цитометрии для выявления различных клеточных популяций и фосфорилирования STAT5. Образцы анализировали с использованием устройства FACSCantoII с HTS фирмы Becton Dickinson. NK-клетки определяли как CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>, CD8-позитивные Т-клетки определяли как CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4-позитивные Т-клетки определяли как CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> и T<sub>reg</sub>-клетки определяли как CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>.

Для NK-клеток и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток, которые не экспрессируют или экспрессируют очень низкие уровни CD25 (что означает, что передача сигналов IL-2R опосредуется прежде всего гетеродимером  $\beta\gamma$  IL-2R), результаты демонстрируют, что иммуноконъюгат на основе 4G8 IgG-IL-2 qm оказался менее чем в 10 раз менее эффективным в отношении индукции фосфорилирования STAT5, чем пролейкин, но несколько более эффективным, чем иммуноконъюгаты на основе 28H1 Fab-IL-2-Fab и Fab-IL-2 qm-Fab. Для CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, для которых характерна быстрая повышающая регуляция CD25 при стимуляции, иммуноконъюгат на основе 4G8 IgG-IL-2 qm оказался менее эффективным по сравнению с иммуноконъюгатом 28H1 Fab-IL-2-Fab, но несколько более эффективным по сравнению с иммуноконъюгатом 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab, и для него все еще была характерна способность индуцировать передачу сигналов IL-2R в насыщающих концентрациях, сопоставимую с пролейкином и 28H1 Fab-IL-2-Fab. Это противоположно результатам, полученным с использованием T<sub>reg</sub>-клеток, в отношении которых эффективность иммуноконъюгата на основе 4G8 IgG-IL-2 qm оказалась существенно более низкой по сравнению с иммуноконъюгатом Fab-IL-2-Fab из-за высокого уровня экспрессии CD25 на T<sub>reg</sub>-клетках и пониженной аффинности связывания иммуноконъюгата на основе 4G8 IgG-IL-2 qm с CD25. Вследствие отсутствия связывания с CD25 у иммуноконъюгата на основе 4G8 IgG-IL-2 qm передача сигналов IL-2 в T<sub>reg</sub>-клетках активируется через гетеродимер  $\beta\gamma$  IL-2R только в концентрациях, при которых происходит активация передачи сигналов IL-2R на CD25-негативных эффекторных клетках через гетеродимер  $\beta\gamma$  IL-2R. Таким образом, обобщая полученные результаты, можно заключить, что иммуноконъюгат на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, представленный в настоящем описании, обладает способностью активировать передачу сигналов IL-2R через гетеродимер  $\beta\gamma$  IL-2R, но не обеспечивает предпочтительную стимуляцию T<sub>reg</sub>-клеток по сравнению с другими эффекторными клетками. Результаты этих экспериментов представлены на фиг. 12.

30 Связывание 2B10 IgG-IL-2 qm с клетками, экспрессирующими TNC A2

Связывание иммуноконъюгата на основе 2B10 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является TNC A2, с человеческим TNC A2, экспрессируемым на

U87MG-клетках, измеряли с помощью FACS. В целом, метод состоял в следующем: 200000 клеток на лунку инкубировали с взятым в указанных концентрациях иммуноконъюгатом в круглодонном 96-луночном планшете в течение 30 мин при 4°C и дважды отмывали ЗФР/0,1% БСА. Связанный  
5 иммуноконъюгат определяли после инкубации в течение 30 мин при 4°C с конъюгированным с ФИТЦ F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом козьего антитела к человеческому IgG, Fcy-специфическим, AffiniPure (фирма Jackson Immuno Research Lab, № 109-096-098, рабочий раствор: разведение 1:20 в ЗФР/0,1% БСА, свежеприготовленный), используя устройство FACS CantoII (программное  
10 обеспечение FACS Diva). Результаты представлены на фиг. 13. Данные демонстрируют, что связывание иммуноконъюгата 2B10 IgG-IL-2 qm с экспрессирующими TNC A2 клетками U87MG такое же, как и у соответствующего неконъюгированного IgG.

Индукция пролиферации NK92-клеток иммуноконъюгатами IgG-IL-2

15 Иммуноконъюгаты 2B10 IgG-IL-2 qm, CH1A1A 98/99 2F1 IgG-IL-2 qm, CH1A1A 98/99 2F1 IgG-IL-2 wt, 4B9 IgG-IL-2 qm и 4B9 IgG-IL-2 wt тестировали в отношении их способности индуцировать пролиферацию NK92-клеток. Для анализа пролиферации NK92-клетки выращивали в свободной от IL-2 среде в течение 2 ч, высевали 10000 клеток/лунку в плоскодонный 96-луночный  
20 планшет, а затем инкубировали в течение 3 дней во влажной камере при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в присутствии содержащих IL-2 иммуноконъюгатов. Через 3 дня содержание АТФ в клеточных лизатах измеряли, определяя на основе люминисценции количество жизнеспособных клеток с использованием набора для анализа «CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay» фирмы Promega (№  
25 G7571/2/3). Процент роста рассчитывали, принимая рост при использовании пролейкина (фирма Novartis) в концентрации 1,1 мг/мл за 100% пролиферации и рост необработанных клеток без стимуляции IL-2 за 0% пролиферации. Результаты представлены на фиг. 14 и 15. Данные демонстрируют, что все конструкции обладали способностью индуцировать пролиферацию NK92-клеток,  
30 при этом конструкции на основе CH1A1A являлись более активными, чем иммуноконъюгат 2B10 IgG-IL-2 qm, а конструкции, содержащие IL-2 wt, оказались более активными, чем соответствующие конструкции, содержащие IL-2 qm.

### Пример 3

В целом, интродуцировали мутации P329G LALA, которые практически полностью элиминируют способность взаимодействовать с Fc $\gamma$ R у человеческих антител типа IgG<sub>1</sub> (см. заявку на европейский патент EP 11160251.2, которая  
5 полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки), для снижения способности связываться с Fc $\gamma$ R/эффекторной функции и, как следствие, предупреждения избыточного высвобождения цитокина, когда происходит совместная активация соответствующих цитокиновых рецепторов посредством передачи сигналов Fc $\gamma$ R. В конкретных случаях, например, когда мишенью  
10 антитела является высокоспецифический опухолевый антиген, связанные с Fc эффекторные функции можно сохранять, используя Fc-домен немодифицированного IgG или можно даже дополнительно повышать посредством гликоинженерии Fc-домена IgG.

Например, при создании изобретения был создан иммуноконъюгат клона  
15 CH1A1A на основе антитела к СЕА IgG-IL-2 qm, мишенью которого является СЕА, в котором один четырехмутантный IL-2 сливали с С-концом одной гетеродимерной тяжелой цепи через (SG<sub>4</sub>)<sub>3</sub>-линкер. В этот иммуноконъюгат не интродуцировали мутации P329G LALA (см. последовательности SEQ ID NO: 227, 229 и 231). Иммуноконъюгат экспрессировали и очищали в виде слитого  
20 белка, содержащего IgG дикого типа, или созданного с помощью гликоинженерии слитого белка IgG-IL-2 qm согласно описанному ниже методу.

#### Получение (подвергнутого гликоинженерии) иммуноконъюгата IgG-IL-2 qm

Имуноконъюгат на основе CH1A1A IgG-IL-2 qm, мишенью которого является СЕА, получали путем совместной трансфекции клеток НЕК293-EBNA  
25 экспрессионными векторами, пригодными для антител млекопитающих. Клетки НЕК293-EBNA на экспоненциальной фазе роста трансфектировали с помощью метода на основе фосфата кальция. Альтернативно этому, клетки НЕК293, выращиваемые в суспензии, трансфектировали полиэтиленимином. Для  
30 получения немодифицированного не подвергнутого гликоинженерии иммуноконъюгата IgG-IL-2 qm клетки трансфектировали только экспрессионными векторами для тяжелой и легкой цепей антитела в соотношении 1:1 (при этом вектор для тяжелой цепи антитела представлял собой смесь в соотношении 1:1 двух следующих векторов: вектор для тяжелой цепи с

эффекторным фрагментом и вектор для тяжелой цепи без эффекторного фрагмента).

Для получения подвергнутого гликоинженерии иммуноконъюгата IgG-IL-2 qm, мишенью которого является СЕА, клетки совместно трансфектировали двумя дополнительными плазмидами, одна из которых предназначена для экспрессии слитого полипептида GnTIII (экспрессионный вектор для GnT-III), и одна из которых предназначена для экспрессии маннозидазы II (экспрессионный вектор для маннозидазы II комплекса Гольджи) в соотношении 4:4:1:1 соответственно. Клетки выращивали в виде прикрепленных монослойных культур в Т-колбах, используя культуральную среду DMEM, дополненную 10% FCS, и осуществляли их трансфекцию при конfluэнтности от 50 до 80%. Для трансфекции за 24 ч до осуществления трансфекции в T150-колбу высевали 15 миллионов клеток в 25 мл культуральной среды DMEM, дополненной FCS (конечная концентрация 10 об.%), и клетки выдерживали при 37°C в течение ночи в инкубаторе в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Для трансфекции каждой T150-колбы приготавливали раствор, содержащий ДНК, CaCl<sub>2</sub> и воду, путем смешения 94 мкг общей плазмидной ДНК вектора, взятой поровну из экспрессионных векторов легкой и тяжелой цепи, воды до конечного объема 469 мкл и 469 мкл раствора 1М CaCl<sub>2</sub>. К этому раствору добавляли раствор, содержащий 938 мкл 50мМ HEPES, 280мМ NaCl, 1,5мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,05, немедленно перемешивали в течение 10 с и давали выстояться при комнатной температуре в течение 20 с. Суспензию разводили 10 мл среды DMEM, дополненной 2% FCS, и вносили в T150-колбу вместо находящейся в ней среды. Затем дополнительно вносили 13 мл среды для трансфекции. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение примерно 17-20 ч, затем среду заменяли 25 мл DMEM, 10% FCS. Кондиционированную культуральную среду собирали примерно через 7 дней после замены среды путем центрифугирования в течение 15 мин при 210 × g. Раствор стерилизовали фильтрацией (фильтр 0,22 мкм) и добавляли азид натрия в конечной концентрации 0,01% (мас./об.) и выдерживали при 4°C.

Секретируемые антитела дикого типа или подвергнутые гликоинженерии иммуноконъюгаты IgG-IL-2 qm, мишенью которого является СЕА, очищали из супернатантов клеточных культур с помощью аффинной хроматографии,

используя аффинную хроматографию на белке А, а затем стадию гель-  
5 фильтрации на колонке HiLoad Супердекс 200 (фирма GE Healthcare) согласно  
описанному выше методу. Концентрацию белка, чистоту, молекулярную массу,  
содержание агрегатов и целостность анализировали согласно описанному выше  
методу.

Анализ олигосахаридной структуры (подвергнутых гликоинженерии)  
иммуноконъюгатов IgG-IL-2 qm

Для определения относительных соотношений содержащих фукозу и  
несодержащих фукозу (афукозилированных) олигосахаридных структур  
10 высвободившиеся гликаны очищенных образцов иммуноконъюгатов  
анализировали с помощью MALDI-ToF-масс-спектрометрии. Образец  
иммуноконъюгата (примерно 50 мкг) инкубировали в течение ночи при 37°C с 5  
мед. N-гликозидазы F (фирма QAbio; PNGазаF: E-PNG01) в 2мМ Трис, pH 7,0  
для высвобождения олигосахарида из белкового каркаса. Для деаминирования  
15 гликанов добавляли уксусную кислоту до конечной концентрации 150мМ и  
инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Для анализа с помощью MALDI TOF-  
масс-спектрометрии 2 мкл образца смешивали на MALDI-мишени с 2 мкл  
матричного раствора DHB (2,5-дигидробензойная кислота (фирма Bruker  
Daltonics, № 201346), растворенного в смеси 50% этанола/5мМ NaCl в  
20 концентрации 4 мг/мл), и анализировали с помощью MALDI TOF-масс-  
спектрометра Autoflex II (фирма Bruker Daltonics). Как правило, в одном  
эксперименте получали и обобщали 50-300 изображений. Полученные спектры  
оценивали с помощью программы для flex-анализа (фирма Bruker Daltonics) и  
определяли массы для каждого обнаруженного пика. Затем пики оценивали в  
25 отношении содержащих фукозу и несодержащих фукозу (нефукозилированных)  
структур путем сравнения рассчитанных масс и теоретически ожидаемых масс  
для соответствующих структур (например, комплексных, гибридных структур и  
олигоманнозных или с высоким содержанием маннозы структур соответственно,  
с фукозой и без фукозы).

30 Для определения относительного содержания гибридных структур образцы  
антител расщепляли одновременно с помощью N-гликозидазы F и  
эндогликозидазы H (фирма QAbio; EndoH: E-EH02). N-гликозидаза F  
обеспечивает высвобождение всех N-связанных структур гликанов



(комплексных, гибридных структур и олигоманнозных или с высоким содержанием маннозы структур) из белкового каркаса, а эндогликозидаза Н расщепляет все гибридные типы гликанов дополнительно между двумя остатками N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) на редуцирующем конце гликана.

5 Этот продукт расщепления затем обрабатывали и анализировали с помощью MALDI TOF-масс-спектрометрии так же, как описано выше для расщепления образца N-гликозидазой F. Путем сравнения схемы, полученной в результате расщепления N-гликозидазой F и в результате расщепления комбинацией N-гликозидаза F/Endo H, уровень снижения сигналов конкретной углеводной

10 структуры применяли для определения относительного содержания гибридных структур. Относительное содержание каждой углеводной структуры рассчитывали из соотношения высоты пика индивидуальной структуры и суммы высот пиков всех обнаруженных олигосахаридов. Количество фукозы определяли как процент содержащих фукозу структур относительно всех

15 углеводных структур, идентифицированных в образце, обработанном N-гликозидазой F (например, комплексных, гибридных структур и олигоманнозных или с высоким содержанием маннозы структур). Количество нефукозилированных структур определяли как процент структур, в которых отсутствовала фукоза, относительно всех углеводных структур,

20 идентифицированных в образце, обработанном N-гликозидазой F (например, комплексных, гибридных структур и олигоманнозных или с высоким содержанием маннозы структур).

#### Анализ антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичности

Осуществляли сравнение с использованием анализов ADCC

25 иммуноконъюгатов CH1A1A IgG-IL-2, мишенью которых является СЕА, дикого типа и созданных с помощью гликоинженерии в отношении их способности опосредовать клеточную цитотоксичность. В целом, метод состоял в следующем: собирали в качестве клеток-мишеней сверхэкспрессирующие СЕА человеческие опухолевые клетки линии А549, отмывали и ресуспендировали в

30 культуральной среде, окрашивали свежеприготовленным кальцеином АМ (фирма Molecular Probes) при 37°С в течение 30 мин, отмывали трижды, подсчитывали количество клеток и разводили до 300000 клеток/мл. Эту суспензию переносили в круглодонный 96-луночный планшет (N = 30000

клеток/лунку), добавляли разведение соответствующего иммуноконъюгата и инкубировали в течение 10 мин для облегчения связывания тестируемого иммуноконъюгата с клетками до контакта с эффекторными клетками.

5 Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней составляло 25:1 в случае свежевыделенных РВМС. Совместную инкубацию осуществляли в течение 4 ч. Применяли две различные системы получения выходных данных: высвобождение лактатдегидрогеназы (LDH) в супернатант после расщепления «атакуемых» клеток и сохранение кальцеина в выживших клетках. LDH из супернатанта совместной культуры собирали и анализировали с помощью 10 набора для выявления LDH (фирма Roche Applied Science). Превращение субстрата с помощью фермента LDH измеряли с использованием ридера абсорбции для ELISA (программа SoftMaxPro, длины референс-волн: 490 нм, 650 нм). Остаточный кальций в живых клетках анализировали с помощью ридера флуоресценции (Wallac VICTOR3 1420 Multilabel COUNTER (фирма Perkin 15 Elmer)) после отделения оставшегося супернатанта от клеточного дебриса, однократно промывали в 3ФР перед осуществлением лизиса и фиксировали клетки с помощью боратного буфера (50мМ борат, 0,1% Тритон).

На фиг. 16 продемонстрированы результаты, основанные на определении LDH. Аналогичные результаты получали на основе оценки сохранения кальцеина 20 (данные не представлены). Обе конструкции обладали способностью опосредовать ADCC, при этом созданная с помощью гликоинженерии конструкция обладала такой же активностью, что и соответствующий созданный с помощью гликоинженерии неконъюгированный IgG. Как и ожидалось, у не подвергнутой гликоинженерии конструкции обнаружена пониженная активность 25 по сравнению с созданной с помощью гликоинженерии конструкции.

#### Пример 4

Создавали иммуноконъюгаты IgG-IL-2, мишенью которых является FAP, на основе 28H1 или 4B9, иммуноконъюгаты, мишенью которых является СЕА, на основе СН1А1А 98/99 2F1 и «ненаправленные» иммуноконъюгаты на основе 30 DP47GS, в которых один полипептид IL-2 дикого типа сливали с С-концом одной гетеродимерной тяжелой цепи. Для гетеродимеризации, приводящей к получению иммуноконъюгата с одним IL-2-фрагментом, использовали технологию «knob-into-hole». Для того, чтобы минимизировать создание

гомодимерных слияний IgG-IL-2, цитокин сливали с содержащей «выступ» тяжелой цепью (с делецией С-концевого остатка Lys) через G<sub>4</sub>-(SG<sub>4</sub>)<sub>2</sub>- или (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-линкер. Последовательности этих иммуноконъюгатов представлены в SEQ ID NO: 193, 197 и 205 (28H1 с линкером G<sub>4</sub>-(SG<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) SEQ ID NO: 207, 273 и 211 (4B9 с линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>), SEQ ID Nos:277, 279 и 283 (CH1A1A 98/99 2F1 с линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>), SEQ ID NO: 219, 223 и 225 (DP47GS с линкером G<sub>4</sub>-(SG<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), SEQ ID NO: 219, 293 и 225 (DP47GS с линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>). Слияние антитело-цитокин обладало IgG-подобными свойствами. Для снижения способности связываться с FcγR/эффекторной функции и предупреждения совместной активации FcR в Fc-домен интродуцировали мутации P329G L234A L235A (LALA). Обе конструкции очищали согласно описанным выше методам. Конечную очистку осуществляли с помощью гель-фильтрации (HiLoad 26/60 Супердекс 200, фирма GE Healthcare) в буфере для конечного продукта, содержащем 20мМ гистидин, 140мМ хлорид натрия, рН 6. На фиг. 17-20 представлены соответствующие хроматограммы и профили элюции, полученные при очистке (А, Б), а также результаты, полученные с помощью аналитического ДСН-ПААГ и гель-фильтрации, конечных очищенных конструкций (В, Г). Выход составлял 15,6 мг/л для «ненаправленного» иммуноконъюгата DP47GS IgG-IL-2, 26,7 мг/мл для иммуноконъюгата 28H1 IgG-IL-2, 4,6 мг/л для иммуноконъюгата CH1A1A 98/99 2F1 IgG-IL-2 и 11 мг/л для иммуноконъюгата 4B9 IgG-IL-2.

Затем способность указанных иммуноконъюгатов связываться с FAP, соответственно отсутствие связывания, а также связывание с βγ-цепью IL-2R и α-цепью IL-2R определяли с помощью SPR согласно описанному выше методу (см. пример 2). Изучали также клеточную активность в отношении популяций иммунных эффекторных клеток и фармакодинамическое действие *in vivo*.

#### Пример 5

Имуноконъюгаты IgG-IL-10 на основе 4G8, мишенью которых является FAP, а также на основе 2B10, мишенью которых является TNC A2, создавали путем слияния двух различных форматов цитокина IL-10 с С-концом тяжелой цепи гетеродимерного IgG, содержащего модификацию, приводящую к образованию «впадины»: таких как формат в виде либо одноцепочечного IL-10,

в который встраивали 20-мерный линкер (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> между двумя молекулами IL-10, либо сконструированного мономерного IL-10 (Josephson и др., J Biol Chem 275, 2000, сс. 13552-13557). Обе молекулы сливали через 15-мерный линкер (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> с С-концом тяжелой цепи, содержащей модификацию, приводящую к образованию «впадины», с делецией С-концевого остатка Lys. Для достижения гетеродимеризации, приводящей к получению только одной тяжелой цепи, несущей IL-10-фрагмент, применяли технологию «knob-into-hole». Слияние IgG-цитокин обладало IgG-подобными свойствами. Для снижения способности связываться с FcγR/эффекторной функции и предупреждения совместной активации FcR в Fc-домен интродуцировали мутации P329G LALA.

Последовательности соответствующих конструкций представлены в SEQ ID NO: 233, 235 и 239 (2B10 с scIL-10), SEQ ID NO: 233, 237 и 239 (2B10 с мономерным IL-10 “IL-10M1”), SEQ ID NO: 241, 243 и 205 (4G8 с scIL-10), SEQ ID NO: 241, 245 и 205 (4G8 с IL-10M1). Все эти иммуноконъюгаты очищали согласно описанным выше методам. Затем их способность связываться с FAP или TNC A2 соответственно, а также их аффинность к человеческому IL-10R1 определяли с помощью SPR, используя биосенсор ProteOn XPR36. В целом, метод состоял в следующем: мишени, т.е. FAP или TNC A2, а также человеческий IL-10R1 иммобилизовали, располагая их в вертикальном направлении на поверхности сенсорного чипа (FAP с помощью стандартного аминного сочетания, TNC A2, и человеческий IL-10R1 (оба биотинилированные через С-концевую avi-метку) путем захвата нейтравидином). Затем иммуноконъюгаты IgG-IL-10 инъецировали в шести различных концентрациях, включая нулевую концентрацию, в качестве анализируемых веществ, располагая их в горизонтальном направлении. После оценки с использованием двух стандартов сенсограммы аппроксимировали, применяя модель взаимодействия 1:1, для определения кинетических констант скорости и аффинности. На фиг. 21 и 22 представлены результаты анализа с использованием аналитического ДСН-ПААГ и данные определения на основе SPR аффинности к антигенам-мишеням, а также к IL-10-рецептору. Данные демонстрируют, что связывание иммуноконъюгатов с TNC A2 или FAP характеризовалось значениями K<sub>D</sub> 52 или 26пМ соответственно, а значения K<sub>D</sub> к IL-10-рецептору составляли 520 и 815пМ.

### Пример 6

Согласно методам, описанным выше, создавали и экспрессировали слитые белки IgG-цитокин, которые состояли только из одной области Fab на основе 28H1 или на основе 4B9, мишенью которой является FAP, слитой с N-концом субъективности Fc-домена, содержащей модификацию, приводящую к образованию «впадины», в то время как вторую область Fab тяжелой цепи IgG с модификацией, приводящей к образованию «выступа», заменяли на цитокиновый фрагмент, применяя линкер  $(G_4S)_n$  ( $n=1$ ). См. на фиг. 2B схематическое изображение этого формата иммуноконъюгата (обозначенного также как формат «1+1»). Применяемые цитокиновые фрагменты представляли собой четырехмутантный IL-2, описанный выше, а также в заявке на патент PCT № PCT/EP2012/051991 (см. SEQ ID NO: 3), IL-7 и IFN- $\alpha$ . Соответствующие последовательности слитых полипептидов, содержащие цитокиновый фрагмент, слитый с N-концом субъективности Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «выступа», через линкерный пептид, представлены в SEQ ID NO: 247 (содержит четырехмутантный IL-2), SEQ ID NO: 249 (содержит IL-7) и SEQ ID NO: 251 (содержит IFN- $\alpha$ ). В этих конструкциях направленное действие иммуноконъюгата достигалось благодаря высокой аффинности одновалентной области Fab. Такой формат можно рекомендовать в случаях, в которых интернализацию антигена можно снижать с использованием одновалентного связывающего агента. Иммуноконъюгаты получали, очищали и анализировали согласно описанным выше методам. Для конструкций, содержащих IL-2 qm или IL-7 в одном цикле объединяли аффинную хроматографию на белке A и гель-фильтрацию. В качестве буфера для гель-фильтрации и для конечного продукта применяли буфер, содержащий 20мМ гистидин, 140мМ NaCl, pH 6.0. На фиг. 23-26 представлены профили элюции и хроматограммы, полученные при очистке, а также результаты, полученные с помощью аналитического ДСН-ПААГ и хроматограммы, полученные при гель-фильтрации, конечных очищенных конструкций. Выход составлял 11 мг/л для конструкции 4B9 «1+1» IgG-IL-2 qm, 43 мг/л для 28H1 «1+1» IgG-IL-2 qm, 20,5 мг/л для 4B9 «1+1» IgG-IL-7 и 10,5 мг/л для 4B9 «1+1» IgG-IFN- $\alpha$ .

Оценивали способность конструкций «1+1», содержащих IL-2 qm, индуцировать пролиферацию НК-клеток в сравнении с иммуноконъюгатами IgG-

IL-2  $\alpha$ m. NK92-клетки выращивали в минимальной среде в течение 2 ч, затем высевали 10000 клеток/лунку в 96-луночный планшет с прозрачным черным плоским дном. Иммуноконъюгаты добавляли титрометрически к высеянным NK-92-клеткам. Через 72 ч определяли содержание АТФ для оценки количества жизнеспособных клеток с использованием набора для анализа «CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay» (фирма Promega) согласно инструкциям производителя. На фиг. 27 продемонстрировано, что конструкции «1+1» обладали способность индуцировать пролиферацию клеток NK-92, обладая при этом несколько более низкой активностью по сравнению с соответствующими конструкциями IgG-IL-2  $\alpha$ m.

Конструкции «1+1» на основе 4B9, содержащие IL-2  $\alpha$ m или IL-7, оценивали в отношении их способности индуцировать Т-клеточную пролиферацию в сравнении с иммуноконъюгатами IgG-IL-2. Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) получали с помощью Histopaque-1077 (фирма Sigma Diagnostics Inc., Сент-Луис, шт. Миссури, США). В целом, метод состоял в следующем: лейкоцитарные пленки крови разводили в соотношении 5:1 ЗФР, не содержащим кальций и магний, и наслаивали на Histopaque-1077. Градиент центрифугировали при  $450 \times g$  в течение 30 мин при комнатной температуре (КТ) без перерыва. Собирали содержащую РВМС интерфазу, и отмывали трижды ЗФР ( $350 \times g$ , затем  $300 \times g$  в течение 10 мин при КТ). РВМС предварительно стимулировали с использованием 1 мкг/мл ФГА-М (фирма Sigma Aldrich, № L8902) в течение ночи перед их мечением с помощью 100нМ CFSE (сложный сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина) в течение 15 мин при  $37^\circ\text{C}$ . Клетки отмывали 20 мл среды перед выделением меченых РВМС в течение 30 мин при  $37^\circ\text{C}$ . Клетки отмывали, подсчитывали и по 100000 клеток высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном. Иммуноконъюгаты добавляли титрометрически к высеянным клеткам, осуществляя инкубации в течение 6 дней. Затем клетки отмывали, окрашивали соответствующими маркерами клеточной поверхности и анализировали с помощью FACS, используя устройство BD FACSCantoII. CD4-Т-клетки идентифицировали как  $\text{CD3}^+/\text{CD8}^-$ , а CD8-Т-клетки как  $\text{CD3}^+/\text{CD8}^+$ .

На фиг. 28 продемонстрировано, что конструкции «1+1», содержащие либо IL-2  $\alpha$ m, либо IL-7, обладали способность индуцировать пролиферацию ФГА-

активированных CD4- (А) и CD8-Т-клеток (Б). Также как в случае NK-клеток, конструкция «1+1», содержащая IL-2 qm, обладала несколько более низкой активностью по сравнению с конструкцией IgG-IL-2 qm.

5 Конструкцию «1+1» на основе 4B9, содержащую IFN- $\alpha$ , тестировали в отношении ее способности ингибировать пролиферацию клеток Дауди в сравнении с рофероном А (фирма Roche). В целом, метод состоял в следующем: клетки Дауди метили 100нМ (витальным красителем) CFSE и высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном (50000 клеток/лунку). Молекулы добавляли в указанных концентрациях, а затем инкубировали в течение 3 дней  
10 при 37°C. Пролиферацию оценивали количественно, анализируя разведение CFSE, при котором происходит исключение погибших клеток из анализа путем применения красителя, позволяющего анализировать живые/погибшие клетки.

На фиг. 29 продемонстрировано, что конструкция обладала способностью ингибировать пролиферацию клеток Дауди по меньшей мере столь же  
15 эффективно, что и роферон А.

#### Пример 7

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

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

Мышам однократно инъектировали i.v. иммуноконъюгаты, мишенью которых является FAP, такие как 28H1 IgG-IL2 wt (2,5 мг/кг) или 28H1 IgG-IL2 qm (5 мг/кг), или «ненаправленные» иммуноконъюгаты DP47GS IgG-IL2 wt (5

мкг/кг) или DP47GS IgG-IL2 qm (5 мг/кг). Всем мышам инъецировали i.v. по 200 мкл соответствующего раствора. Для получения соответствующего количества иммуноконъюгата на 200 мкл маточные растворы при необходимости разводили 3ФР.

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

На фиг. 30 представлены результаты фармакокинетического исследования  
15 указанных иммуноконъюгатов, содержащих IL-2. Как конструкции, мишенью которых является FAP (А), так и «ненаправленные» (Б) конструкции IgG-IL2 qm, имели более продолжительное время полужизни в сыворотке (примерно 30 ч) по сравнению с соответствующими конструкциями IgG-IL2 wt (примерно 15 ч). Следует отметить, что хотя экспериментальные условия не являлись  
20 непосредственно сопоставимыми, время полужизни в сыворотке содержащих IL-2 иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, по-видимому, было более продолжительным, чем время полужизни в сыворотке известных в данной области иммуноконъюгатов «2+2» IgG-IL-2 (см. фиг. 1), которые описаны у Gillies и др., Clin Cancer Res 8, 2002, сс. 210-216.

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

25 Пример 8

Осуществляли изучение биораспределения для анализа направленного переноса к опухоли иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении.

Проводили сравнение иммуноконъюгата на основе 28H1 IgG-IL-2 qm, мишенью



которого является FAP, и антител, мишенью которых является FAP, таких как 28H1 IgG и 4B9 IgG, и «ненаправленного» DP47GS IgG. Кроме того, осуществляли визуализацию с использованием СPECT (однофотонная эмиссионная компьютерная томография)/ СТ (компьютерная томография) с использованием 4B9 IgG-IL-2 qm в сравнении с DP47GS IgG-IL-2 qm, 4B9 IgG и DP47GS IgG.

Конъюгация с ДТРА и мечение с помощью  $^{111}\text{In}$

Растворы 28H1 IgG-IL-2 qm, 28H1 IgG<sub>1</sub>, 4B9 IgG-IL-2 qm, 4B9 IgG<sub>1</sub> и DP47 IgG<sub>1</sub> подвергали диализу в противотоке забуференного фосфатом физиологического раствора (ЗФР, 15мМ). Два миллиграмма конструкций (5 мг/мл) конъюгировали с изотиоцианатбензилдиэтилтриаминпентауксусной кислотой (ИТС-ДТРА, фирма Macrocyclus, Даллас, шт. Техас) в 0,1М NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2, в условиях, строго отличающихся отсутствием металлов, путем инкубации с 5-кратным молярным избытком ИТС-ДТРА в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ). Неконъюгированную ИТС-ДТРА удаляли путем диализа в противотоке буфера на основе 0,1М 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), pH 5,5.

Очищенные конъюгаты радиоактивно метили путем инкубации с  $^{111}\text{In}$  (фирма Covidien BV, Петтен, Нидерланды) в 0,1М MES-буфере, pH 5,5, содержащим 0,05% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0,05% Твин-80, при КТ в условиях, строго отличающихся отсутствием металлов, в течение 30 мин. После радиоактивного мечения добавляли этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТК) до конечной концентрации 5мМ для образования хелатного комплекса с несвязанным  $^{111}\text{In}$ . Меченные с помощью  $^{111}\text{In}$  продукты очищали путем гель-фильтрации на одноразовых колонках G25M (PD10, фирма Amersham Biosciences, Уппсала, Швеция). Определяли радиохимическую чистоту очищенных меченных с помощью  $^{111}\text{In}$  конструкций с помощью тонкослойной экспресс-хроматографии (ITLC) на хроматографических пластинах TEC Control (фирма Biodex, Ширли, шт. Нью-Йорк), используя 0,1М цитратный буфер, pH 6,0 в качестве подвижной фазы. Удельная активность меченных с помощью  $^{111}\text{In}$  препаратов составляла 0,6-4,6 МВк/мкг.

### Анализ Lindmo

Определяли иммунореактивную фракцию меченных с помощью  $^{111}\text{In}$  препаратов антител, применяя описанный ранее метод (Lindmo и др., J Immunol Methods 72, 1984 сс. 77-89). В целом, метод состоял в следующем: серии  
5 серийных разведений клеток почки человеческого эмбриона (НЕК), трансфектированных кДНК фибробласт-активирующего белка (FAP) (клетки НЕК-FAP), инкубировали с меченной 200 Вк  $^{111}\text{In}$  конструкцией при 37°C в течение 1 ч. Дубликат с наименьшей концентрацией клеток инкубировали в присутствии избытка немеченой конструкции для коррекции неспецифического  
10 связывания. После инкубации клетки отмывали, интенсивно перемешивали и определяли ассоциированную с клетками радиоактивность в клеточном дебрисе с использованием счетчика гамма-лучей (Wallac Wizzard 3'' 1480 автоматический  $\gamma$ -счетчик, фирма Pharmacia LKB). Содержание иммунореактивной фракции составляло 75-94%.

### 15 Животные

Самок бестимусных мышей линии BALB/c (8-9 недель, +/- 20 г) покупали у фирмы Janvier и содержали в центральной лаборатории по разведению животных  
медицинского центра университета Радбода г. Неймегена в стандартных условиях по 5 животных в каждой вентилируемой клетке, при этом они имели  
20 свободный доступ к корму и воде. После акклиматизации в течение 1 недели животным инокулировали s.c. по  $10 \times 10^6$  НЕК-FAP-клеток в матригеле (1:3) в левую боковую область и необязательно по  $5 \times 10^6$  НЕК-293-клеток в матригеле (1:3) в правую боковую область. Осуществляли мониторинг роста ксенотрансплантатов путем измерения штангенциркулем (объем =  
25  $(4/3 \cdot \pi) \cdot (1/2 \cdot \text{длина}) \cdot (1/2 \cdot \text{ширина}) \cdot (1/2 \cdot \text{глубина})$ ). Когда ксенотрансплантаты достигали объема  $100 \text{ мм}^3$  мышам инъецировали i.v. меченные с помощью  $^{111}\text{In}$  конструкции.

### Биораспределение (28H1 IgG-IL-2 qm, 28H1 IgG<sub>1</sub>, 4B9 IgG<sub>1</sub> и DP47GS IgG<sub>1</sub>)

Меченные с помощью  $^{111}\text{In}$  конструкции (5 MBк, 150 мкг, 200 мкл)  
30 инъецировали i.v. в хвостовую вену. Через 24 ч после инъекции животных умерщвляли путем асфиксии в атмосфере  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ . Получали образцы крови, мышц, ксенотрансплантата, легкого, селезенки, поджелудочной железы, почки,

желудка (пустой), двенадцатиперстной кишки (пустая) и печени, взвешивали и определяли радиоактивность с помощью счетчика гамма-лучей (Wallac Wizard). Стандарты инъецированной дозы (1%) подсчитывали одновременно и поглощение тканью рассчитывали как % от инъецированной дозы на грамм ткани (%ID/г).

SPECT-СТ-анализ (4B9 IgG-IL-2 qm, 4B9 IgG<sub>1</sub>, DP47GS IgG-IL-2 qm и DP47GS IgG<sub>1</sub>)

Меченные с помощью <sup>111</sup>In 4B9-IgG-IL-2 qm, 4B9-IgG<sub>1</sub>, DP47GS-IgG-IL-2 qm и DP47GS-IgG<sub>1</sub> инъецировали i.v. (20 МВк, 50, 150, 300 мкг, 200 мкл). Через 4, 24, 72 и 144 ч после инъекции животных анестезировали изофлураном /O<sub>2</sub> и сканировали в течение 30-60 мин с использованием камеры U-SPECT II microSPECT/CT (фирма MILabs, Утрехт, Нидерланды), снабженной 1,0-миллиметровым коллиматором для мышей. Компьютерную томографию (СТ) осуществляли непосредственно после SPECT. Как, полученные с помощью SPECT (размер воксела 0,4 мм), так и СТ-сканы реконструировали с помощью программы MILabs и SPECT- и СТ-сканы регистрировали совместно для определения точной локализации радиосигнала. Создавали 3D-изображения с помощью программы Siemens Inveon Research Workplace.

На фиг. 31 продемонстрировано, что не обнаружены существенные различия в распределении между тканями и направленным переносом в опухоль конструкций 28H1- и 4B9-IgG<sub>1</sub> и 28H1 IgG-IL-2 qm через 24 ч (т.е. цитокин не изменяет существенно распределение в тканях и направленный перенос в опухоль иммуноконъюгатов), а также, что соотношение содержаний в опухоли/крови конструкций, мишенью которых является FAP, существенно выше, чем «ненаправленного» контрольного DP47GS IgG.

Эти результаты подтверждали при визуализации с использованием SPECT/СТ для иммуноконъюгата 4B9 IgG-IL-2 qm (данные не представлены). 4B9 IgG-IL-2 qm локализовался в FAP-позитивных НЕК-FAP-клетках, но не локализовался в FAP-негативных контрольных опухолях из НЕК-293, в то время как «ненаправленный» иммуноконъюгат на основе DP47GS не локализовался ни в какой опухоли. В отличие от неконъюгированных IgG слабое поглощение 4B9 IgG-IL-2 qm обнаружено также в селезенке.

### Пример 9

Осуществляли сравнение связывания иммуноконъюгатов на основе 28Н1 IgG-IL-2 qm и на основе 28Н1 IgG-(IL-2 qm)<sub>2</sub> (т.е. иммуноконъюгата, имеющего формат «2+2», представленного на фиг. 1; последовательности представлены в SEQ ID NO: 253 и 205) с NK92-клетками. В 96-луночный планшет высевали по 200000 NK92-клеток на лунку. Иммуноконъюгаты добавляли титрометрически к NK92-клеткам и инкубировали в течение 30 мин при 4°С, давая пройти связыванию. Клетки отмывали дважды ЗФР, содержащим 0,1% БСА, для удаления несвязанных конструкций. Для выявления иммуноконъюгатов добавляли меченное с помощью ФИТЦ античеловеческое Fc-специфическое антитело в течение 30 мин при 4°С. Клетки вновь отмывали дважды ЗФР, содержащим 0,1% БСА, и анализировали с помощью FACS с использованием устройства BD FACSCantoII.

Как проиллюстрировано на фиг. 32, для иммуноконъюгата «2+2» характерен более высокий уровень связывания с NK92-клетками по сравнению с соответствующей конструкцией «2+1».

### Пример 10

#### Индукция пролиферации человеческих РВМС содержащими IL-2 иммуноконъюгатами

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

Затем РВМС метили с помощью 40нМ CFSE (сложный сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина) в течение 15 мин при 37°С. Клетки отмывали 20 мл среды перед выделением меченых РВМС в течение 30 мин при 37°С. Клетки отмывали, подсчитывали и по 100000 клеток высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном. Предварительно разведенный пролейкин (поступающий в

продажу IL-2 дикого типа) или содержащие IL2 иммуноконъюгаты добавляли титрометрически к посеянным клеткам, которые инкубировали в течение указанных промежутков времени. Через 4-6 дней клетки отмывали, окрашивали для выявления соответствующих маркеров клеточной поверхности и  
5 анализировали с помощью FACS, используя устройство BD FACSCantoII. NK-клетки определяли как CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>, CD4-T-клетки как CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>, а CD8-T-клетки как CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>.

На фиг. 33 продемонстрированы данные о пролиферации NK-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28Н1 IL-2, мишенью которых является FAP, в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней. Все тестируемые  
10 конструкции индуцировали пролиферацию NK-клеток в зависимости от концентрации. Пролейкин оказался более эффективным, чем иммуноконъюгаты при применении в более низких концентрациях, однако это различие не обнаружено при более высоких концентрациях. В более ранние моменты  
15 времени (день 4) конструкции IgG-IL2 обладали несколько более высокой эффективностью, чем конструкции Fab-IL2-Fab. В более поздние моменты времени (день 6) эффективность всех конструкций была сопоставимой, при этом конструкция Fab-IL2 qm-Fab обладала слабой эффективностью при применении в низких концентрациях.

На фиг. 34 продемонстрированы данные о пролиферации CD4-T-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28Н1 IL-2, мишенью которых является FAP, в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней. Все тестируемые  
20 конструкции индуцировали пролиферацию CD4-T-клеток в зависимости от концентрации. Пролейкин оказался более эффективным, чем иммуноконъюгаты, а иммуноконъюгаты, содержащие IL-2 дикого типа, обладали несколько более  
25 высокой эффективностью, чем содержащие четырехмутантный IL-2. Также как и в случае NK-клеток, конструкция Fab-IL2 qm-Fab обладала наименьшей активностью. Наиболее вероятно, пролиферирующие CD4-T-клетки частично представляют собой регуляторные Т-клетки, по меньшей мере, при анализе  
30 результатов, полученных для конструкций, содержащих IL-2 дикого типа.

На фиг. 35 продемонстрированы данные о пролиферации CD8-T-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28Н1 IL-2, мишенью которых является FAP, в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней. Все тестируемые

конструкции индуцировали пролиферацию CD8-Т-клеток в зависимости от концентрации. Пролейкин оказался более эффективным, чем иммуноконъюгаты, а иммуноконъюгаты, содержащие IL-2 дикого типа, обладали несколько более высокой эффективностью, чем содержащие четырехмутантный IL-2. Также как и в случае NK-клеток и CD4-Т-клеток, конструкция Fab-IL2 qm-Fab обладала наименьшей активностью.

#### Пример 11

#### Пролиферация и активация индуцированной клеточной гибели активируемых IL-2 PBMC

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

25 Как продемонстрировано на фиг. 36, все конструкции индуцировали пролиферацию предварительно активированных Т-клеток. При применении в низких концентрациях конструкции, содержащие IL-2 дикого типа (wt), оказались более активными, чем содержащие IL-2 qm конструкции. IgG-IL-2 wt, Fab-IL-2 wt-Fab и пролейкин обладали сходной активностью. Конструкция Fab-IL-2 qm-Fab обладала несколько более низкой активностью, чем IgG-IL-2 qm. Конструкции, содержащие IL-2 дикого типа, обладали более высокой активностью в отношении CD4-Т-клеток, чем в отношении CD8-Т-клеток, наиболее вероятно из-за активации регуляторных Т-клеток. Конструкции, содержащие четырехмутантный IL-2, обладали сходной активностью в отношении CD8- и CD4-Т-клеток.

Как продемонстрировано на фиг. 37, Т-клетки, стимулированные IL-2 дикого типа в высоких концентрациях, обладали большей чувствительностью к индуцируемому антителом к Fas апоптозу, чем Т-клетки, обработанные четырехмутантным IL-2.

5 Пример 12

Дополнительно изучали «ненаправленные» конструкции на основе DP47GS (см. последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 299 и 297 соответственно). Согласно описанному выше методу создавали конъюгаты на основе DP47GS IgG, содержащие дикого типа или четырехмутантный IL-2. Для этих конструкций  
10 обнаружена сходная способность связываться с IL-2R и индуцировать пролиферацию иммунной клетки (например, NK-клетки, CD8<sup>+</sup>-клетки и CD4<sup>+</sup>-клетки) *in vitro*, что и у соответствующих имеющих специфическую мишень конструкций (данные не представлены). Однако в отличие от иммуноконъюгатов, мишенью которых является опухолевый антиген, они не  
15 накапливались в опухолевой ткани (см. пример 8).

Дополнительное фармакокинетическое исследование (в дополнение к изложенному в примере 7) осуществляли с использованием «ненаправленных» конструкций DP47GS IgG-IL-2, содержащих либо дикого типа, либо  
20 четырехмутантный IL-2. Самцам мышей линии C57BL/6J (n = 6 на группу) инъецировали *i.v.* 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг конструкции DP47GS IgG-IL-2 wt или DP47GS IgG-IL-2 *qm*. Инъецируемый объем составлял 1 мл для всех мышей. Образцы крови отбирали через 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96 и 168 ч после инъекции (из 3  
мышей в каждый момент времени) и хранили при -20°C до анализа. Определяли количество конструкций в образцах сыворотки с помощью ELISA, используя  
25 антитела к Fab для иммобилизации и идентификации конструкций. Все образцы и применяемые для калибровки стандарты разводили в соотношении 1:25 в мышинной сыворотке (полученной от фирмы Biogecclamation) перед анализом. В целом, метод состоял в следующем: сенсibilизированные стрептавидином 96-  
луночные планшеты (фирма Roche) отмывали трижды в течение 10 с 3ФР/0,05%  
30 Твин 20, после чего инкубировали с 100 мкл/лунку (0,5 мкг/мл) биотинилированным антителом к человеческому Fab (M-1.7.10; фирма Roche Diagnostics) в течение 1 ч при комнатной температуре. После повторной отмывки планшета трижды 3ФР/0,05% Твин 20 добавляли по 50 мкл/лунку

образца сыворотки или применяемых для калибровки стандартов и 50 мкл/лунку 3ФР/0,5% БСА до достижения конечного разведения образца 1:50. Образцы инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем вновь отмывали планшет трижды с помощью 3ФР/0,05% Твин 20. Затем планшеты инкубировали с меченым с помощью дигоксигенина антителом к человеческому Fab (M-1.19.31; Roche Diagnostics), которое вносили из расчета 100 мкл/лунку (0,5 мкг/мл), в течение 1 ч при комнатной температуре, отмывали, инкубировали с антителом к дигоксигенину POD (Roche Diagnostics, каталожный № 11633716001), которое вносили из расчета 100 мкл/лунку, в течение 1 ч при 10 комнатной температуре и вновь отмывали. И, наконец, добавляли по 100 мкл/лунку субстрата для пероксидазы ТМВ (фирма Roche Diagnostics, каталожный № 11484281001) в течение примерно 5 мин, затем для прекращения реакции с субстратом использовали по 50 мкл/лунку 2н. HCl. Планшет считывали в течение 2 мин после прекращения реакции при длине волны 450 нм и длине референс-волны 650 нм. 15

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 38. Обе конструкции обладали удлинённым временем полужизни, при этом конструкция, содержащая четырехмутантный IL-2 (Б), обладали более продолжительным временем жизни, чем конструкция, содержащая IL-2 дикого типа (А).

20 Кроме того, было подтверждено отсутствие связывания DP47GS IgG с различными белками, а также с человеческими клетками (PBMC).

Наличие специфического связывания (или его отсутствие) антитела DP47GS оценивали с помощью тест-системы на основе ELISA с использованием панели различных неродственных антигенов. Анализ осуществляли в 384-луночных титрационных микропланшетах MaxiSorp™ (фирма Thermo Scientific Nunc, каталожный № 460372). После каждой стадии инкубации планшеты 25 отмывали трижды 3ФР/0,05% Твин-20. Сначала различными антигенами, разведенными в 3ФР, сенсibilizировали планшеты в течение ночи при 6°C. Тестируемые концентрации и подробная информация о применяемых антигенах 30 представлены ниже в таблице.

Антиген	Источник	Поставщик	Каталожный №	Тестируемая концентрация [мкг/мл]
гистоны	тимус теленка	Roche Diagnostics	10223565601	2
БСА, фракция V	бычий	Roche Diagnostics	10735108001	2
инсулин	человеческий	Roche Diagnostics	11376497001	2



Антиген	Источник	Поставщик	Каталожный №	Тестируемая концентрация [мкг/мл]
кардиолипин	бычий	Sigma-Aldrich	C1649	2
гепарин	свиной	Sigma-Aldrich	H9902	2
CD40 (hFc)	человеческий	Sino Biological	1077-H03H	1
паратиреоидный гормон, ак 1-34 (PTH) (биотинилированный)	человеческий	AnaSpec	20690	0,5
DsДНК	тимус теленка	Sigma-Aldrich	D4522	0,16
гемоцианин	лимфа улитки	Sigma-Aldrich	H7017	0,22
актин бета 2	человеческий	Cytoskeleton	APHL99	0,67
стрептавидин	<i>Streptomyces avidinii</i>	Roche Diagnostics	11721674001	1
желатин	бычий	Roche Diagnostics	11111965001	2%, блокирующий буфер
лизат <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	собственность фирмы-заявителя	-	разведение 1:600

Затем лунки блокировали 2% желатина в воде в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ). Антитело DP47GS (1 мкг/мл в ЗФР) инкубировали с панелью иммобилизованных антигенов в течение 1,5 ч при КТ. Связанное антитело выявляли, используя антитело к человеческому IgG, конъюгированное с HRP (фирма GE Healthcare, каталожный № 9330V; разведенное в соотношении 1:1000 в ЗФР с 0,2% Твин-20 и 0,5% желатина). После инкубации в течение 1 ч планшеты отмывали 6 раз ЗФР/0,05% Твин-20 и осуществляли реакцию с использованием свежеприготовленного раствора субстрата BM blue POD (BM blue: 3,3'-5,5'-тетраметилбензидин, фирма Roche Diagnostics, каталожный номер 11484281001) в течение 30 мин при КТ. Абсорбцию измеряли при 370 нм. Контрольный уровень определяли без добавления антитела. В качестве положительного контроля служило являющееся собственностью фирмы-заявителя человеческое антитело типа IgG<sub>1</sub>, которое обладает способностью к неспецифическому связыванию практически со всеми иммобилизованными антигенами.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 39. Установлено, что антитело DP47GS не связывалось ни с одним из иммобилизованных антигенов. Выявленные сигналы находились в диапазоне, соответствующем контрольным образцам без антитела.

И, наконец, оценивали связывание антитела DP47GS с человеческими РВМС. Поскольку в процессе типичного иммунного ответа комбинация презентуемых на клеточной поверхности белков резко изменяется, связывание

тестировали на РВМС непосредственно после их выделения из здоровых взрослых людей, а также после активации *in vitro* двумя различными стимулами.

Человеческие РВМС выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла из лейкоцитарных пленок или из гепаринизированной свежей крови здоровых добровольцев с помощью Histopaque 1077 (фирма Sigma-Aldrich, Германия). РВМС либо непосредственно использовали в анализах связывания (свежие РВМС), либо культивировали и дополнительно стимулировали. РВМС культивировали при клеточной плотности  $2 \times 10^6$  клеток/мл в среде для Т-клеток, содержащей RPMI 1640 (фирма Gibco), дополненной 10 об.% инактивированной нагреванием FBS (фирма PAA Laboratories), 1мМ пируватом натрия (фирма Sigma-Aldrich), 1 об.% L-аланил-L-глутамин (фирма Biochrom) и 10нМ  $\beta$ -меркаптоэтанолом (фирма Sigma-Aldrich), при 37°C. Для стимуляции *in vitro* пролейкин (200 ед./мл, фирма Novartis) и фитогемагглютинин (ФГА-L; 2 мкг/мл, фирма Sigma-Aldrich) добавляли в течение 6 дней культивирования (активированные ФГА-L РВМС). Для повторной стимуляции *in vitro* 6-луночные планшеты для культуры ткани сенсibilizировали мышинным антителом к человеческому CD3 (клон КТ3, 1 мкг/мл) и мышинным антителом к человеческому CD28 (клон 28.2, 2 мкг/мл, оба фирмы eBioscience) и добавляли активированные ФГА-L РВМС в течение еще 24 ч (повторно стимулированные РВМС). Осуществляли мониторинг связывания антитела DP47GS (с мутациями L234A L235A (LALA) P329G в Fc-домене или без них) с белками клеточной поверхности, применяя пятикратные серийные разведения (наиболее высокая концентрация 200нМ), с использованием в качестве вторичного антитела козьего антитела к человеческому IgG, Fc-специфического, конъюгированного с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) (фирма Jackson Laboratories), и применяя проточную цитометрию. Все анализы осуществляли при 4°C для предупреждения интернализации поверхностных белков. Инкубацию с первичным и вторичным антителом осуществляли в течение 2 ч и 1 ч соответственно. Для достижения одновременного типирования лейкоцитов к вторичному антителу добавляли комбинации меченных флуорохромом мышинных антител к человеческому CD14, CD15, CD4, CD19 (все фирмы Biolegend), NKp46, CD3, CD56, CD8 (все от фирмы BD Pharmingen). Йодид пропидия (1 мкг/мл) добавляли непосредственно перед измерением на

устройстве FACSCantoII с использованием программы FACS Diva (оба от фирмы BD Bioscience) для исключения имеющих проницаемые мембраны погибших клеток. Не окрашенные (негативные) йодидом пропидия живые клетки соответствовали (дискриминационное окно) Т-клеткам ( $CD14^-CD3^+CD4^+/CD8^+$ ), В-клеткам ( $CD14^-CD19^+$ ), NK-клеткам ( $CD14^-NKp46^+/CD56^+$ ) или моноцитам/нейтрофилам ( $CD3^-CD56^-CD14^+/CD15^+$ ). Медианную флуоресценцию ФИТЦ различных типов лейкоцитов определяли в качестве индикатора связанного первичного антитела и строили график зависимости от концентрации первичного антитела с использованием программы Prism4 (программа фирмы GraphPad).

Как продемонстрировано на фиг. 40, антитело DP47GS типа IgG без мутаций в Fc-домене обладало способностью связываться только с клетками, несущими Fcγ-рецептор, например, NK-клетками и моноцитами/нейтрофилами. Отсутствие связывания DP47GS (LALA P329G) обнаружено при использовании человеческих PBMC вне зависимости от их статуса активации. Мутации LALA P329G в Fc-домене полностью элиминировали также и связывание с клетками, несущими Fcγ-рецептор.

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

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуноконъюгат, который содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, состоящий из двух субъединиц Fc-домена и эффекторный фрагмент, в котором присутствует не более одного эффекторного фрагмента.

5

2. Иммуноконъюгат по п. 1, в котором указанный эффекторный фрагмент слит с амино- или карбоксиконцевой аминокислотой одной из указанных двух субъединиц Fc-домена, необязательно через линкерный пептид.

10

3. Иммуноконъюгат по п. 1, в котором указанный первый антигенсвязывающий фрагмент слит с аминоконцевой аминокислотой одной из указанных двух субъединиц Fc домена, необязательно через линкерный пептид или шарнирную область иммуноглобулина.

15

4. Иммуноконъюгат по одному из п.п. 1-3, в котором указанный первый антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающий домен антитела.

5. Иммуноконъюгат по п. 4, в котором указанный первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу Fab.

20

6. Иммуноконъюгат по одному из п.п. 1-5, в котором указанный Fc-домен содержит модификацию, усиливающую гетеродимеризацию двух неидентичных полипептидных цепей.

25

7. Иммуноконъюгат по п. 6, в котором указанная модификация представляет собой модификацию типа «выступ-впадина», включающую модификацию, приводящую к образованию «выступа» в одной из субъединиц Fc- домена, и модификацию, приводящую к образованию «впадины» в другой одной из двух субъединиц Fc-домена.

30

8. Иммуноконъюгат по п. 7, в котором указанный эффекторный фрагмент слит с амино- или карбоксиконцевой аминокислотой субъединицы Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «выступа».

5 9. Иммуноконъюгат по одному из п.п. 1-8, в котором указанный Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG.

10. Иммуноконъюгат по одному из п.п. 1-9, в котором указанный Fc-домен создан так, чтобы он обладал измененной способностью связываться с Fc-рецептором и/или измененной эффекторной функцией.

11. Иммуноконъюгат по п. 10, в котором указанный Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор.

15 12. Иммуноконъюгат по п. 10, в котором указанная эффекторная функция представляет собой ADCC.

20 13. Иммуноконъюгат по п. 10, в которой указанная измененная способность к связыванию и/или измененная эффекторная функция представляет(ют) собой пониженную способность к связыванию и/или пониженную эффекторную функцию.

25 14. Иммуноконъюгат по п. 13, в котором указанный Fc-домен содержит одну или несколько аминокислотную(ых) мутацию(ий), которая(ые) снижает(ют) способность Fc-домена связываться с Fc-рецептором, в частности, с Fcγ-рецептором.

30 15. Иммуноконъюгат по п. 14, в котором указанная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену в положении P329.

16. Иммуноконъюгат по п. 14 или п. 15, в которой Fc-домен содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G в каждой из его субъединиц.

17. Иммуноконъюгат по п. 10, в котором указанная измененная способность к связыванию и/или измененная эффекторная функция представляет(ют) собой повышенную способность к связыванию и/или повышенную эффекторную функцию.

5

18. Иммуноконъюгат по п. 17, в котором указанный Fc домен создан так, чтобы он обладал измененной олигосахаридной структурой по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом.

10

19. Иммуноконъюгат по п. 18, в котором указанный Fc-домен имеет повышенное относительное содержание нефукозилрованных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом.

15

20. Иммуноконъюгат по одному из п.п. 1-19, где иммуноконъюгат содержит первый и второй антигенсвязывающий фрагмент.

21. Иммуноконъюгат по п. 20, в котором указанный первый и указанный второй антигенсвязывающий фрагмент и указанный Fc-домен представляют собой часть молекулы иммуноглобулина.

20

22. Иммуноконъюгат по п. 21, в котором указанная молекула иммуноглобулина представляет собой иммуноглобулин класса IgG.

25

23. Иммуноконъюгат по п. 20 или п. 21, в котором указанный эффекторный фрагмент слит с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, необязательно через линкерный пептид.

30

24. Иммуноконъюгат по одному из п.п. 1-23, в котором мишенью указанного первого антигенсвязывающего фрагмента или указанного второго антигенсвязывающего фрагмента является антиген, ассоциированный с патологическим состоянием.

25. Иммуноконъюгат по одному из п.п. 1-24, в котором мишенью  
указанного первого антигенсвязывающего фрагмента или указанного первого и  
указанного второго антигенсвязывающего фрагмента является антиген,  
выбранный из группы, включающей фибробласт-активирующий белок (FAP),  
5 A1-домен тенасцина-С (TNC A1), A2-домен тенасцина-С (TNC A2), экстра-  
домен В фибронектина (EDB), карциноэмбриональный антиген (CEA) и  
ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP).

10 26. Иммуноконъюгат по одному из п.п. 1-25, в котором указанный  
эффекторный фрагмент представляет собой одноцепочечный эффекторный  
фрагмент.

15 27. Иммуноконъюгат по одному из п.п. 1-26, в котором эффекторный  
фрагмент представляет собой цитокин.

28. Иммуноконъюгат по п. 27, в котором указанный цитокин представляет  
собой IL-2.

20 29. Иммуноконъюгат по п. 27 или п. 28, в котором указанный цитокин  
представляет собой мутантный полипептид IL-2, обладающий пониженной  
аффинностью связывания с  $\alpha$ -субъединицей IL-2-рецептора.

25 30. Иммуноконъюгат по п. 29, в котором указанный мутантный полипептид  
IL-2 содержит аминокислотную замену в одном или нескольких положениях,  
выбранных из положений, которые соответствуют остаткам 42, 45 и 72  
человеческого IL-2.

30 31. Иммуноконъюгат по п. 27, в котором указанный цитокин представляет  
собой IL-10.

32. Выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат по одному  
из п.п. 1-31 или его фрагмент.

33. Экспрессионный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по п. 32.

5 34. Клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид по п. 32 или экспрессионный вектор по п. 33.

10 35. Клетка-хозяин по п. 34, где указанную клетку-хозяина подвергали манипуляциям для экспрессии повышенных уровней одного или нескольких полипептидов, обладающих активностью  $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозамилтрансферазы III (GnTIII).

15 36. Способ получения иммуноконъюгата по одному из п.п. 1-31, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 34 или п. 35 в условиях, пригодных для экспрессии иммуноконъюгата, и необязательно выделение иммуноконъюгата.

20 37. Иммуноконъюгат, который содержит антигенсвязывающий фрагмент, Fc-домен и единичный эффекторный фрагмент, где указанный иммуноконъюгат получен способом по п. 36.

38. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноконъюгат по одному из п.п. 1-31 или п. 37 и фармацевтически приемлемый носитель.

25 39. Иммуноконъюгат по одному из п.п. 1-33 или п. 37 или фармацевтическая композиция по п. 38, предназначенный/предназначенная для применения при лечении заболевания у индивидуума, который нуждается в этом.

30 40. Иммуноконъюгат по одному из п.п. 1-33 или п. 37 или фармацевтическая композиция по п. 38, предназначенный/предназначенная для приготовления лекарственного средства для лечения заболевания у индивидуума, который нуждается в этом.



41. Способ лечения заболевания у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве композиции, которая содержит иммуноконъюгат по одному из п.п. 1-31 или п. 37 в фармацевтически приемлемой форме.

5

42. Иммуноконъюгат или фармацевтическая композиция по п. 39 или п. 40, или способ по п. 41, где указанное заболевание представляет собой рак.

10

43. Иммуноконъюгат или фармацевтическая композиция по п. 39 или п. 40, или способ по п. 41, где указанное заболевание представляет собой воспалительное нарушение.

15

44. Иммуноконъюгат, фармацевтическая композиция или способ по п. 43, где эффекторный фрагмент иммуноконъюгата представляет собой IL-10.

20

45. Конъюгат, содержащий первую молекулу Fab, которая не связывается специфически с каким-либо антигеном, состоящий из двух субъединиц Fc-домен и эффекторный фрагмент, в котором присутствует не более одного эффекторного фрагмента.

25

46. Конъюгат по п. 45, в котором указанная первая молекула Fab содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 297.

30

47. Конъюгат по п. 45 или п. 46, в котором указанный эффекторный фрагмент слит с амино- или карбоксиконцевой аминокислотой одной из указанных двух субъединиц Fc-домена, необязательно через линкерный пептид.

48. Конъюгат по п. 45 или п. 46, в котором указанная первая молекула Fab слита с аминоконцевой аминокислотой одной из указанных двух субъединиц Fc-домена, необязательно через линкерный пептид или шарнирную область иммуноглобулина.

49. Конъюгат по одному из п.п. 45-48, в котором указанный Fc-домен содержит модификацию, усиливающую гетеродимеризацию двух неидентичных цепей полипептида.

5 50. Конъюгат по п. 49, в котором указанная модификация представляет собой модификацию типа «выступ-впадина», включающую модификацию, приводящую к образованию «выступа» в одной из субъединиц Fc- домена, и модификацию, приводящую к образованию «впадины» в другой одной из двух субъединиц Fc-домена.

10 51. Конъюгат по п. 50, в котором указанный эффекторный фрагмент слит с amino- или карбоксиконцевой аминокислотой субъединицы Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию «выступа».

15 52. Конъюгат по одному из п.п. 45-51, в котором указанный Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG.

20 53. Конъюгат по одному из п.п. 45-52, в котором указанный Fc-домен создают так, чтобы он обладал измененной способностью связываться с Fc-рецептором и/или измененной эффекторной функцией.

54. Конъюгат по п. 53, в котором указанный Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор.

25 55. Конъюгат по п. 53, в котором указанная эффекторная функция представляет собой ADCC.

30 56. Конъюгат по п. 53, в которой указанные измененная способность к связыванию и/или измененная эффекторная функция представляет(ют) собой пониженную способность к связыванию и/или пониженную эффекторную функцию.

57. Конъюгат по п. 56, в котором указанный Fc-домен содержит одну или несколько аминокислотную(ых) мутацию(ий), которая(ые) снижает(ют) способность Fc-домена связываться с Fc-рецептором, в частности, Fcγ-рецептором.

5

58. Конъюгат по п. 57, в котором указанная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену в положении P329.

10

59. Конъюгат по п. 57 или п. 58, в которой Fc-домен содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G в каждой из его субъединиц.

15

60. Конъюгат по п. 53, в котором указанная измененная способность к связыванию и/или измененная эффекторная функция представляет(ют) собой повышенную способность к связыванию и/или повышенную эффекторную функцию.

20

61. Конъюгат по п. 60, в котором указанный Fc домен создан так, чтобы он обладал измененной олигосахаридной структурой по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом.

25

62. Конъюгат по п. 61, в котором указанный Fc-домен имеет повышенное относительное содержание нефукозилрованных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом.

30

63. Конъюгат по одному из п.п. 45-62, где конъюгат содержит первую и вторую молекулу Fab.

64. Конъюгат по п. 63, в котором указанная первая молекула Fab содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 297.

65. Конъюгат по п. 64, в котором указанная первая и указанная вторая молекула Fab и указанный Fc-домен представляют собой часть молекулы иммуноглобулина.

5            66. Конъюгат по п. 65, в котором указанная молекула иммуноглобулина представляет собой иммуноглобулин класса IgG.

10           67. Конъюгат по п. 65 или п. 66, в котором указанный эффекторный фрагмент слит с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, необязательно через линкерный пептид.

68. Конъюгат по одному из п.п. 45-67, в котором указанный эффекторный фрагмент представляет собой одноцепочечный эффекторный фрагмент.

15           69. Конъюгат по одному из п.п. 45-68, в котором эффекторный фрагмент представляет собой цитокин.

70. Конъюгат по п. 69, в котором указанный цитокин представляет собой IL-2.

20           71. Конъюгат по п. 69 или п. 70, в котором указанный цитокин представляет собой мутантный полипептид IL-2, обладающий пониженной аффинностью связывания с  $\alpha$ -субъединицей IL-2-рецептора.

25           72. Иммуноконъюгат по п. 71, в котором указанный мутантный полипептид IL-2 содержит аминокислотную замену в одном или нескольких положениях, выбранных из положений, которые соответствуют остаткам 42, 45 и 72 человеческого IL-2.

30           73. Выделенный полинуклеотид, кодирующий конъюгат по одному из п.п. 45-72 или его фрагмент.

74. Экспрессионный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по п. 73.

5 75. Клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид по п. 73 или экспрессионный вектор по п. 74.

10 76. Способ получения конъюгата по одному из п.п. 45-72, включающие культивирование клетки-хозяина по п. 75 в условиях, пригодных для экспрессии конъюгата, и необязательно выделение конъюгат.

15 77. Конъюгат, который содержит Fab-фрагмент, не обладающий способностью специфически связываться ни с каким антигеном, Fc-домен и единичный эффекторный фрагмент, где указанный иммуноконъюгат получен способом по п. 76.

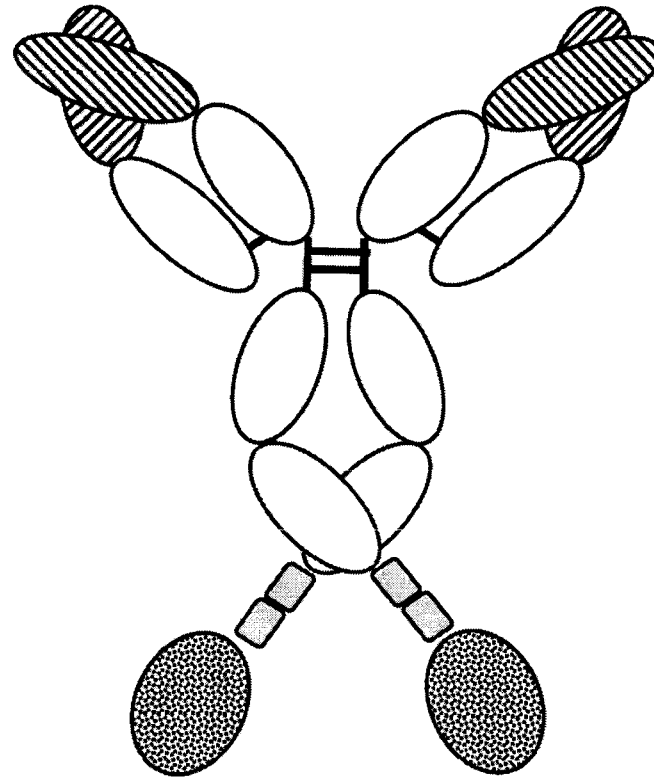
78. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по одному из п.п. 45-72 или п. 77 и фармацевтически приемлемый носитель.

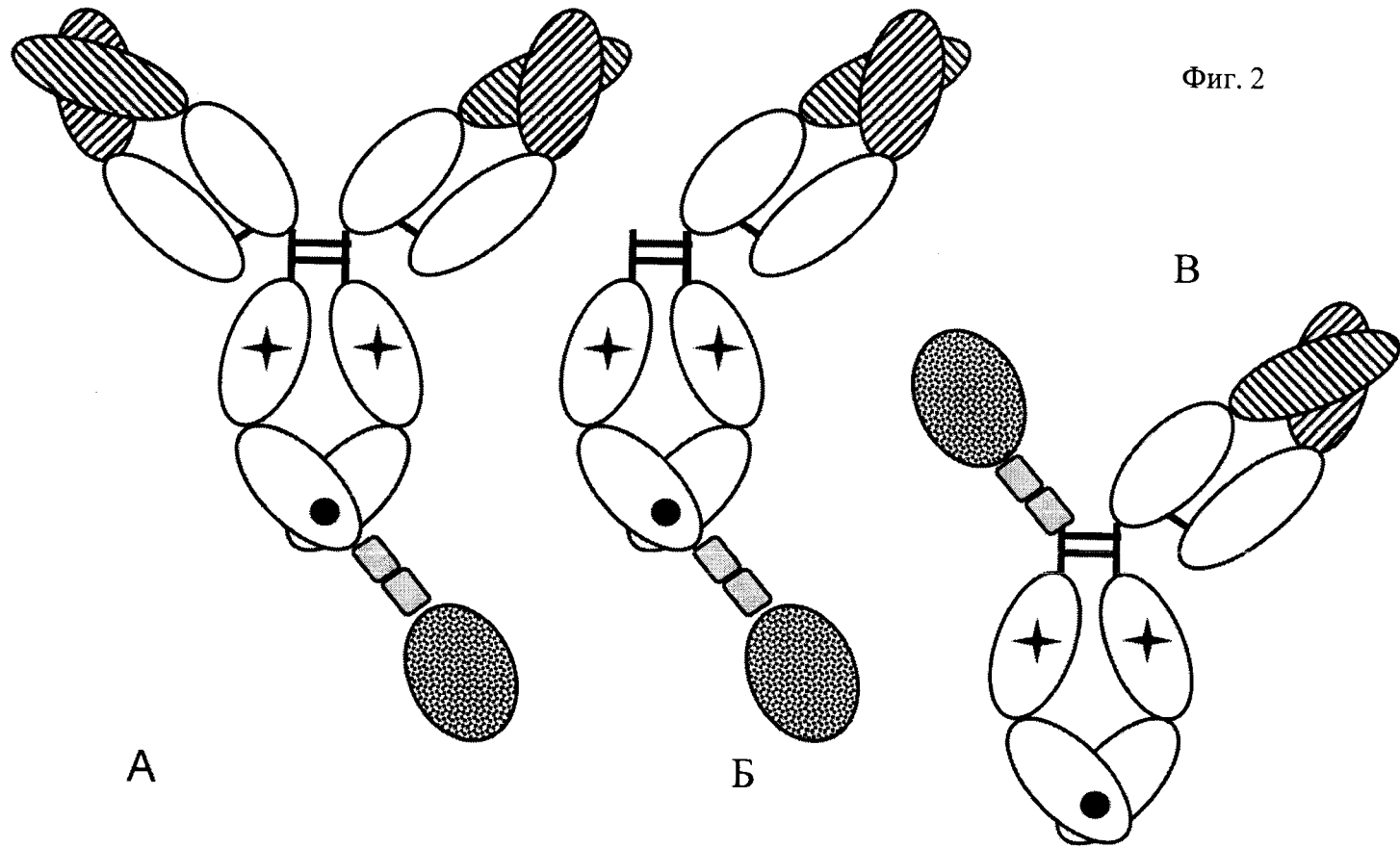
20 79. Конъюгат по одному из п.п. 45-72 или п. 77 или фармацевтическая композиция по п. 78, предназначенный/предназначенная для применения при лечении заболевания у индивидуума, который нуждается в этом.

25 80. Конъюгат по одному из п.п. 45-72 или п. 77 или фармацевтическая композиция по п. 78, предназначенный/предназначенная для приготовления лекарственного средства для лечения заболевания у индивидуума, который нуждается в этом.

30 81. Способ лечения заболевания у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве композиции, которая содержит конъюгат по одному из п.п. 45-72 или п. 77 в фармацевтически приемлемой форме.

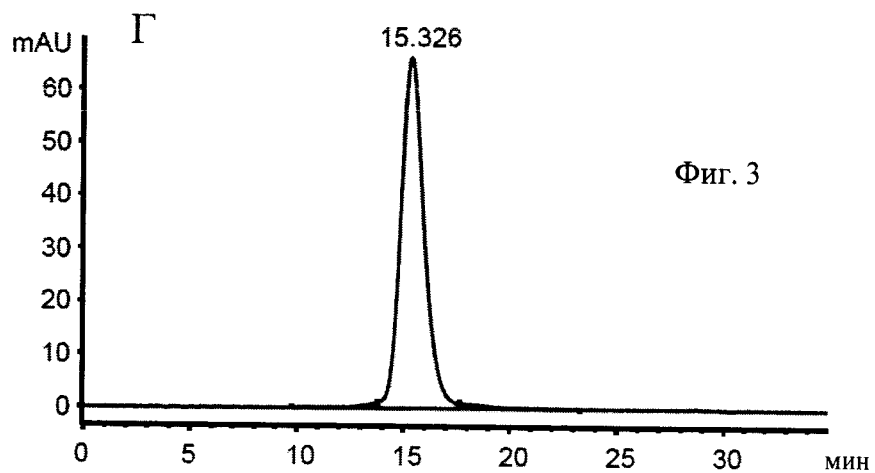
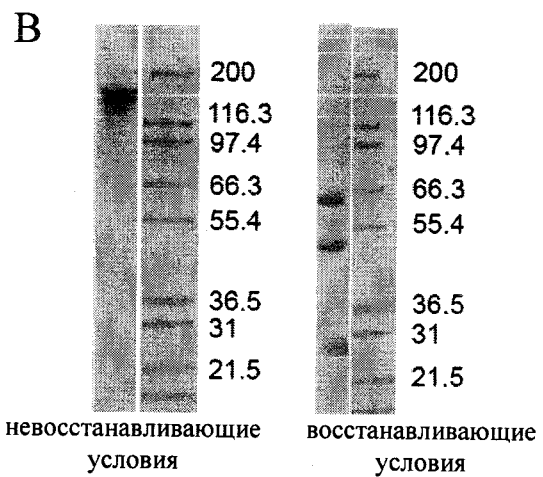
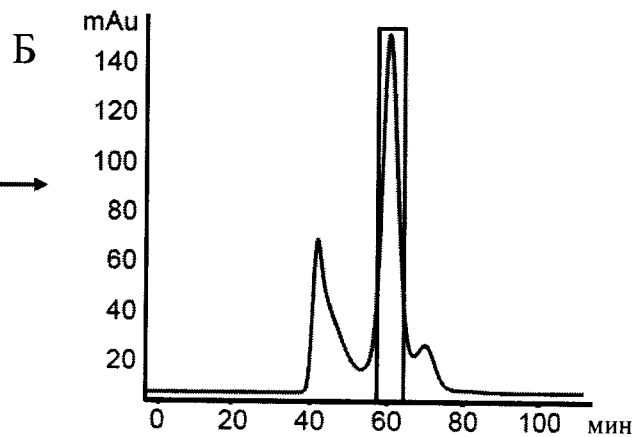
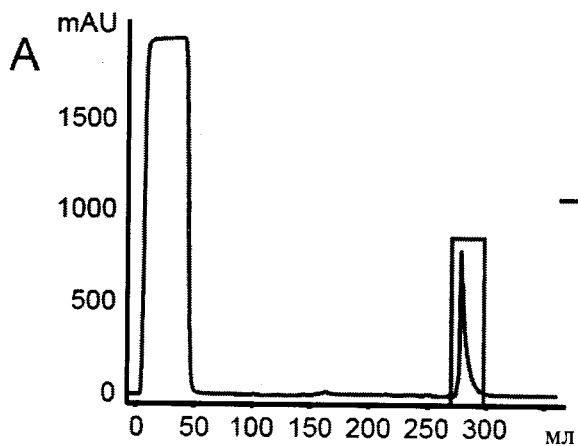
Фиг. 1





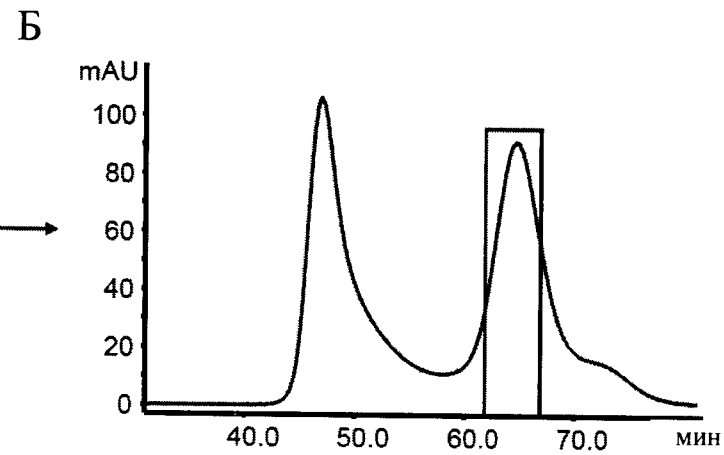
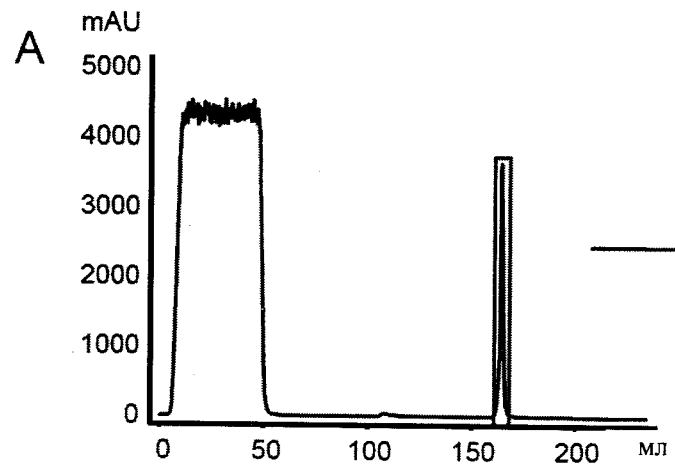
Фиг. 2

2/42

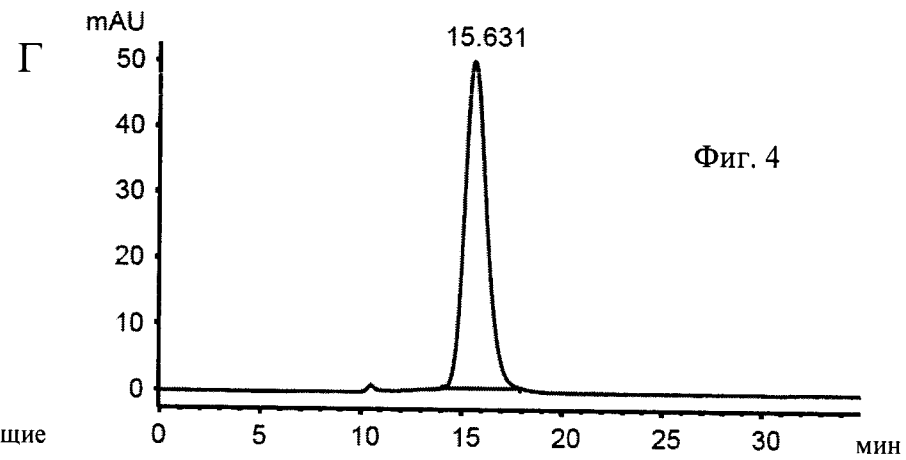
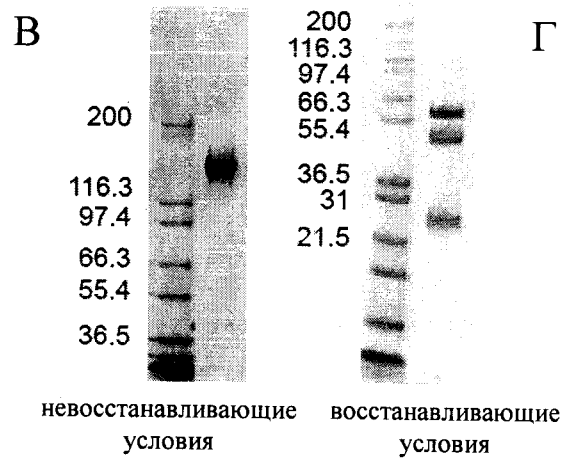


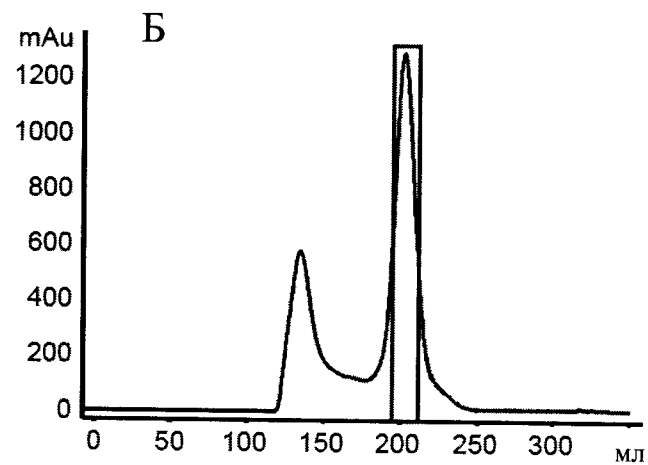
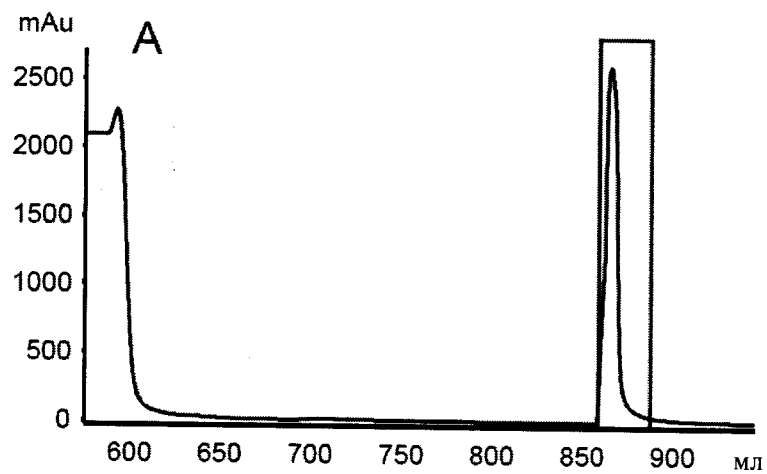
Фиг. 3



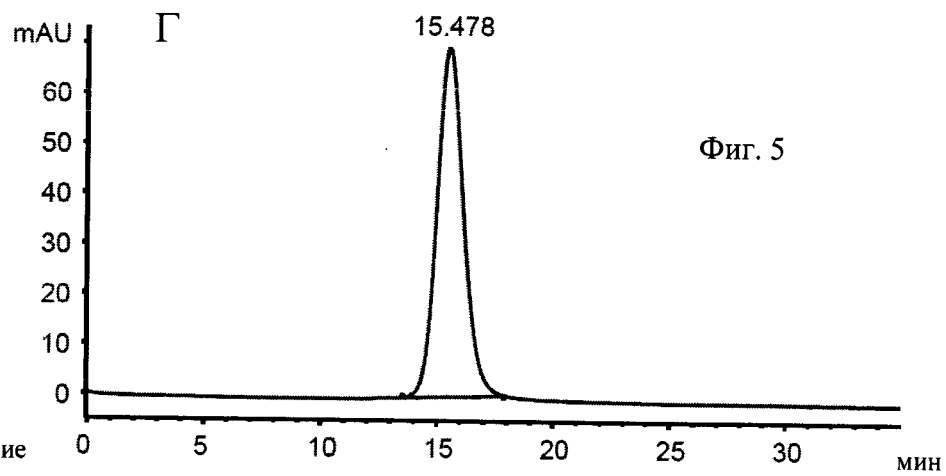
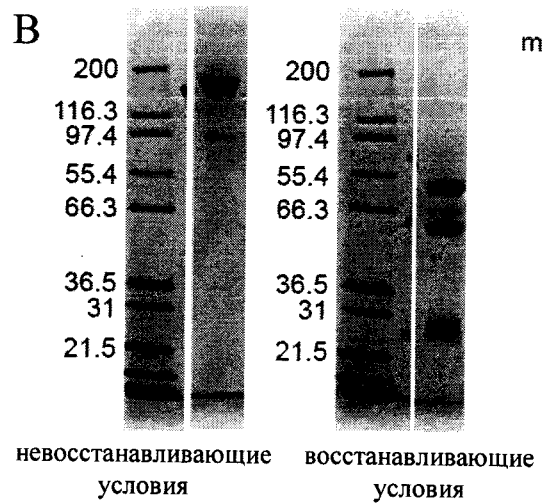


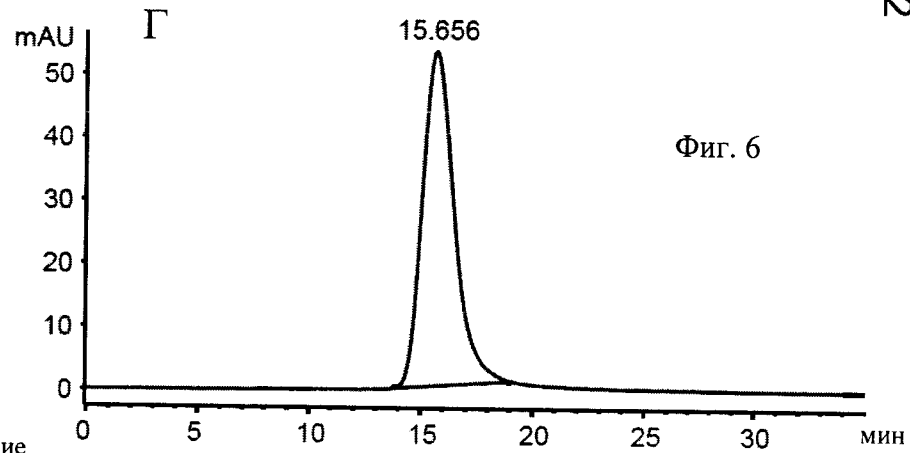
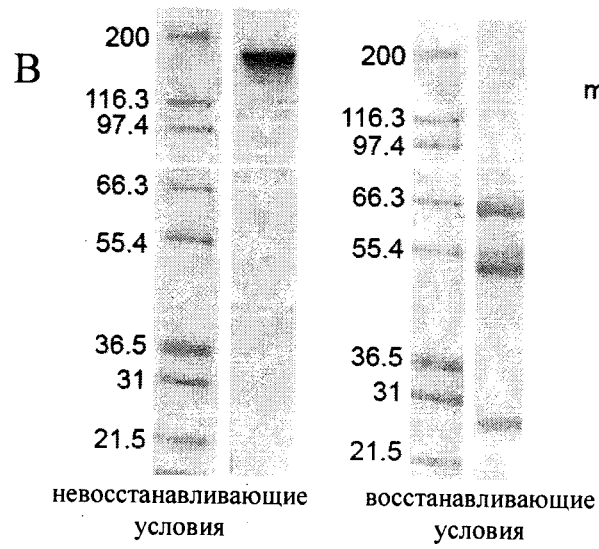
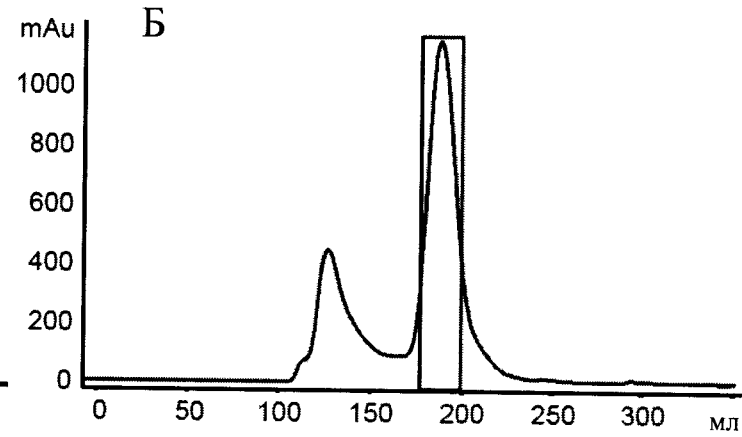
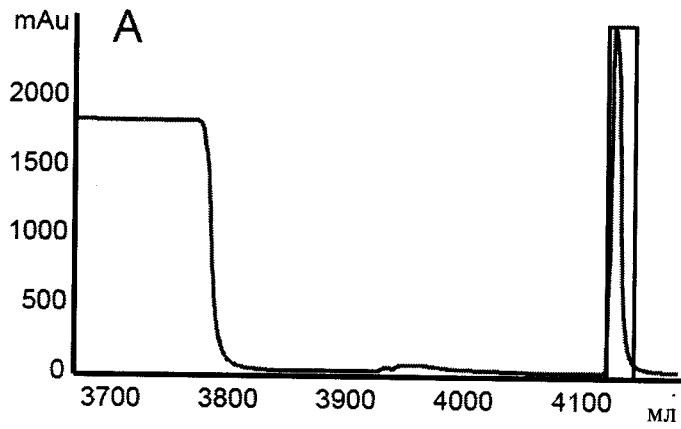
4/42





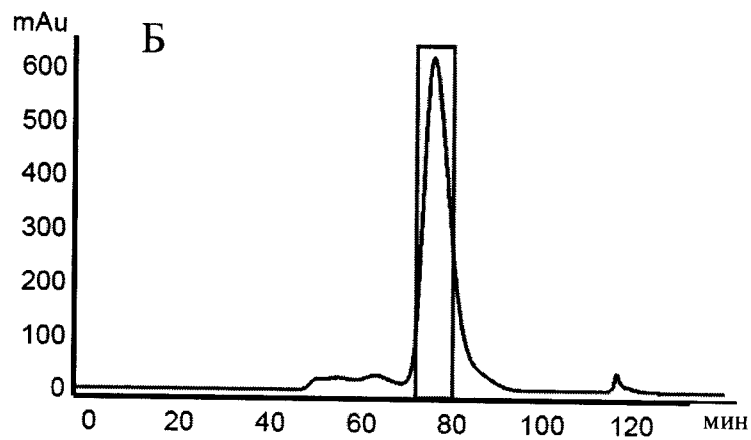
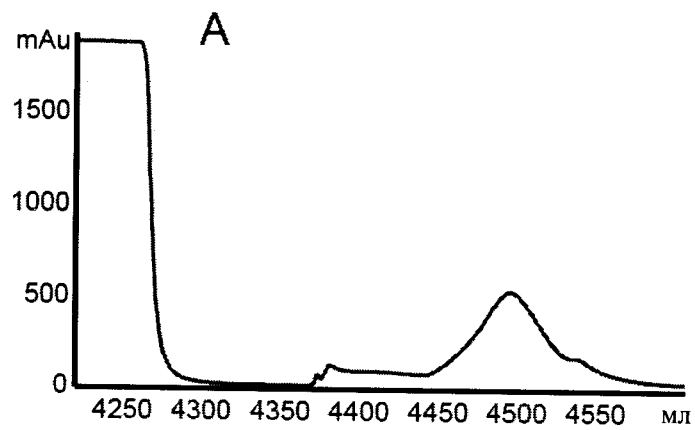
5/42



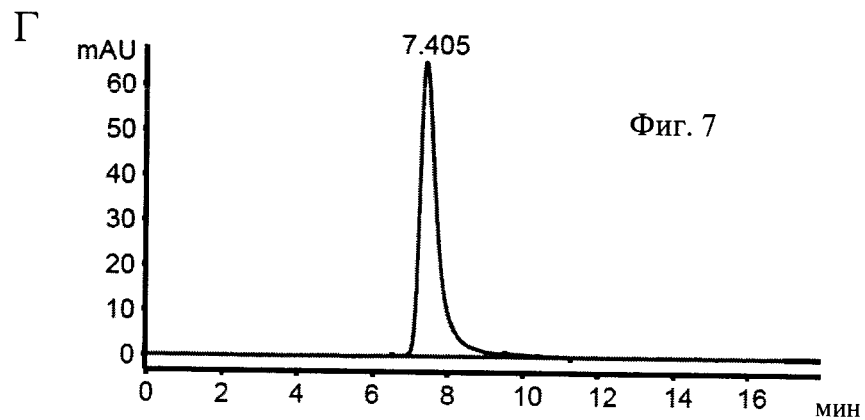
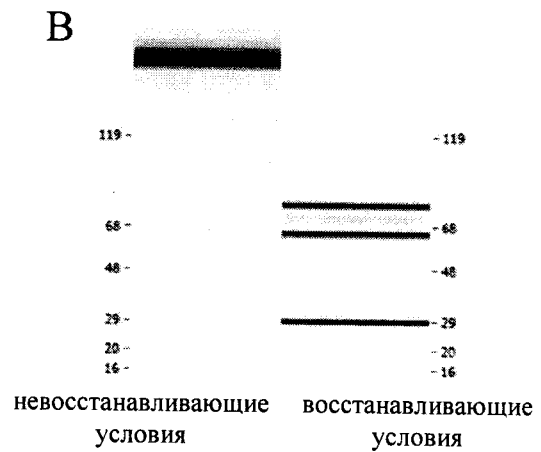


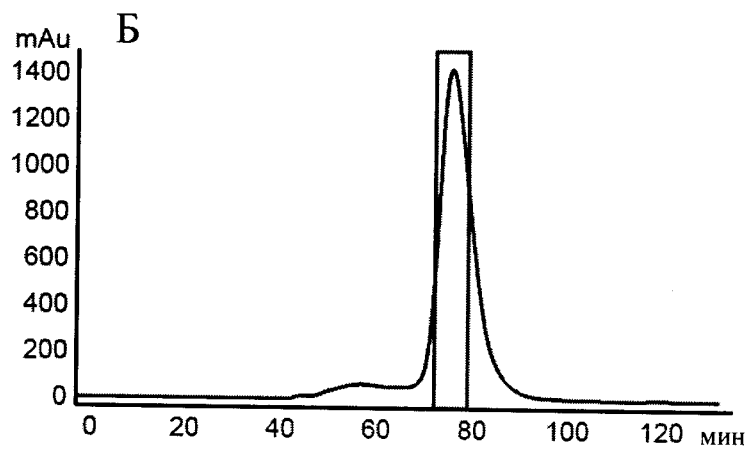
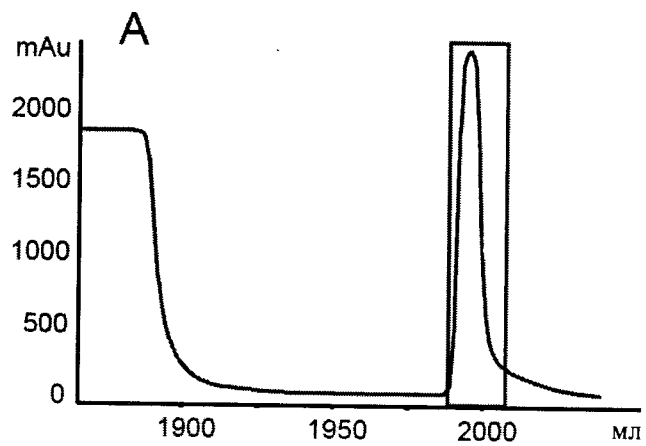
Фиг. 6

6/42

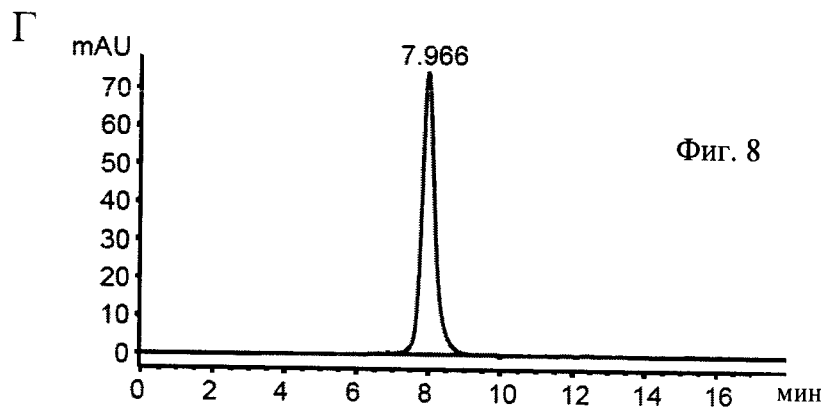
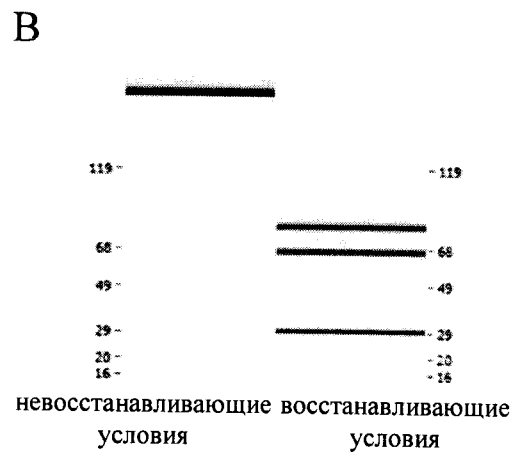


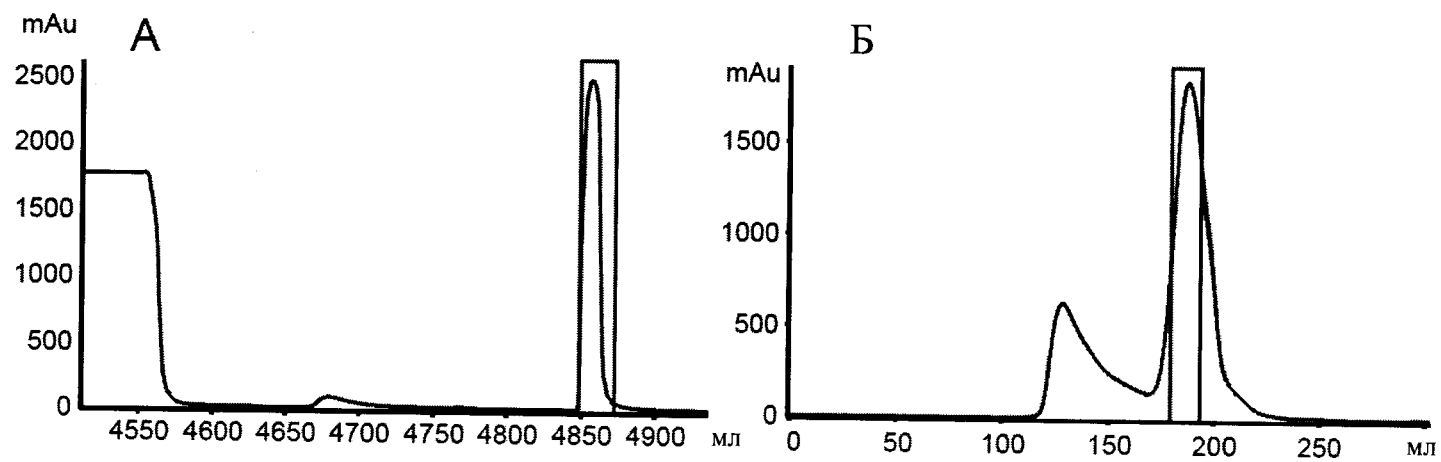
7/42



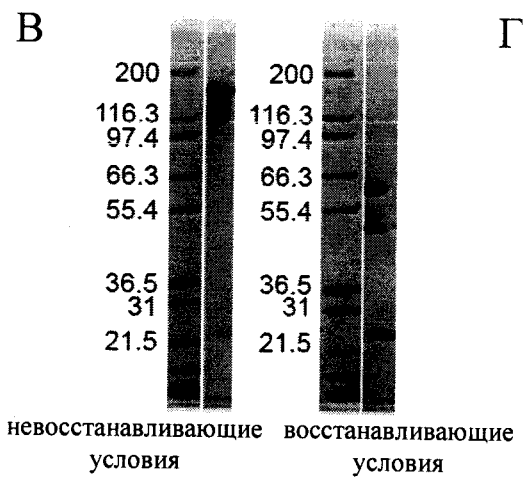


8/42



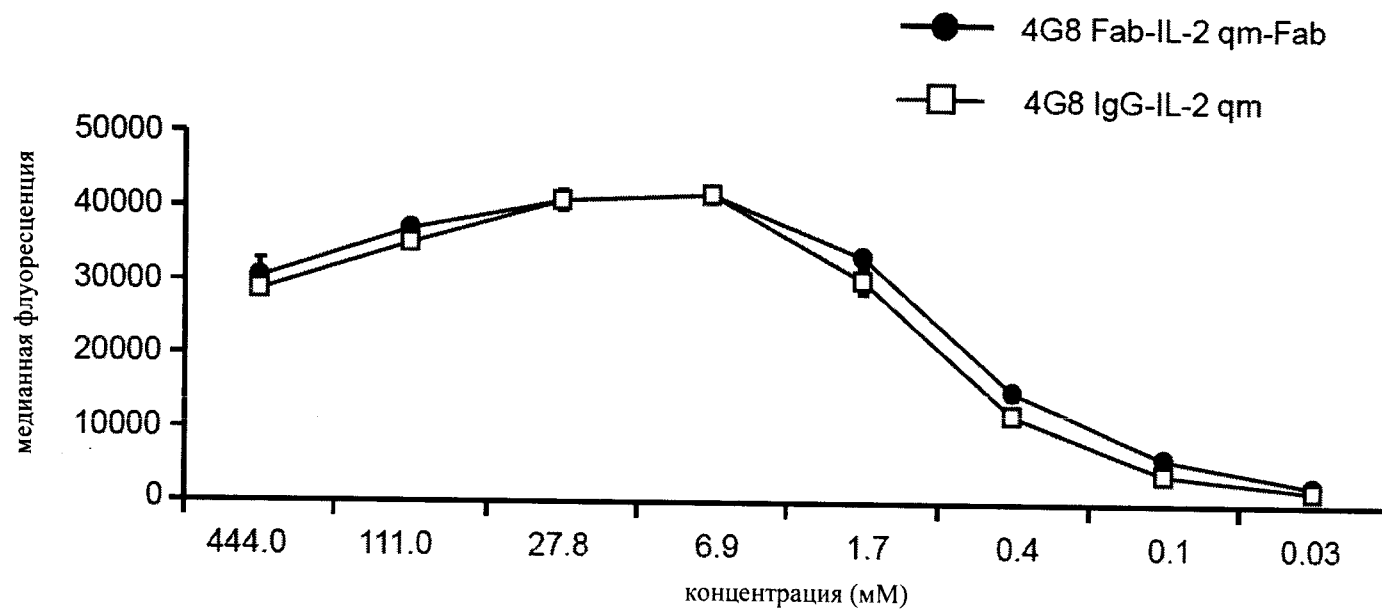


9/42



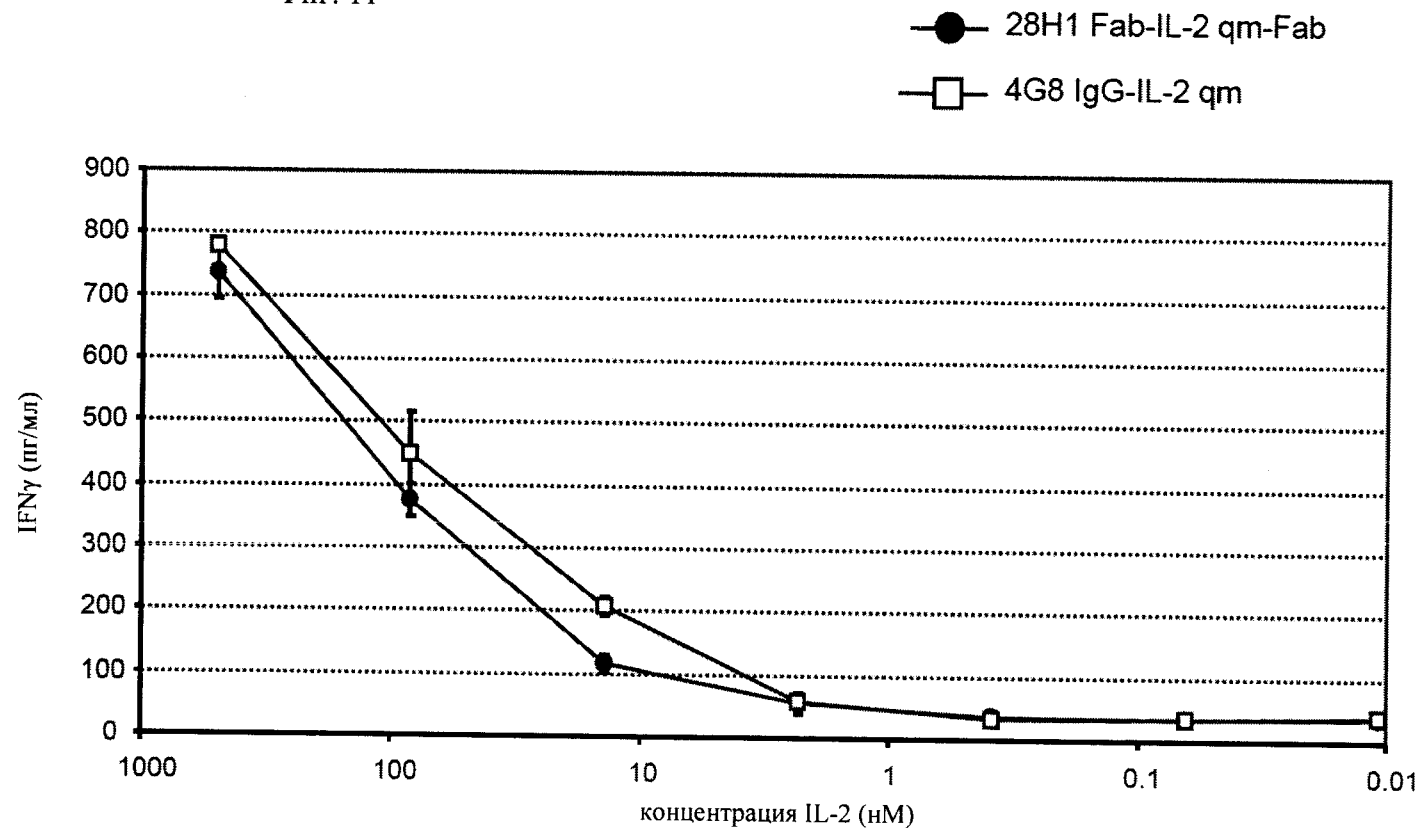
Фиг. 9

Фиг. 10



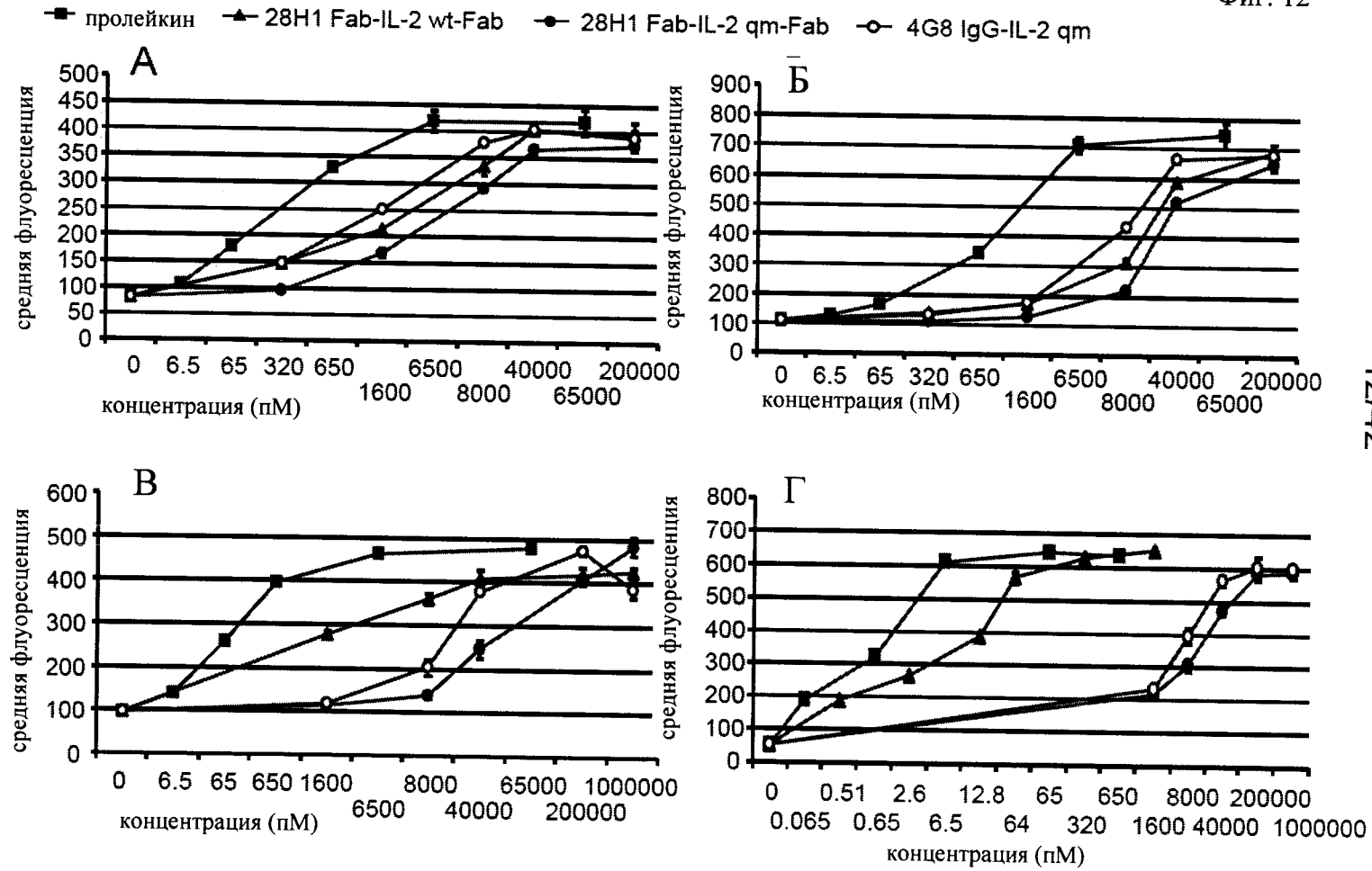
10/42

Фиг. 11



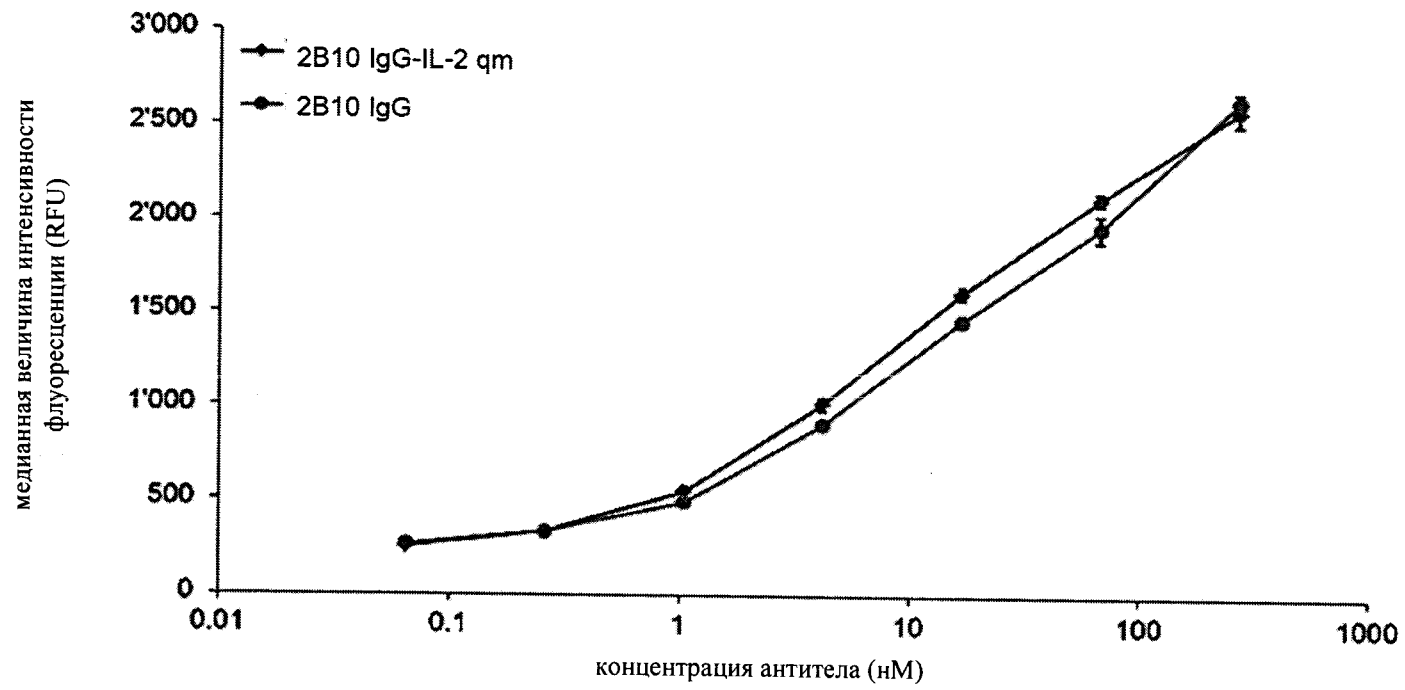


Фиг. 12

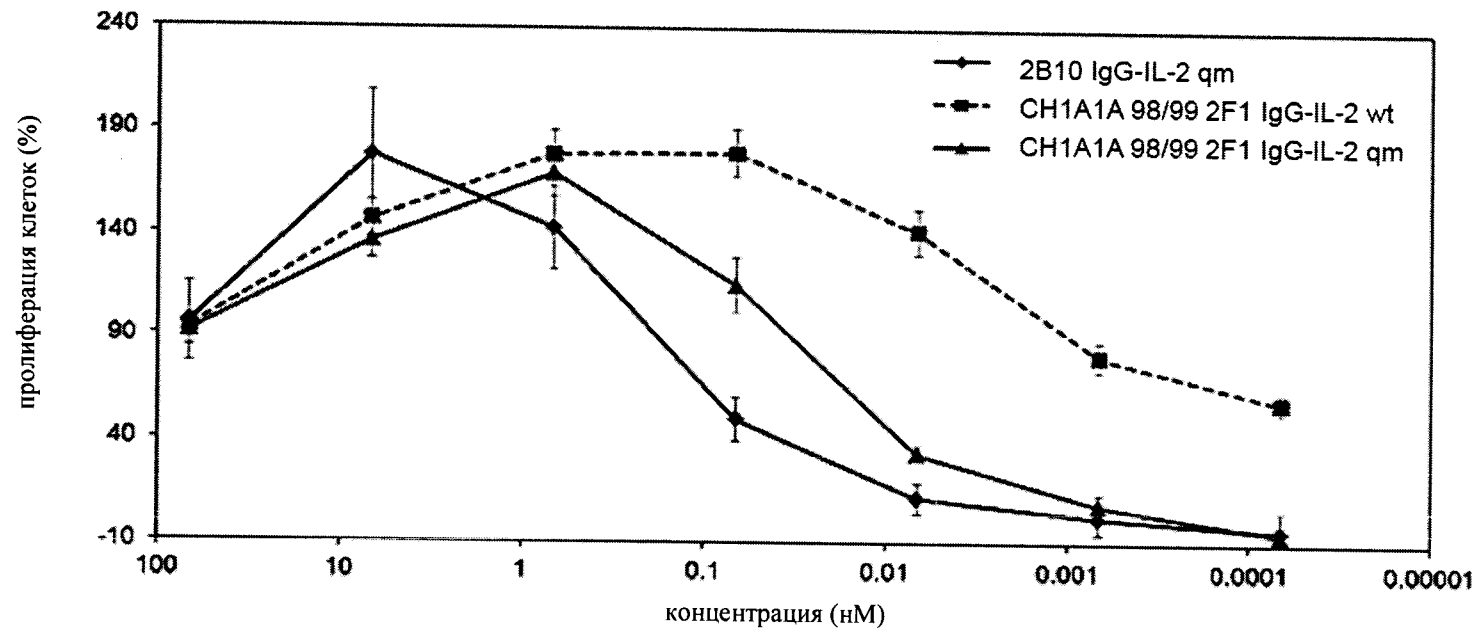


12/42

Фиг. 13

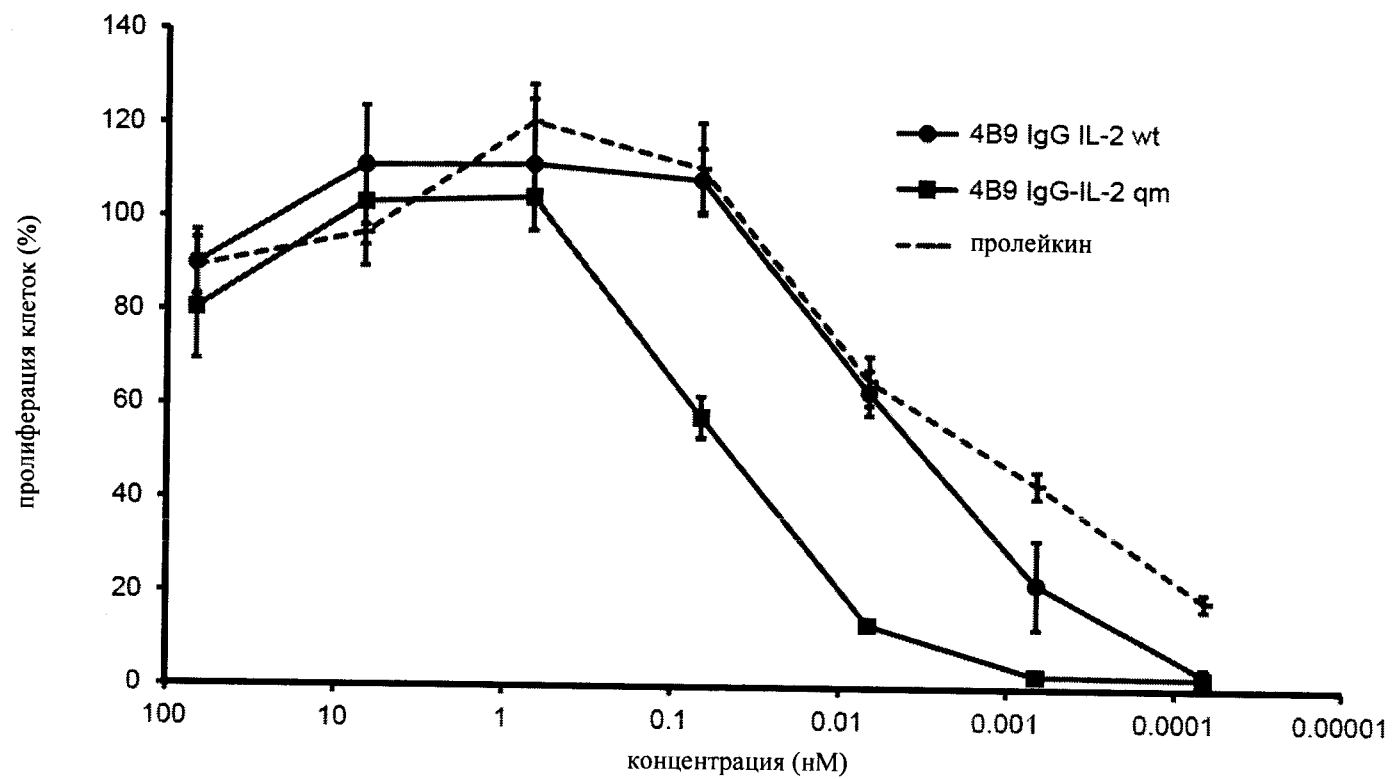


13/42

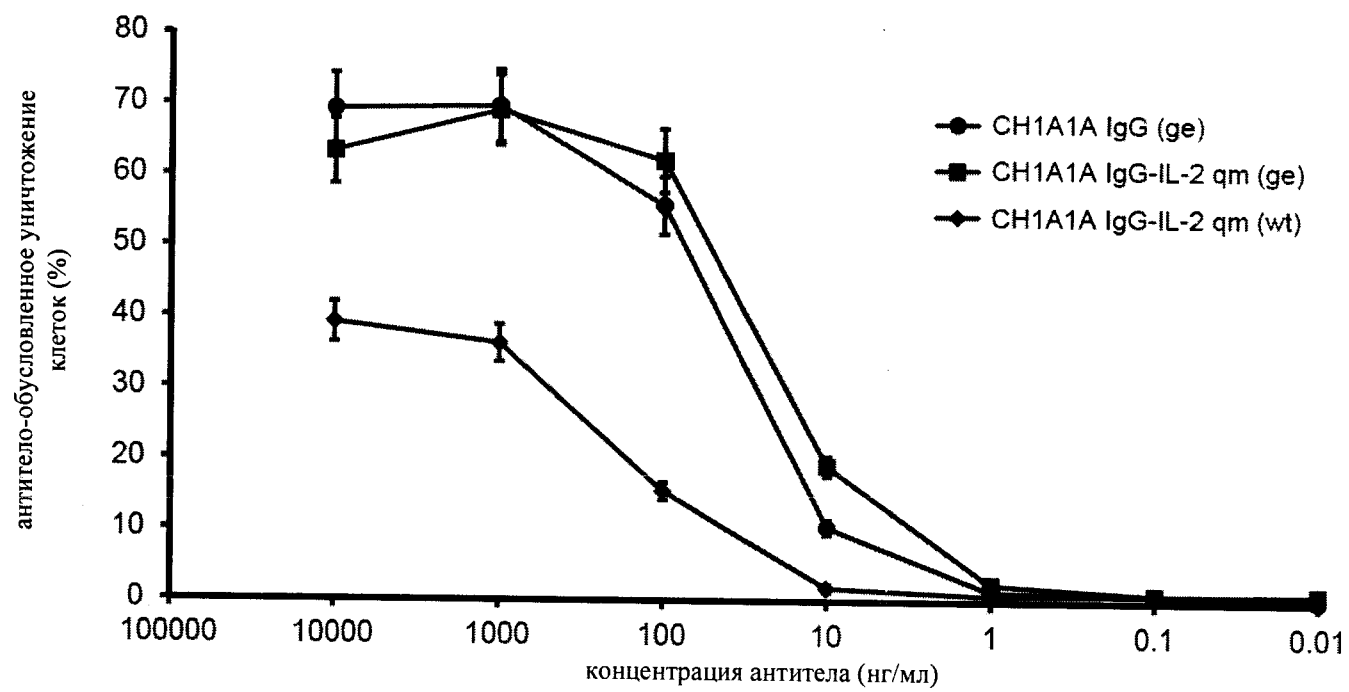


14/42

Фиг. 14

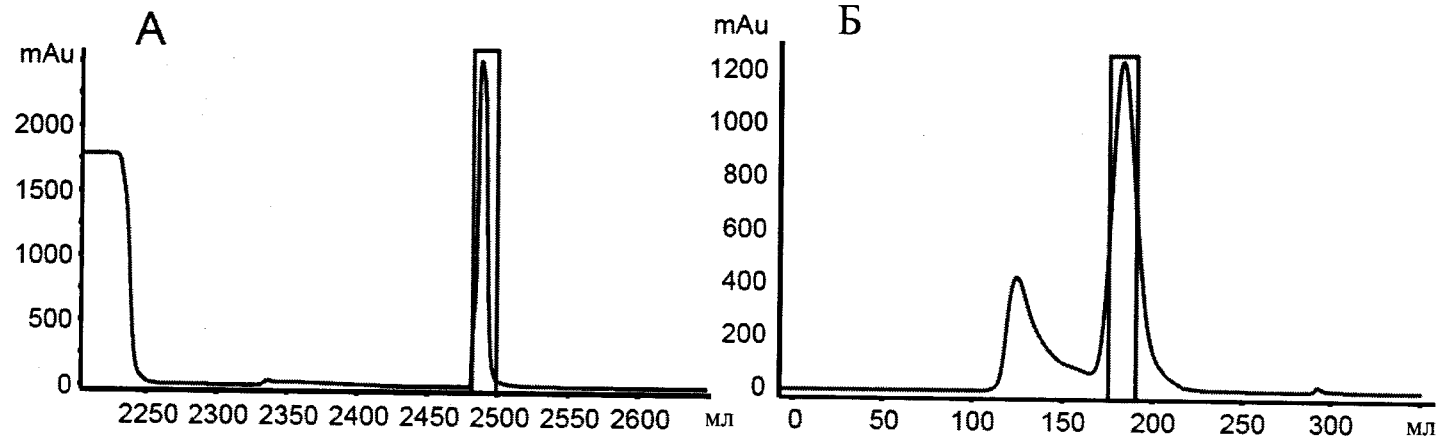


Фиг. 15

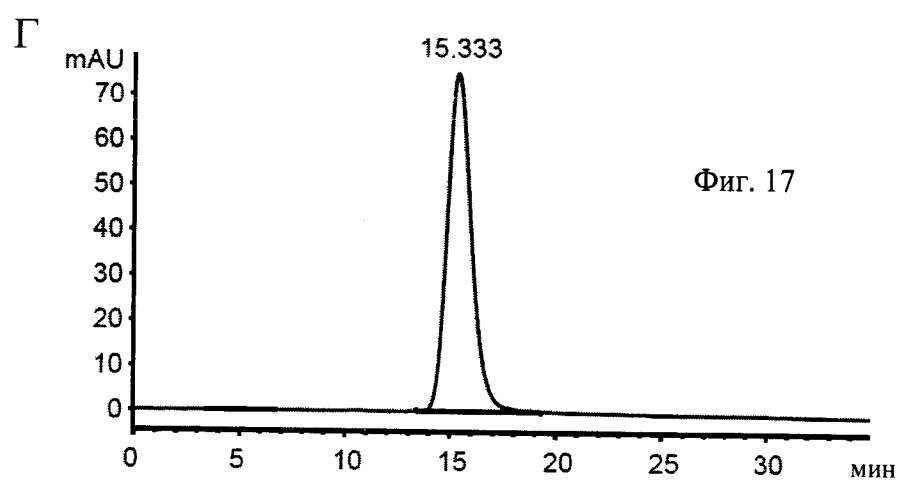
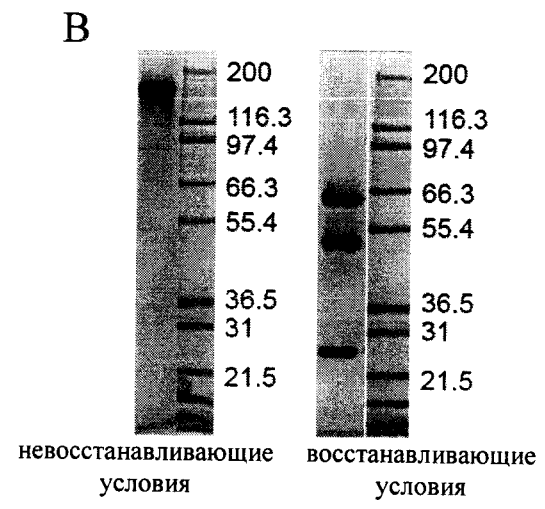


16/42

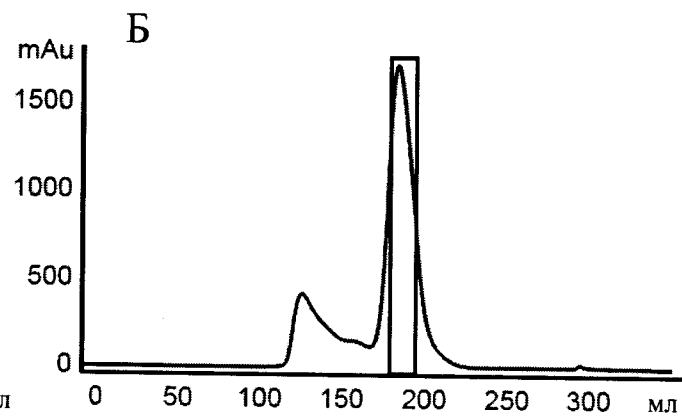
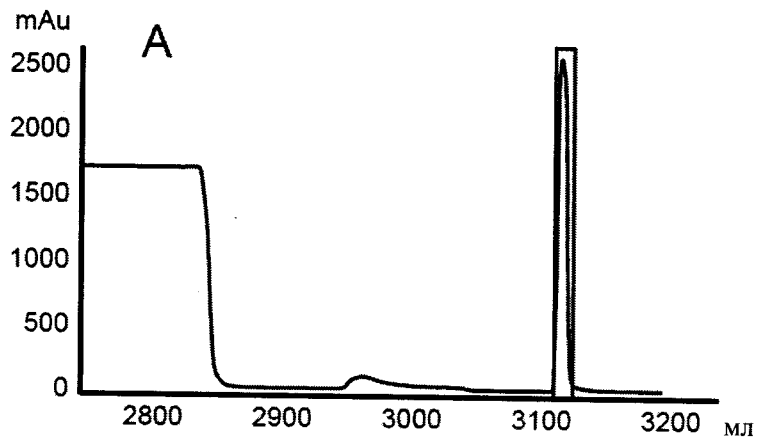
Фиг. 16



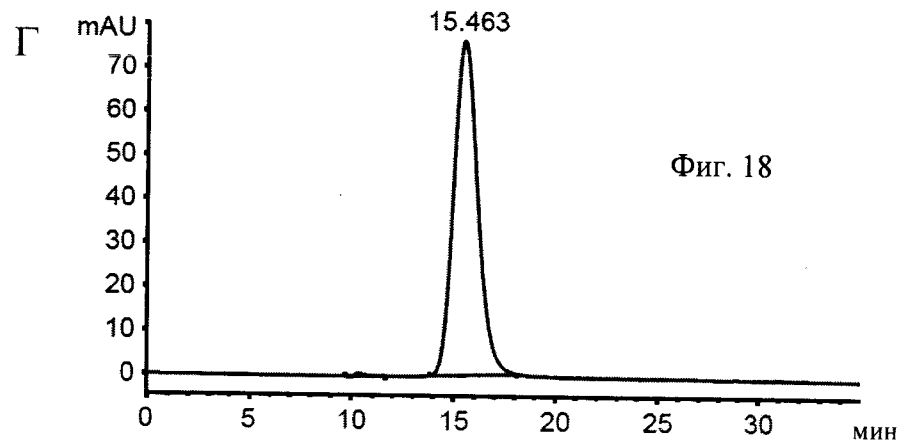
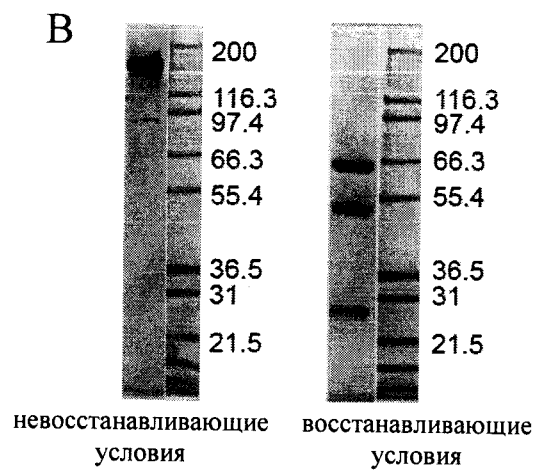
17/42

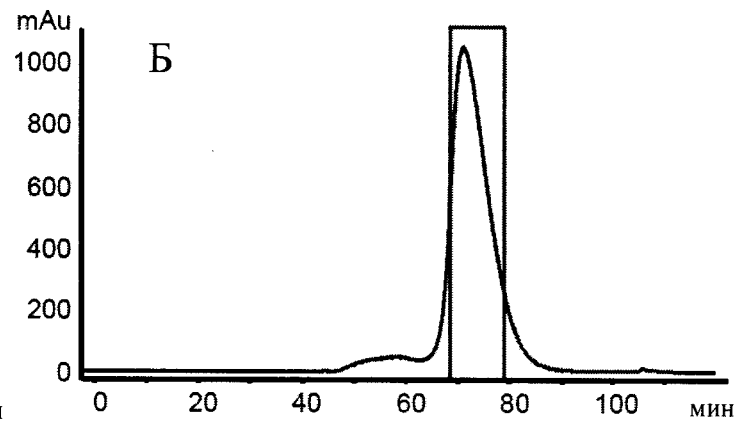
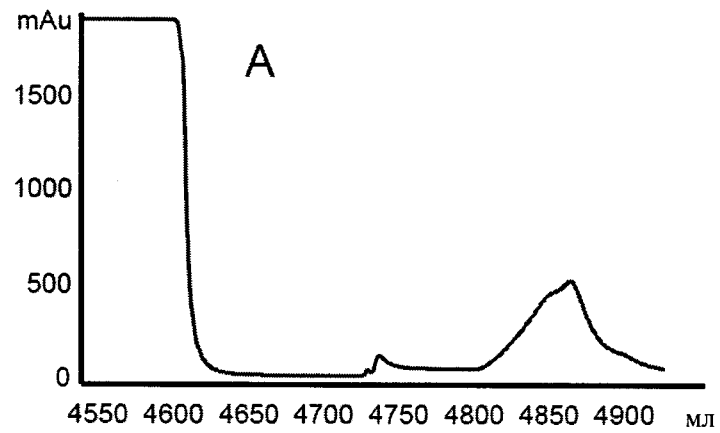


Фиг. 17

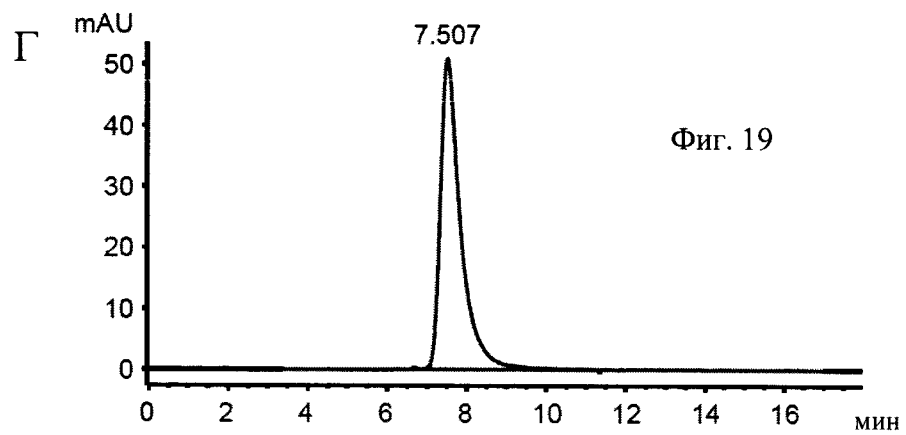
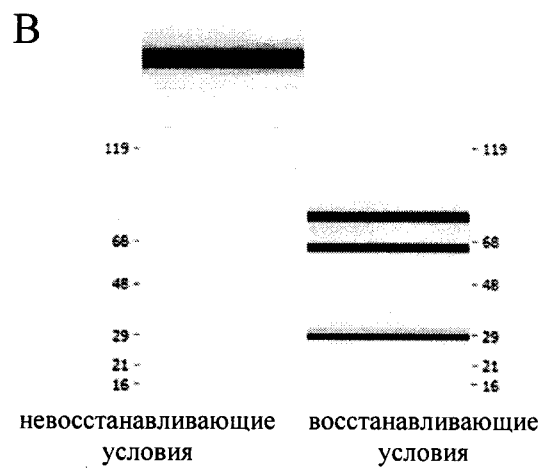


18/42



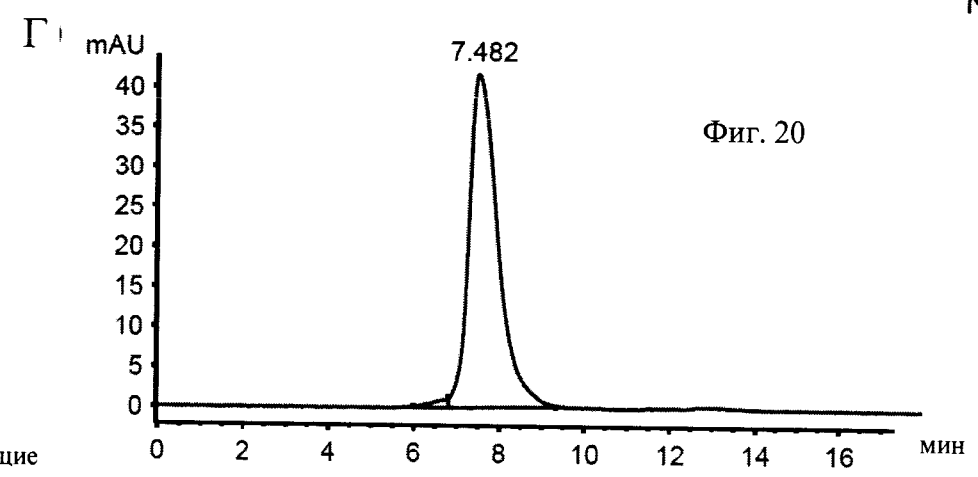
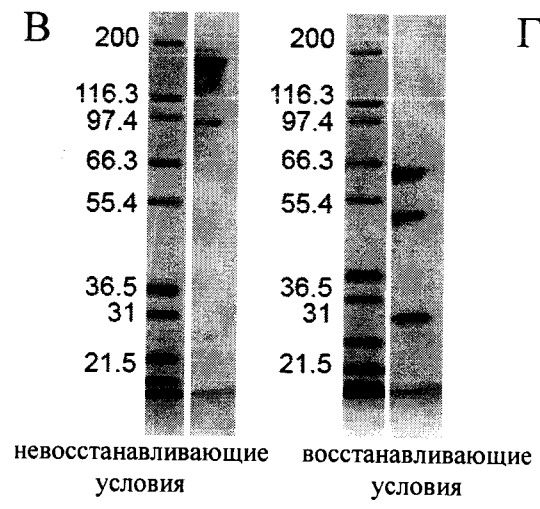
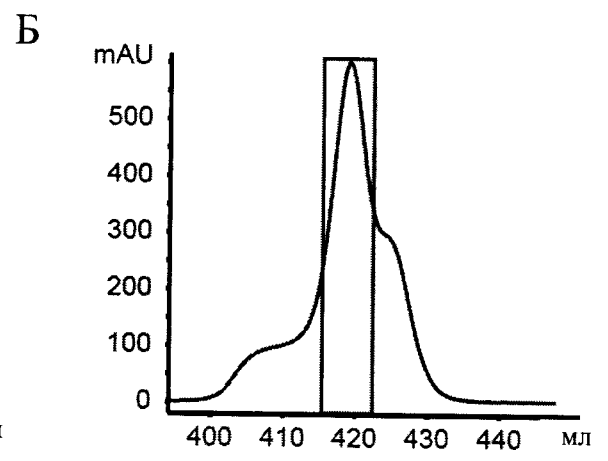
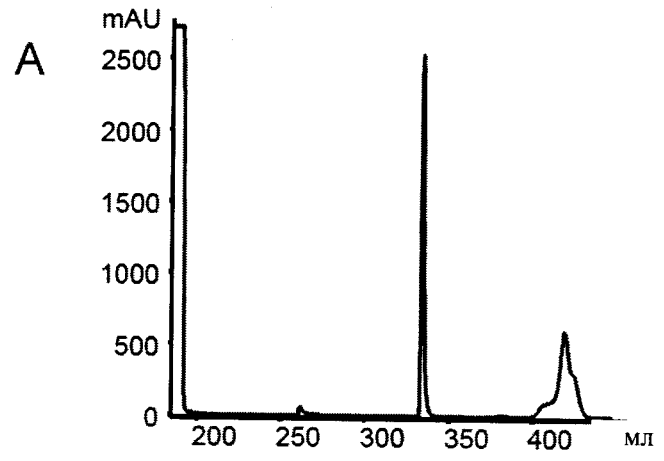


19/42



Фиг. 19

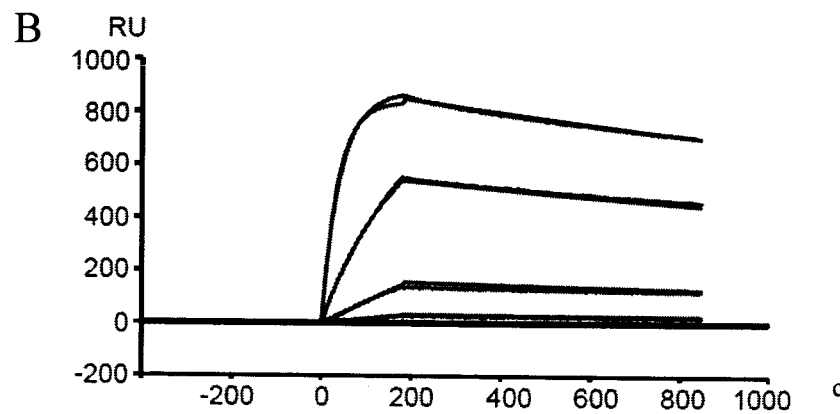
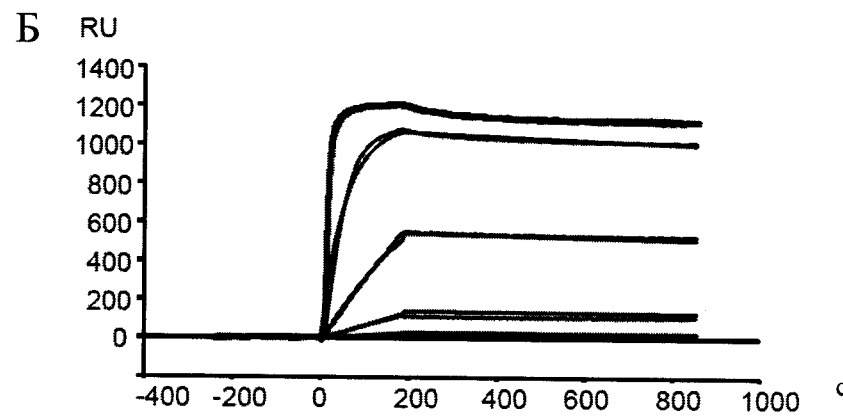
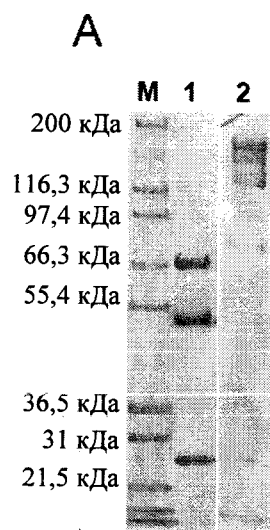




Фиг. 20

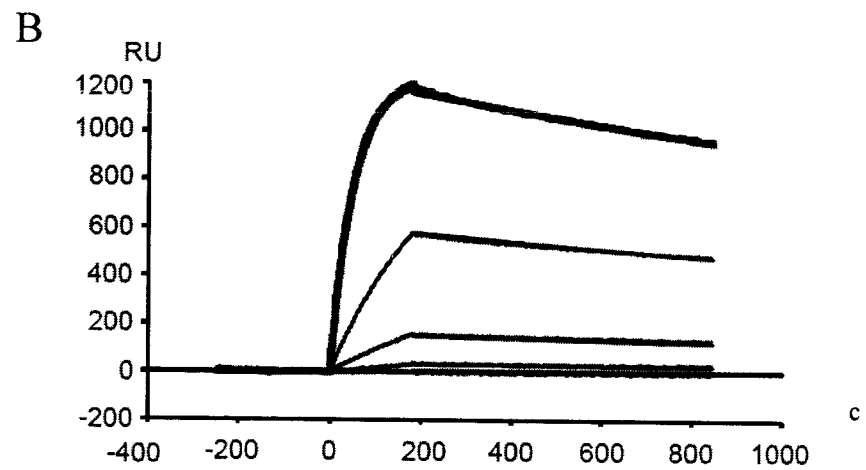
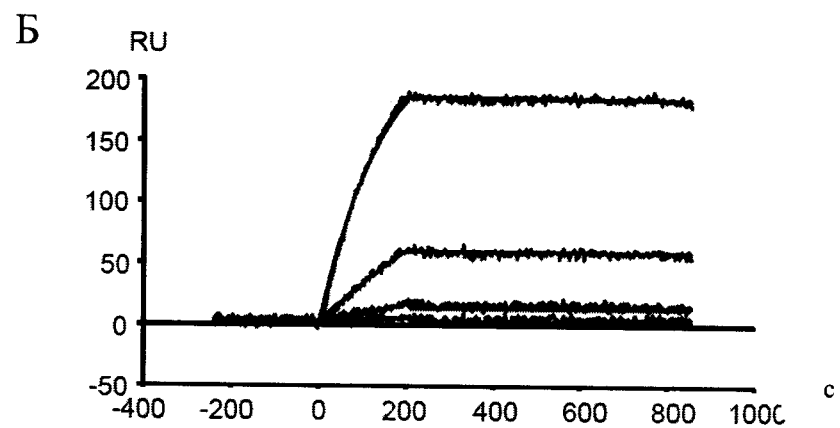
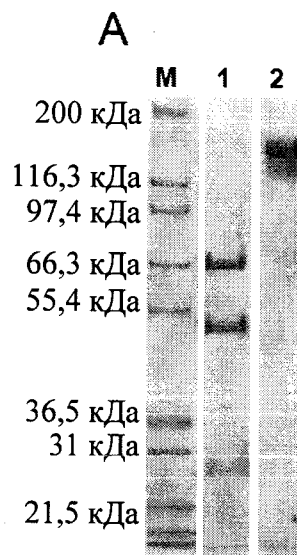
20/42

Фиг. 21

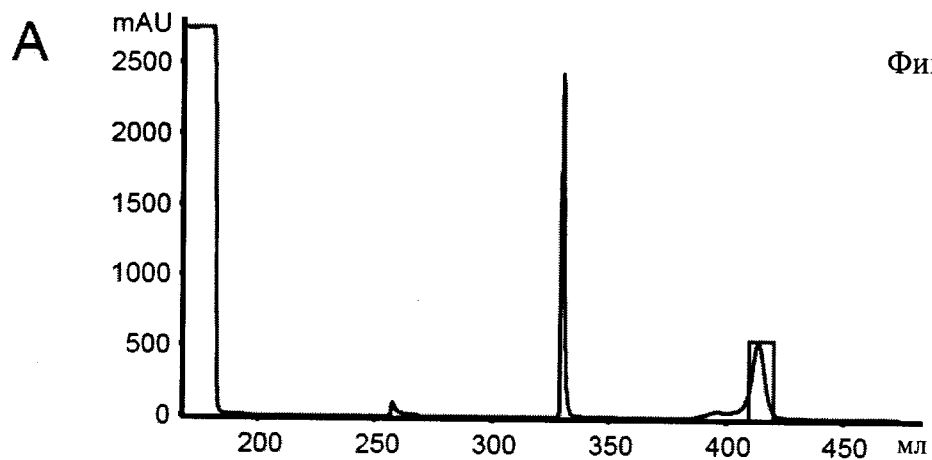


21/42

Фиг. 22

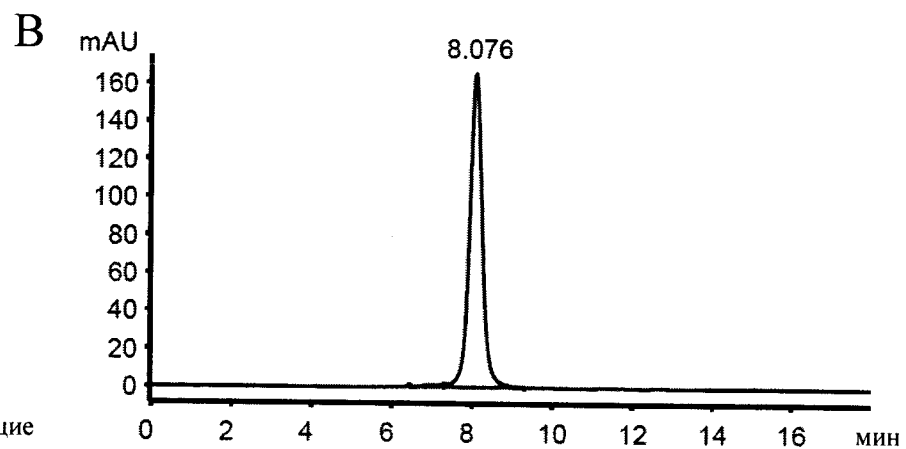
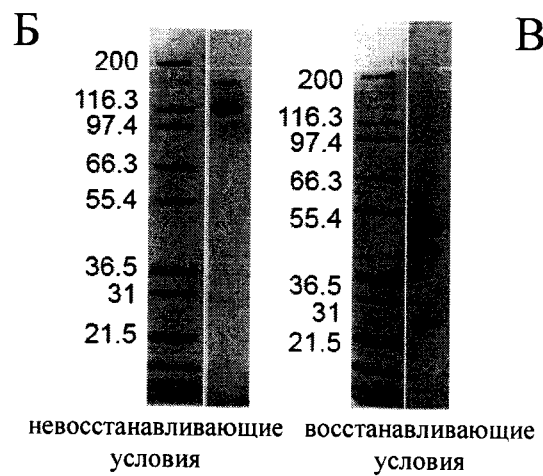


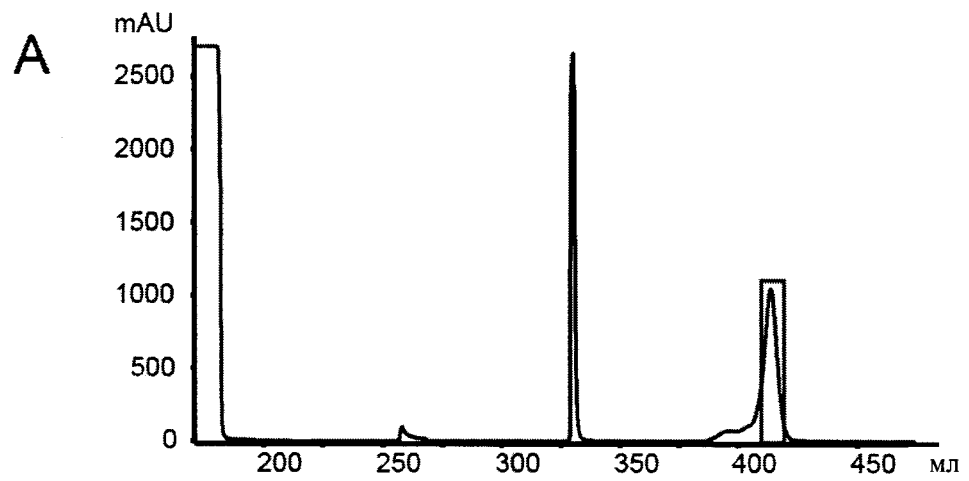
22/42



Фиг. 23

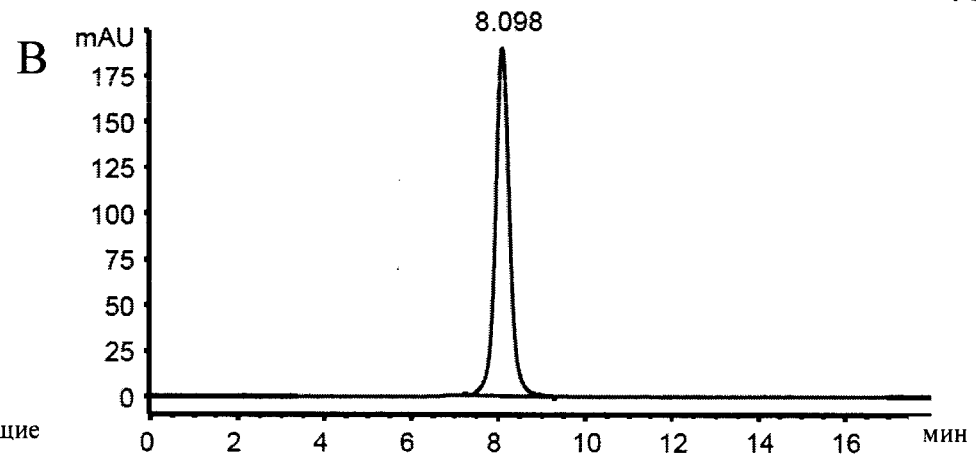
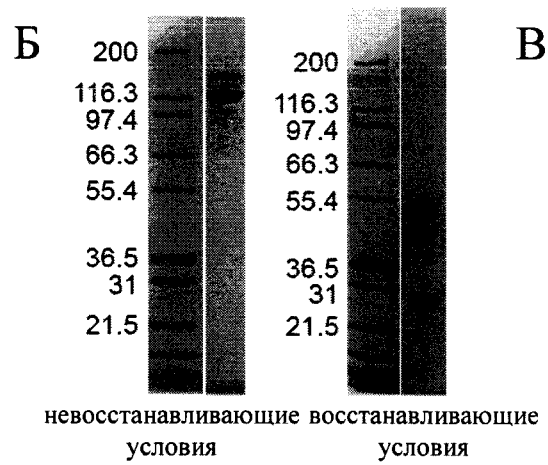
23/42

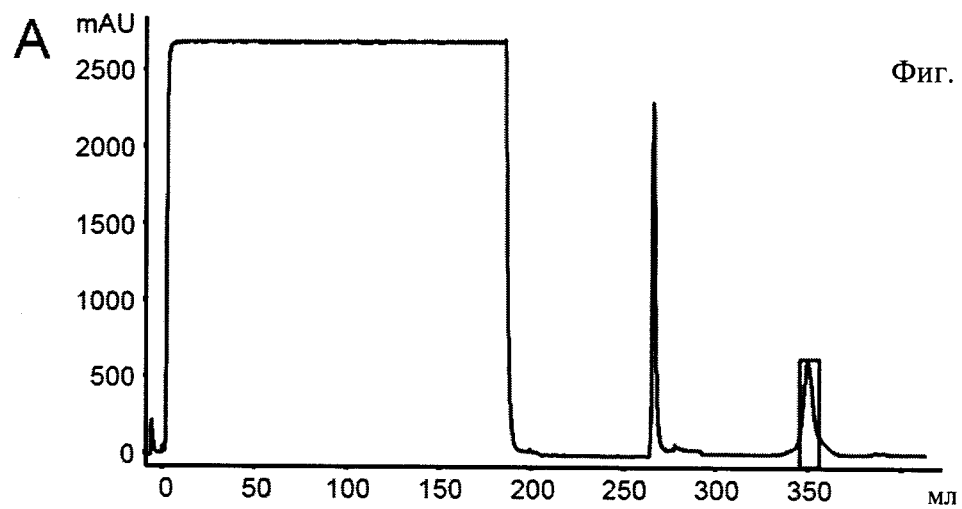




Фиг. 24

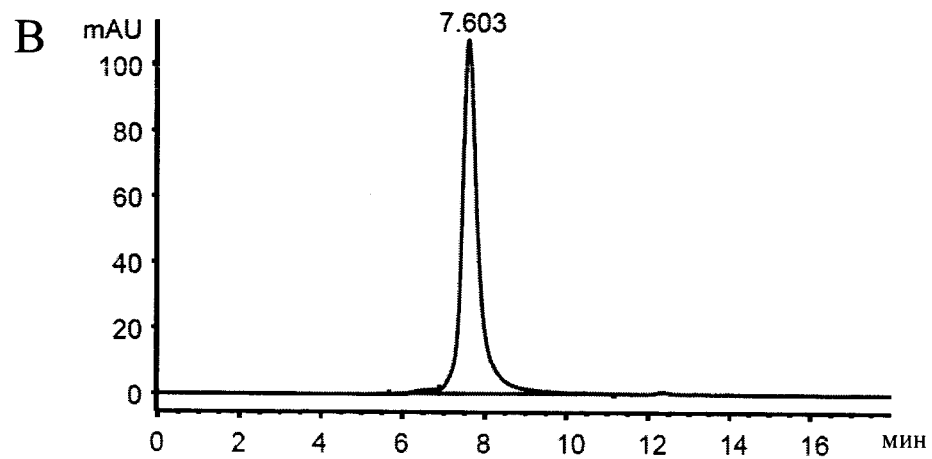
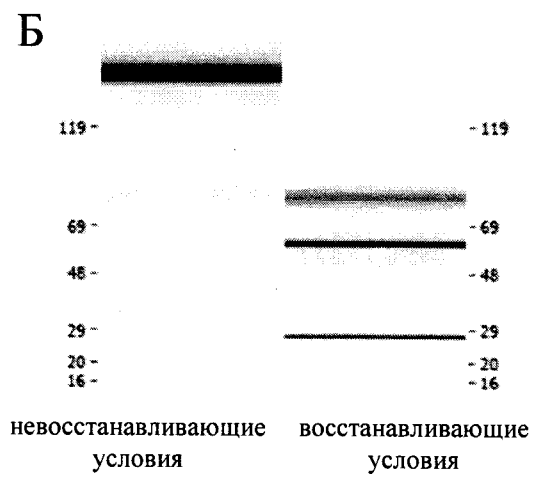
24/42

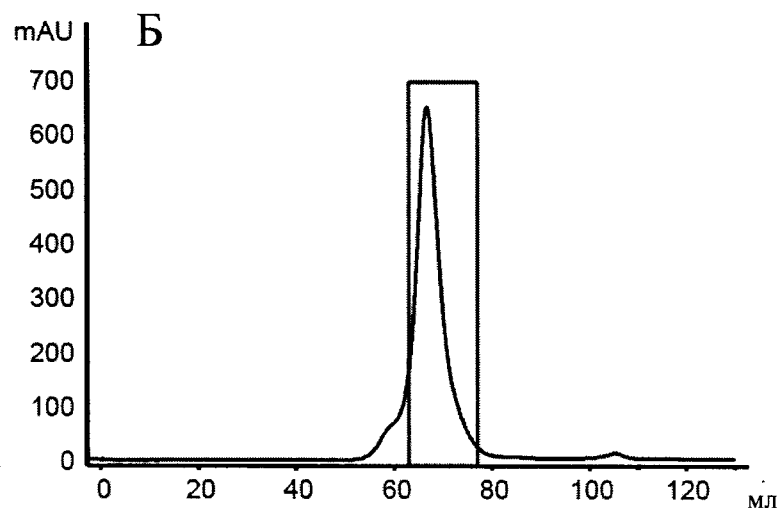
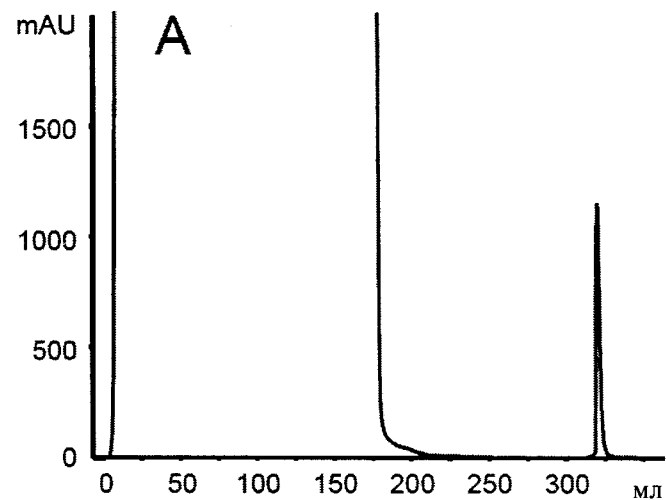




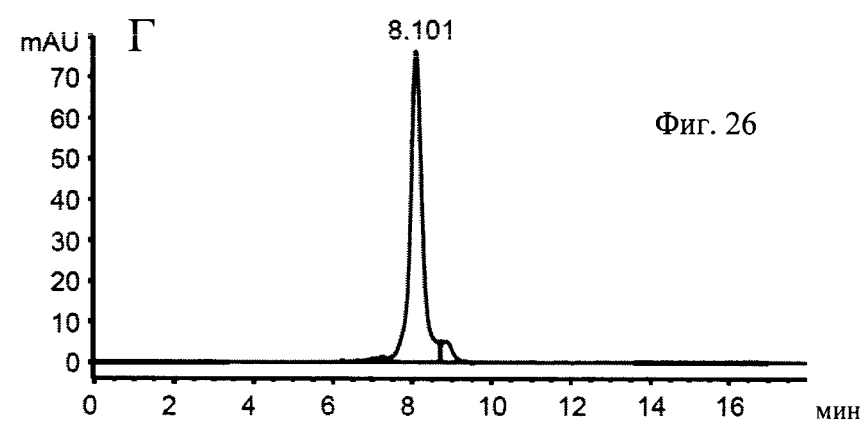
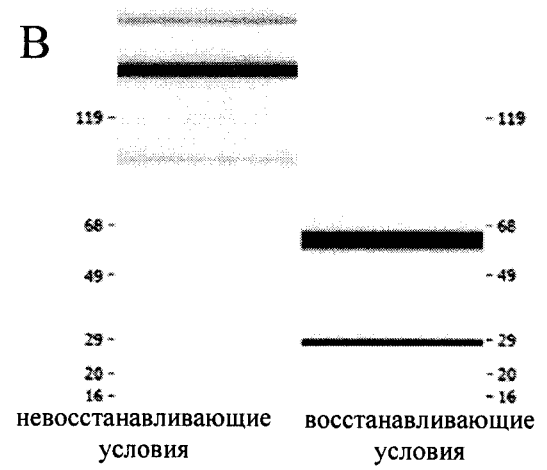
Фиг. 25

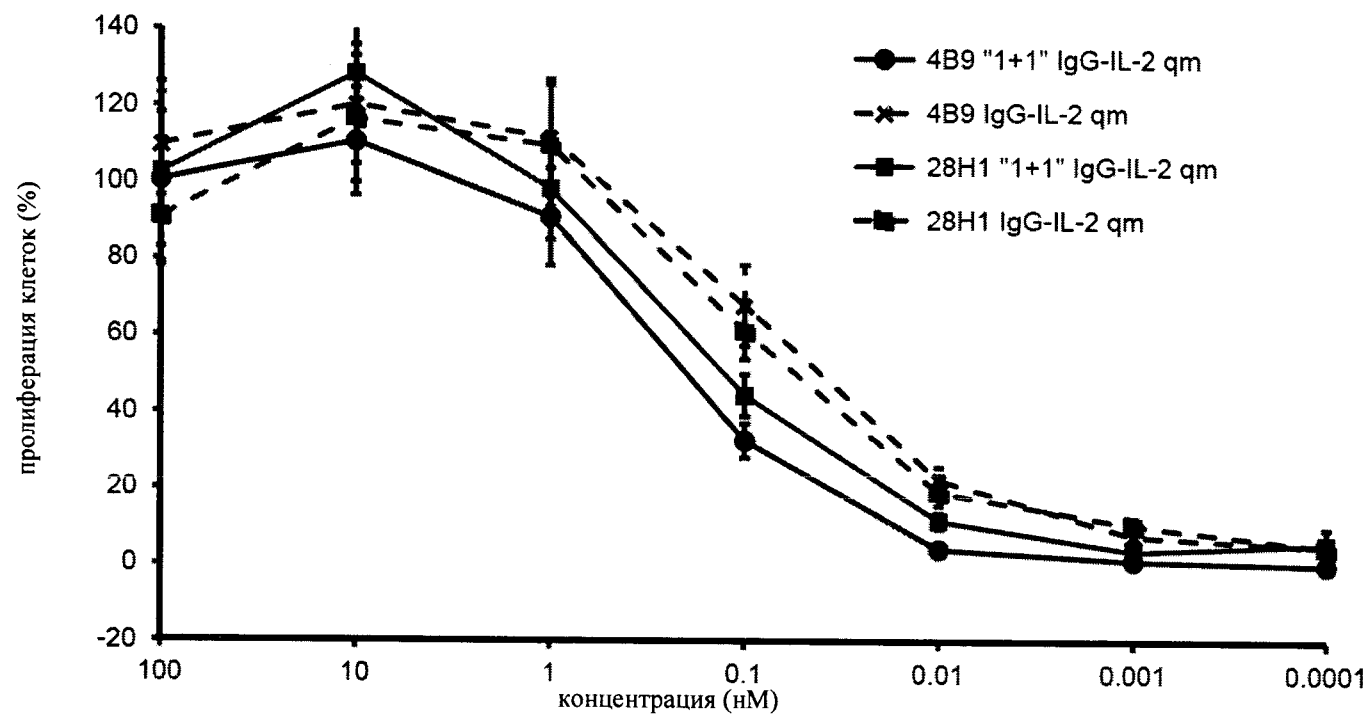
25/42





26/42

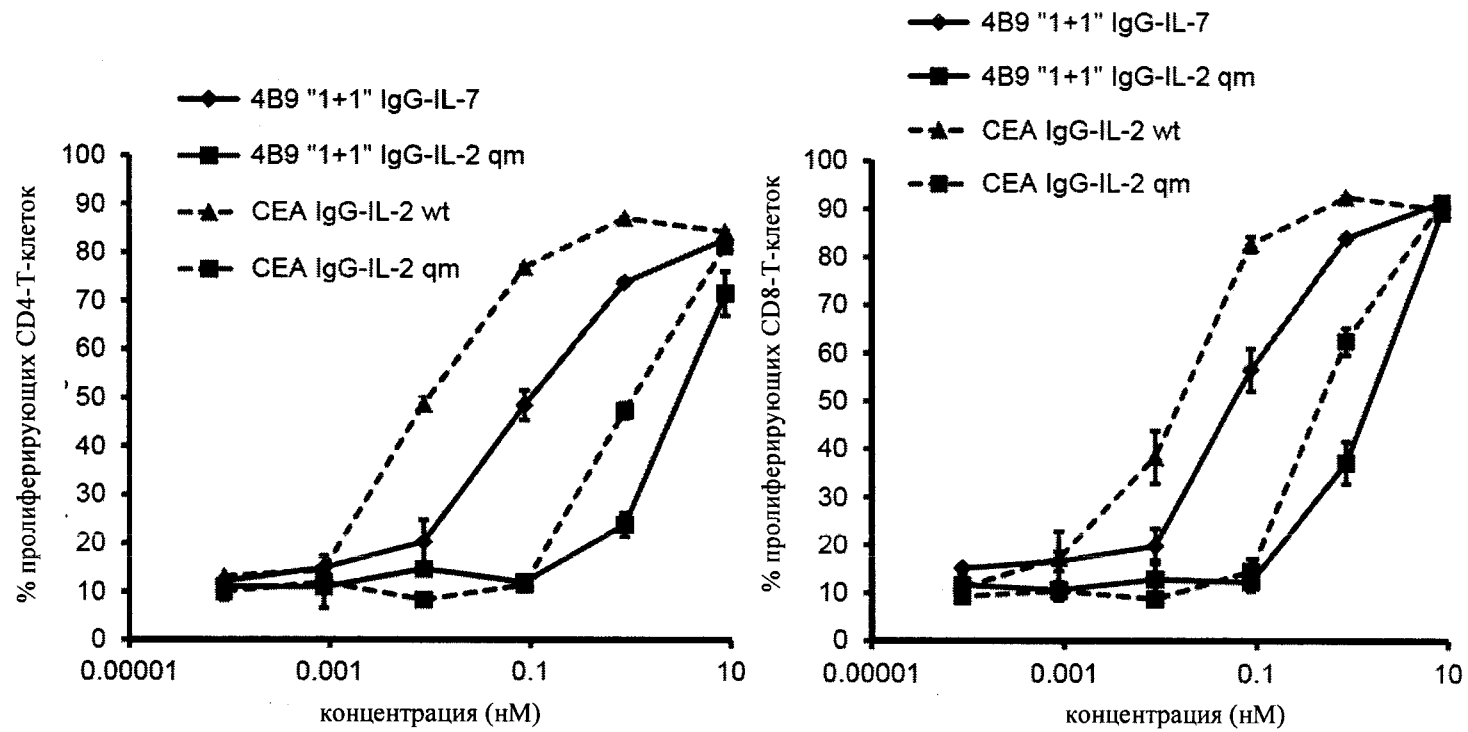




Фиг. 27

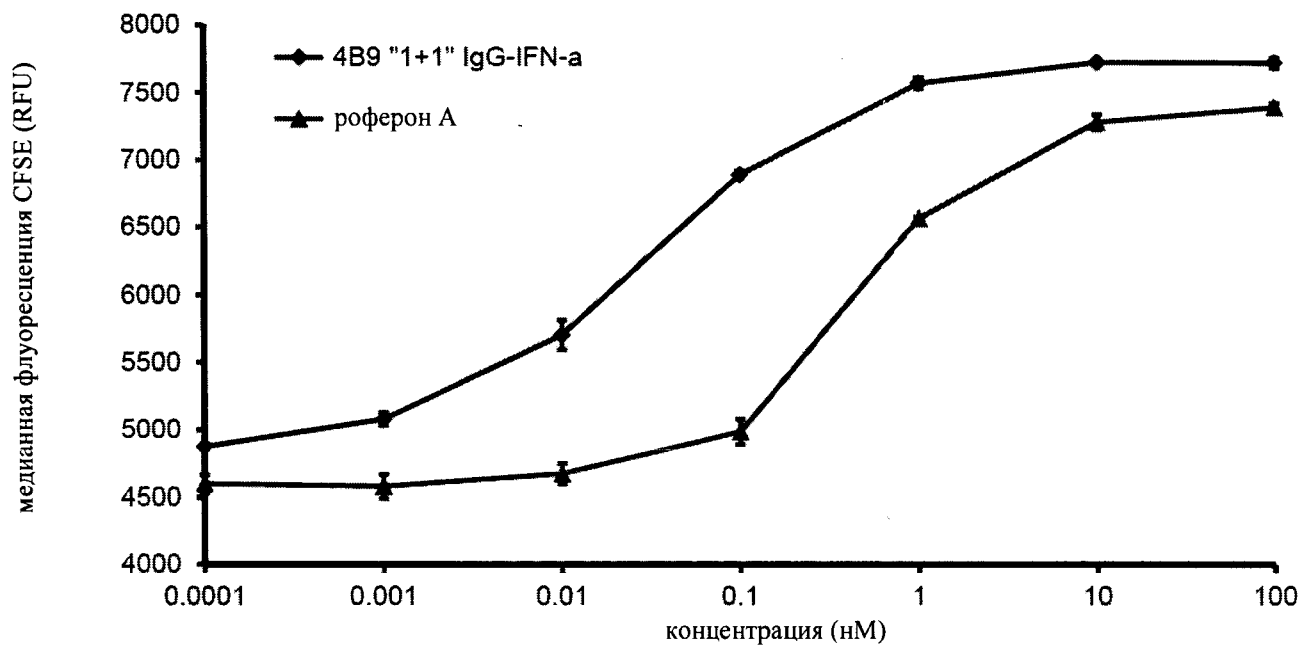
27/42





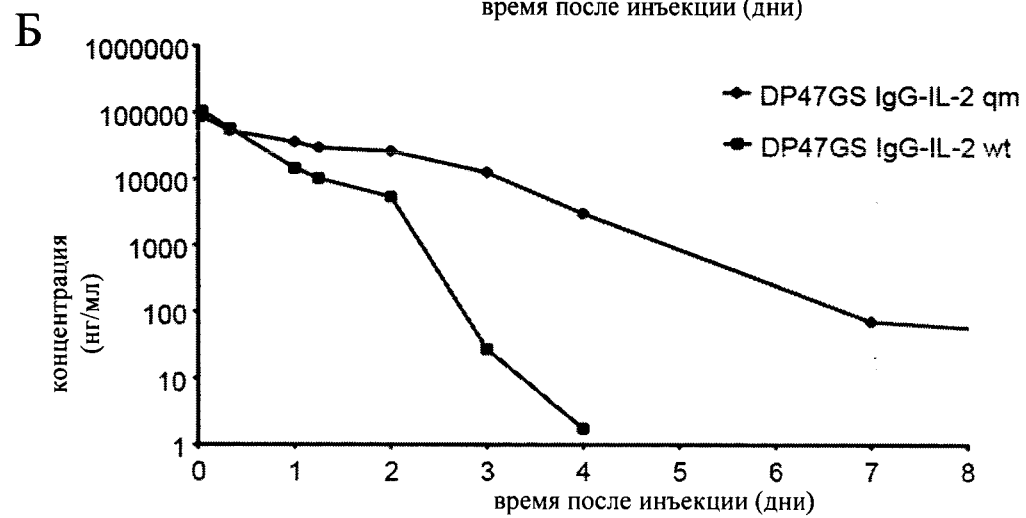
28/42

Фиг. 28

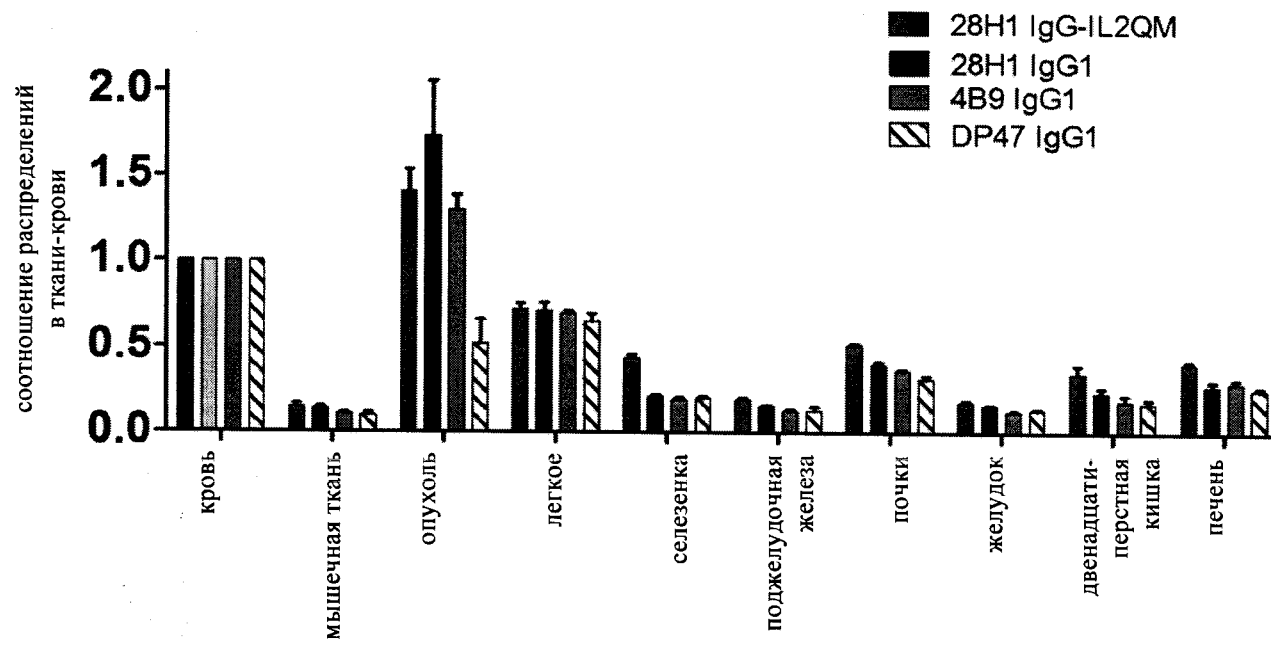


Фиг. 29

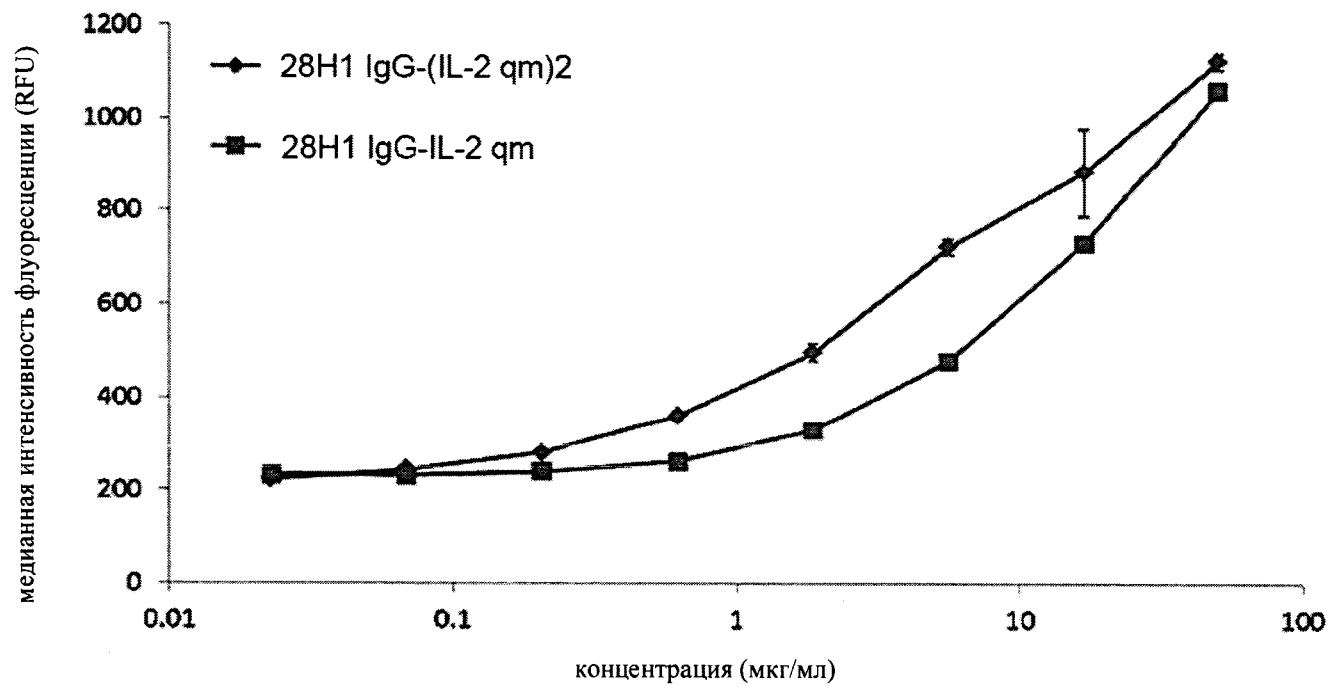
29/42



Фиг. 30

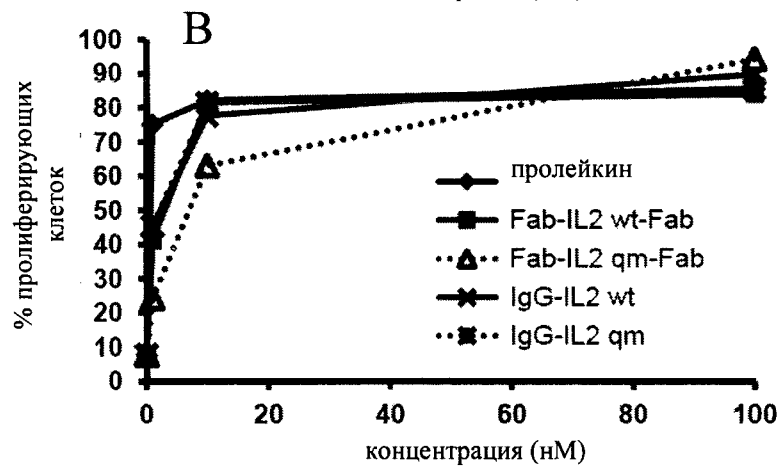
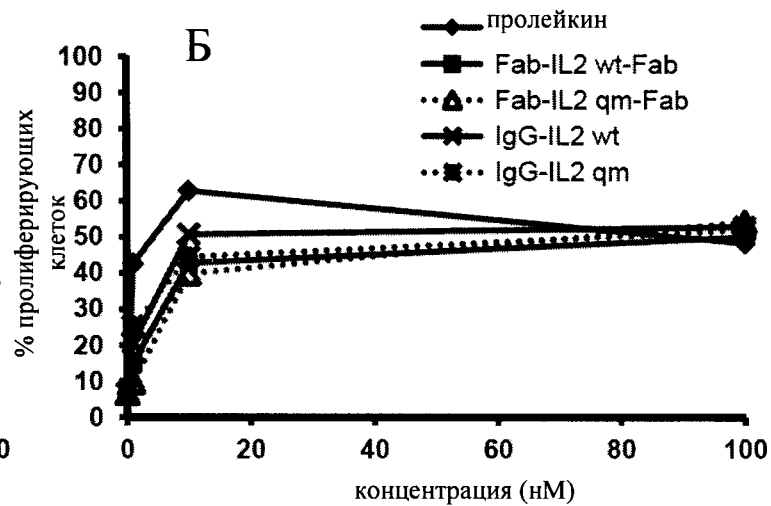
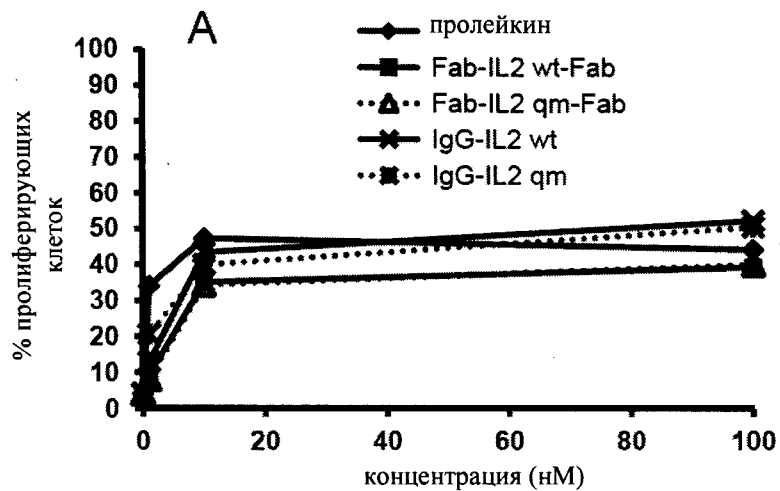


Фиг. 31



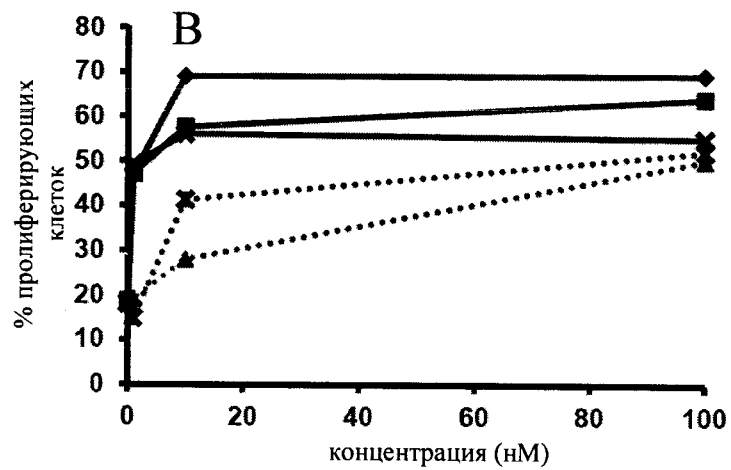
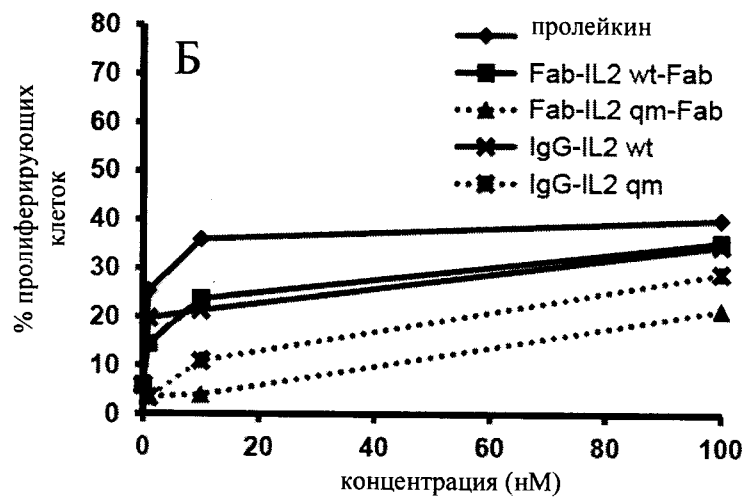
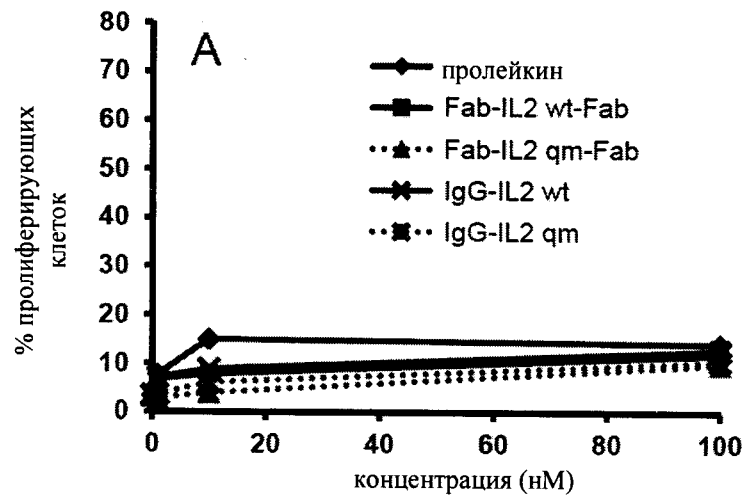
32/42

Фиг. 32

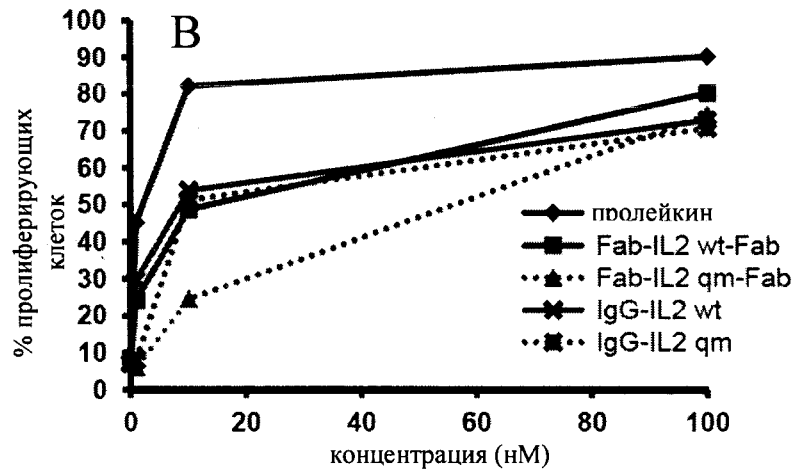
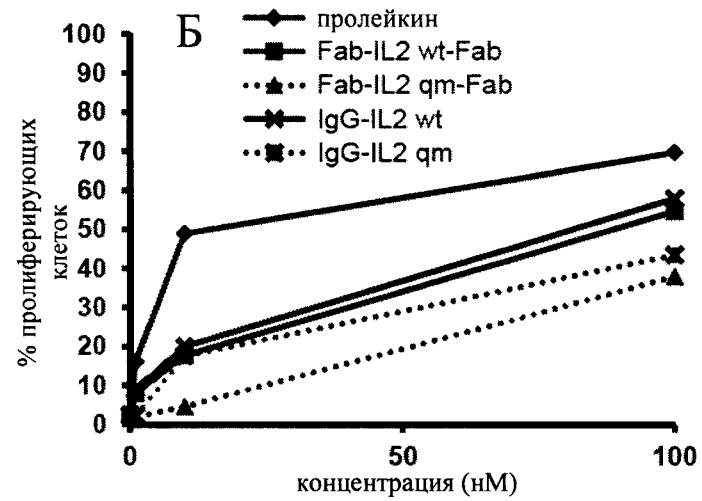
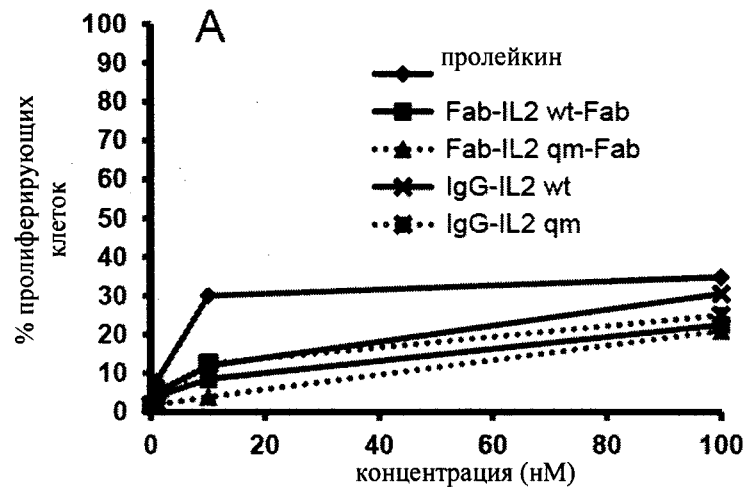


33/42

Фиг. 33



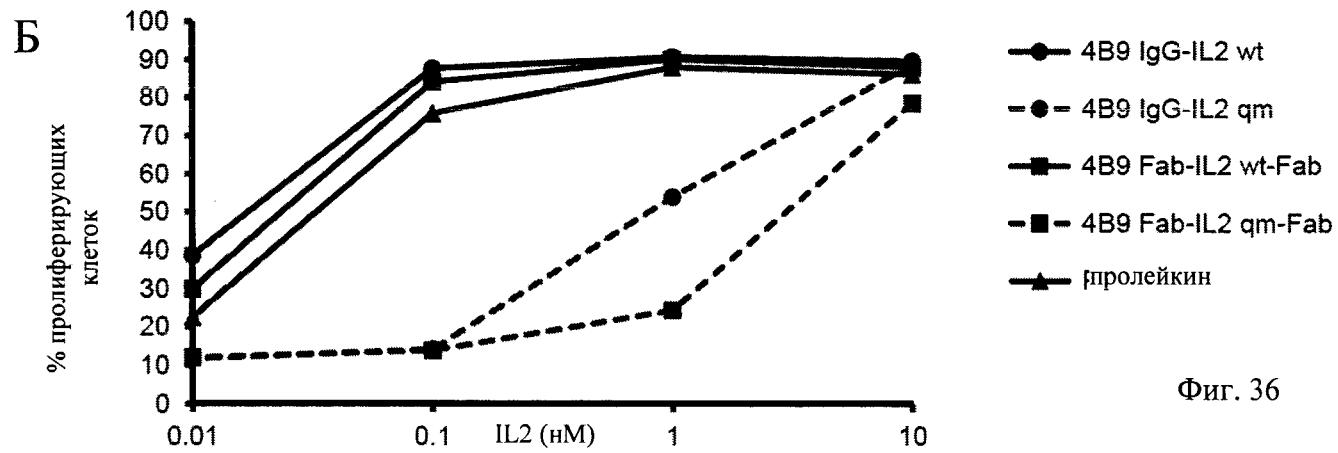
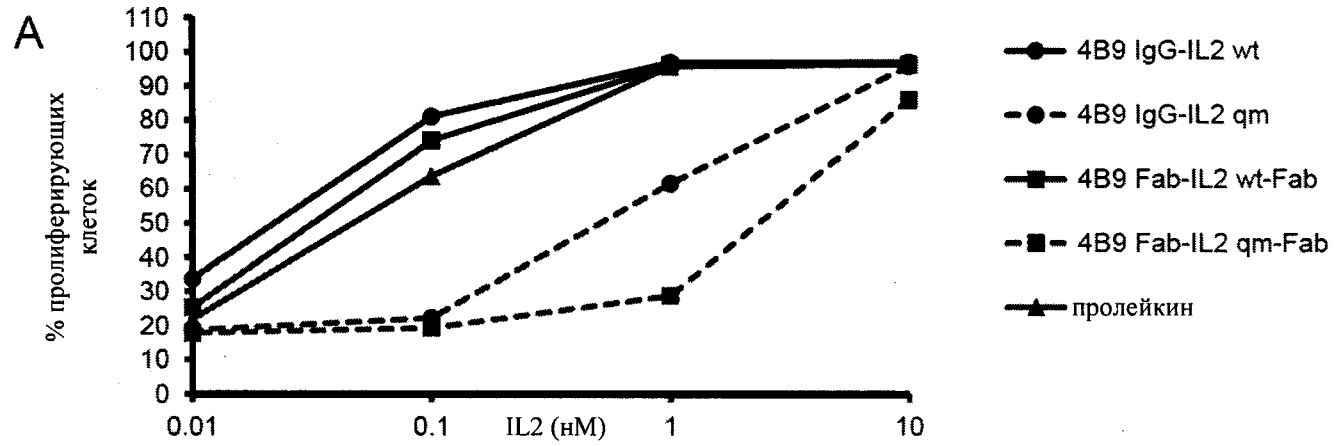
Фиг. 34



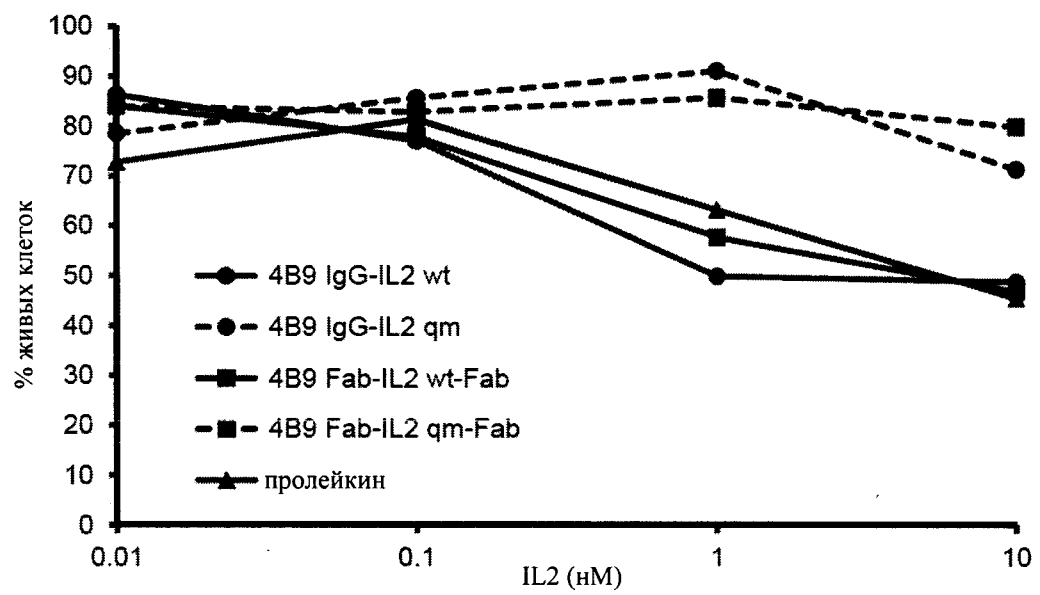
Фиг. 35

35/42





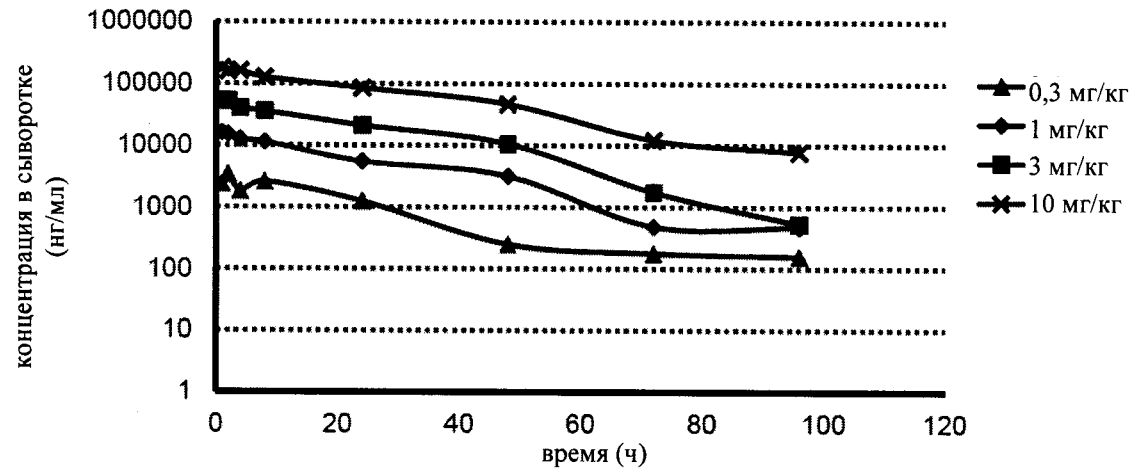
Фиг. 36



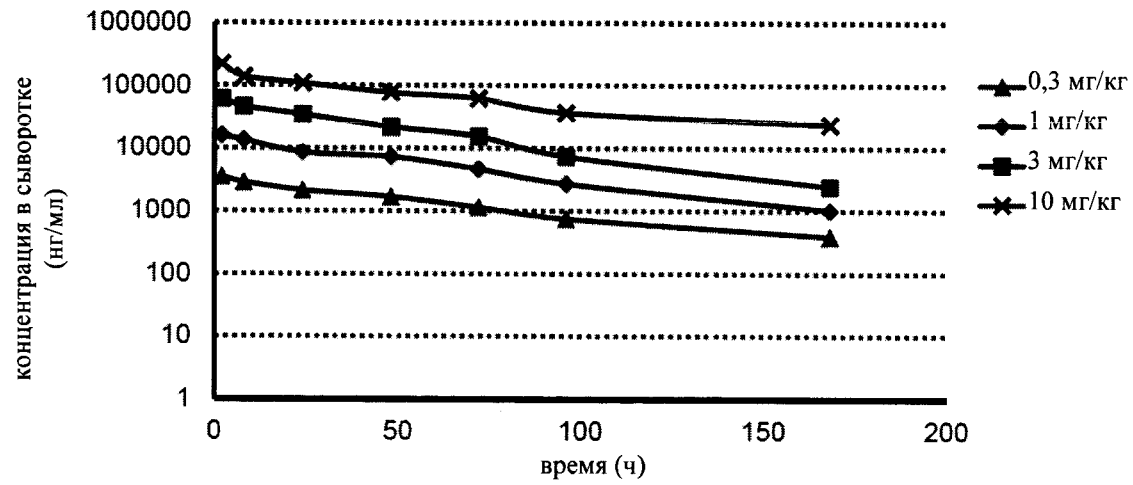
Фиг. 37

37/42

А



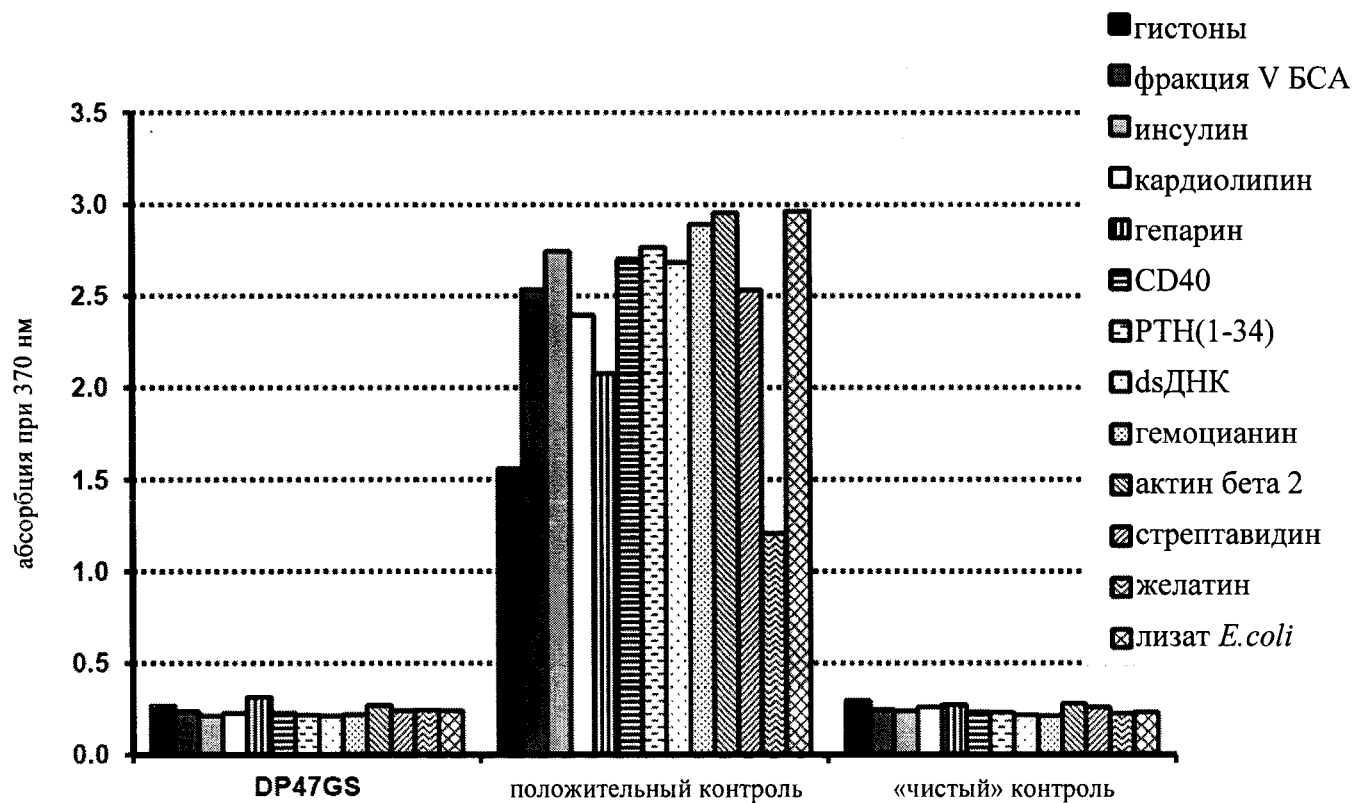
Б



38/42

Фиг. 38

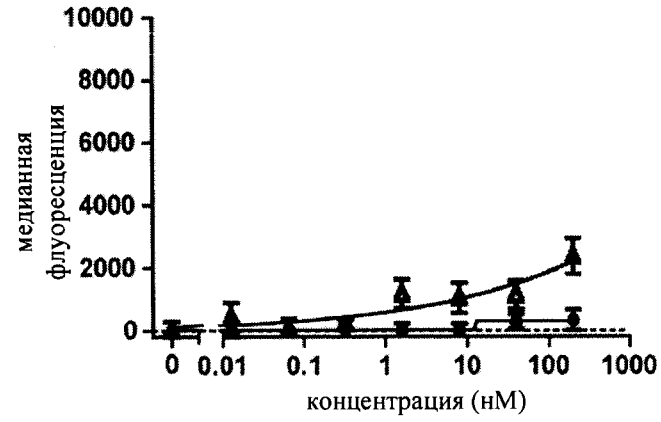
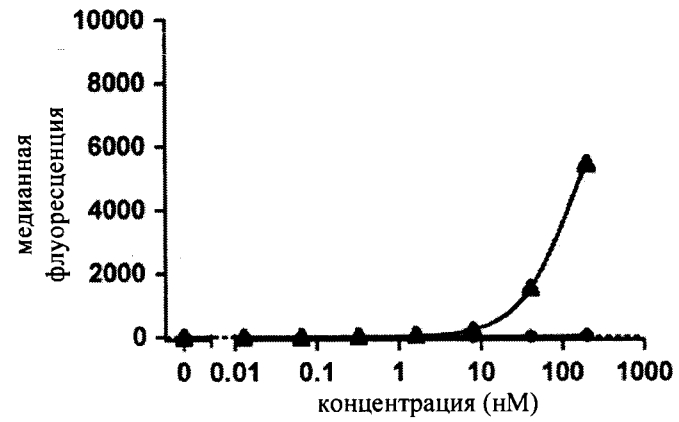
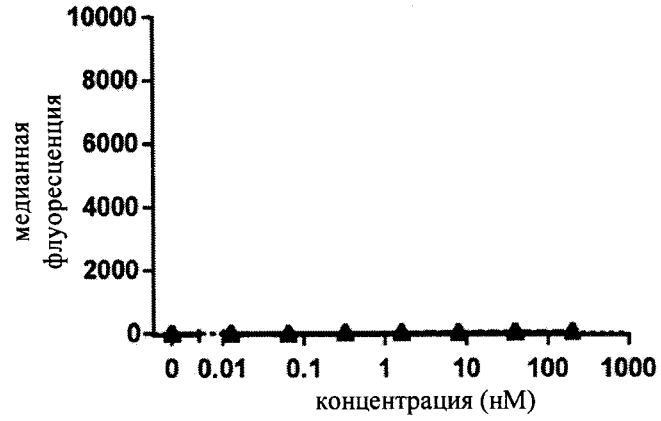
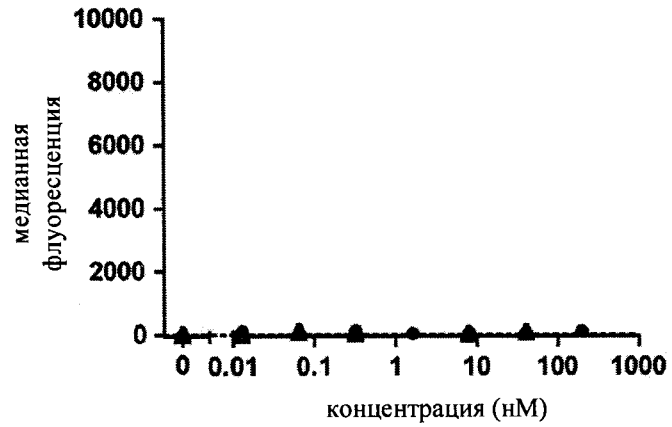
Фиг. 39



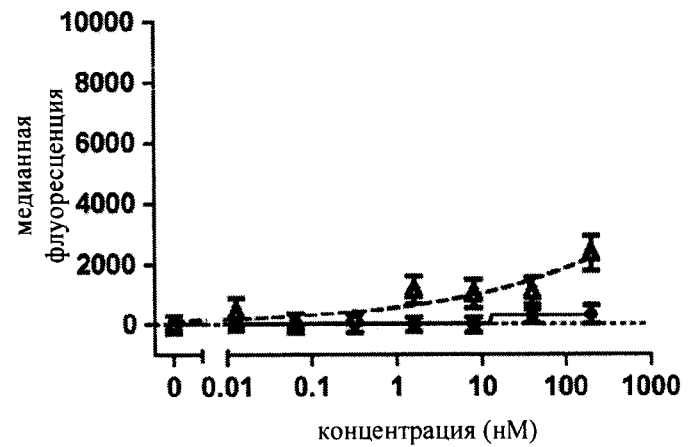
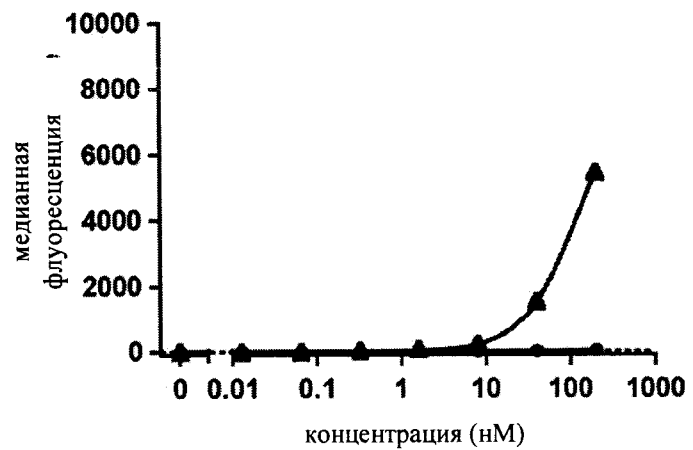
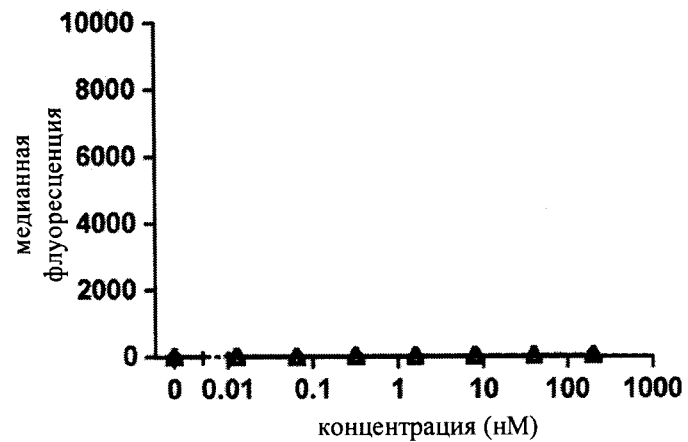
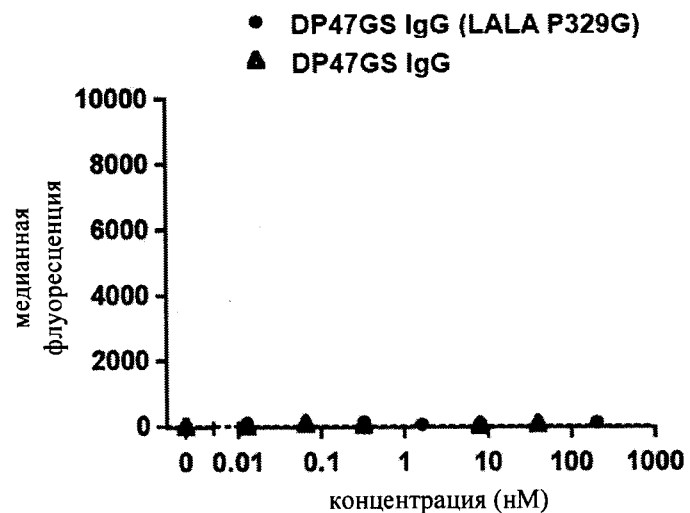
39/42

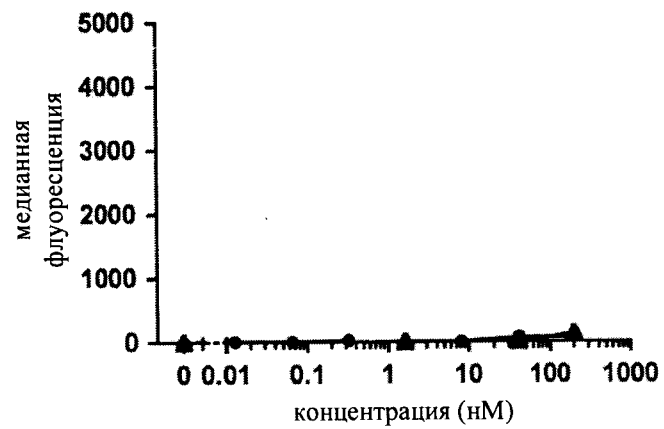
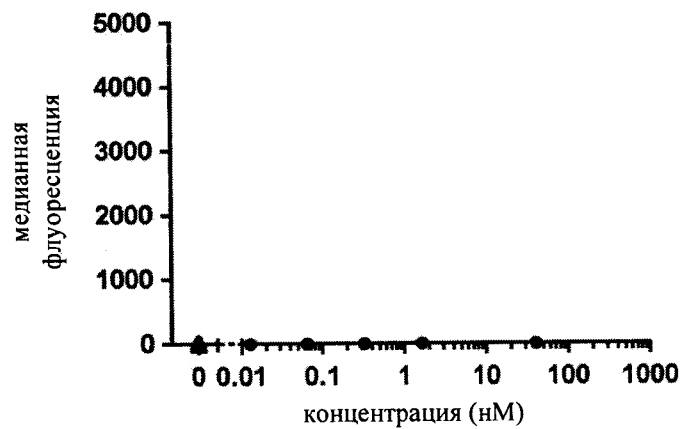
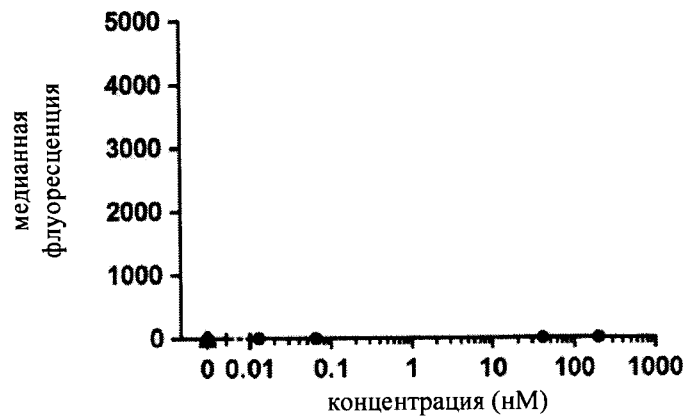
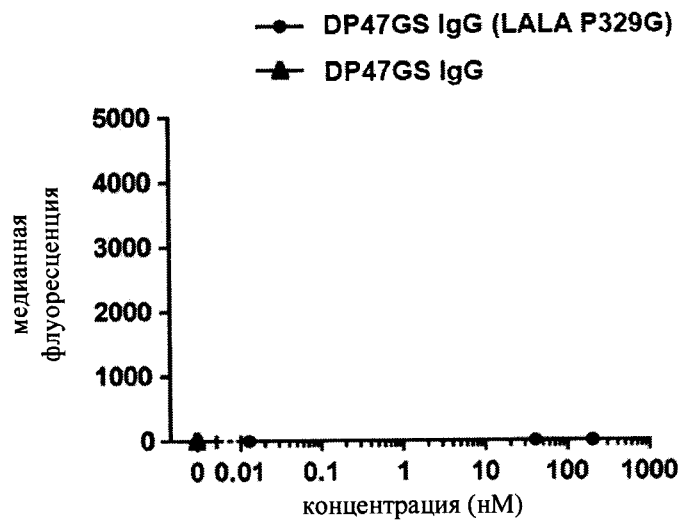
● DP47GS IgG (LALA P329G)  
▲ DP47GS IgG

Фиг. 40А



40/42





42/42

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

201600418

International application No

PCT/EP2012/057587

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. C07K14/55	C12N15/26	A61K39/395
C07K19/00	C07K14/54	A61K47/48
		C07K16/46
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, FSTA		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/143954 A2 (BIOGEN IDEC INC [US]; FARRINGTON GRAHMA K [US]; SAEED-KOTHE AMNA [US];) 27 November 2008 (2008-11-27)	1-14,17, 20-24, 36-45,82
Y	page 3, lines 1-13 page 8, lines 10-25 page 19, lines 1-24 page 48, lines 9-18 page 112, lines 5-23 page 117, lines 26-32 pages 120-122 page 123, lines 5-10	15,16, 18,19, 25-35, 46-81
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
28 June 2012	09/07/2012	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Bonello, Steve	



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/057587

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 2010/111282 A1 (US GOVERNMENT [US]; HO MITCHELL [US]; PASTAN IRA [US]) 30 September 2010 (2010-09-30)</p> <p>sequence 30 page 25, paragraph 92 page 5, paragraph 14 - page 6, paragraph 20 page 30, paragraphs 108,109 page 31, paragraphs 111,112 page 38, paragraph 131 page 39, paragraph 134 page 42, paragraph 145</p> <p>-----</p>	<p>16,18, 19, 25-35, 46-81</p>
Y	<p>WO 2011/020783 A2 (ROCHE GLYCARD AG [CH]; HOSSE RALF [CH]; MOESSNER EKKEHARD [CH]; SILACC) 24 February 2011 (2011-02-24) page 3, line 23 - page 4, line 22; sequence 229</p> <p>-----</p>	<p>46-81</p>
Y	<p>US 7 404 956 B2 (PETERS ROBERT T [US] ET AL) 29 July 2008 (2008-07-29)</p> <p>column 3, line 60 - column 4, line 28 column 12, line 15 - column 14, line 15 column 15, line 40</p> <p>-----</p>	<p>16,18, 19, 25-35, 46-81</p>
Y	<p>ELIZABETH ORTIZ-SÁNCHEZ ET AL: "Antibody cytokine fusion proteins: applications in cancer therapy", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, ASHLEY, LONDON, GB, vol. 8, no. 5, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 609-632, XP008145785, ISSN: 1471-2598, DOI: 10.1517/14712598.8.5.609 page 617, column 2 - page 619, column 1</p> <p>-----</p>	<p>25-35</p>
A	<p>WO 2008/003473 A2 (MERCK PATENT GMBH [DE]; GILLIES STEPHEN D [US]) 10 January 2008 (2008-01-10) page 2, paragraph 9 page 7, lines 6-14 page 13, lines 1-14 page 14, lines 8-16 page 24, paragraph 70 - page 26, paragraph 76</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1-82</p>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/057587

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 2006/119897 A2 (PHILOGEN SPA [IT]; NERI DARIO [CH]; GAFNER VERENA [CH]; HALIN CORNELIA) 16 November 2006 (2006-11-16)  cited in the application  page 1, lines 28-31  page 3, lines 1-5  page 3, lines 25-35  page 4, lines 23-29</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-82
A	<p>WO 03/048334 A2 (EMD LEXIGEN RES CT CORP [US]) 12 June 2003 (2003-06-12)  cited in the application  page 5, paragraph 19  page 10, paragraph 39  page 11, paragraph 41</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-82
A	<p>RICART A D ET AL: "Technology Insight: Cytotoxic drug immunoconjugates for cancer therapy",  NATURE CLINICAL PRACTICE ONCOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, US,  vol. 4, no. 4, 1 April 2007 (2007-04-01),  pages 245-255, XP009134780,  ISSN: 1743-4254, DOI: 10.1038/NCPONC0774  page 245 - page 253</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-82
Y	<p>WO 2010/088444 A1 (MEDIMMUNE LLC [US]; BOWEN MICHAEL [US]; WU HERREN [US]; DALL ACQUA WIL) 5 August 2010 (2010-08-05)  page 111, line 18 - page 115, line 10</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	15,16, 18,19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/057587

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2008143954	A2	27-11-2008	AU 2008254951 A1	27-11-2008
			CA 2687117 A1	27-11-2008
			CN 101802197 A	11-08-2010
			EP 2158318 A2	03-03-2010
			JP 2010528588 A	26-08-2010
			KR 20100021601 A	25-02-2010
			US 2009252729 A1	08-10-2009
			US 2011243966 A1	06-10-2011
			WO 2008143954 A2	27-11-2008
WO 2010111282	A1	30-09-2010	AU 2010230063 A1	20-10-2011
			CA 2756393 A1	30-09-2010
			EP 2411416 A1	01-02-2012
			US 2012107933 A1	03-05-2012
			WO 2010111282 A1	30-09-2010
WO 2011020783	A2	24-02-2011	AR 077879 A1	28-09-2011
			CA 2769619 A1	24-02-2011
			CR 20120042 A	22-03-2012
			EP 2467165 A2	27-06-2012
			KR 20120053042 A	24-05-2012
			TW 201119672 A	16-06-2011
			US 2011064751 A1	17-03-2011
			WO 2011020783 A2	24-02-2011
US 7404956	B2	29-07-2008	AT 446307 T	15-11-2009
			AU 2004252422 A1	06-01-2005
			BR PI0410345 A	30-05-2006
			CA 2522590 A1	06-01-2005
			CN 1852736 A	25-10-2006
			CN 102234334 A	09-11-2011
			EP 1625209 A2	15-02-2006
			EP 1654378 A2	10-05-2006
			EP 2174946 A1	14-04-2010
			EP 2357196 A2	17-08-2011
			EP 2361932 A1	31-08-2011
			IL 171779 A	30-11-2010
			JP 2007500744 A	18-01-2007
			JP 2012067142 A	05-04-2012
			US 2005027109 A1	03-02-2005
			US 2005032174 A1	10-02-2005
			US 2007172928 A1	26-07-2007
			US 2008249288 A1	09-10-2008
			US 2011159540 A1	30-06-2011
			US 2011182919 A1	28-07-2011
WO 2004101739 A2	25-11-2004			
WO 2005001025 A2	06-01-2005			
WO 2008003473	A2	10-01-2008	AU 2007271398 A1	10-01-2008
			CA 2656700 A1	10-01-2008
			EP 2038417 A2	25-03-2009
			JP 2009542592 A	03-12-2009
			US 2008025947 A1	31-01-2008
			WO 2008003473 A2	10-01-2008
WO 2006119897	A2	16-11-2006	AT 459648 T	15-03-2010
			AU 2006246061 A1	16-11-2006
			BR PI0609100 A2	17-02-2010