

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043910**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.07.05**

**(21)** Номер заявки  
**202091752**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.02.08**

**(51)** Int. Cl. **A61K 47/68** (2017.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 14/54** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)

---

**(54) ИММУНОЦИТОКИН ДЛЯ НАЦЕЛЕННОЙ НА ЗЛОКАЧЕСТВЕННУЮ ОПУХОЛЬ ДОСТАВКИ IL-12 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** 18156141.6; 18179313.4

**(32)** 2018.02.09; 2018.06.22

**(33)** EP

**(43)** 2020.11.09

**(86)** PCT/EP2019/053136

**(87)** WO 2019/154986 2019.08.15

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ФИЛОДЖЕН С.П.А. (IT)**

**(72)** Изобретатель:  
**Вилла Алессандра, Маташи Маттиа,  
Онгаро Тициано (CH)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** WO-A1-2013014149

GAFNER V. ET AL.: "An engineered antibody-interleukin-12 fusion protein with enhanced tumor vascular targeting properties", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, JOHN WILEY & SONS, INC, US, vol. 119, no. 9, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 2205-2212, XP002405179, ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/IJC.22101, abstract, figure 3 page 2211, right-hand column, paragraph 2

WO-A2-2006119897

WO-A2-0162298

WO-A2-2011020783

TIZIANO ONGARO ET AL.: "A novel anti-cancer L19-interleukin-12 fusion protein with an optimized peptide linker efficiently localizes in vivo at the site of tumors", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 291, 1 February 2019 (2019-02-01), pages 17-25, XP055584521, AMSTERDAM, NL, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.12.004, the whole document

WO-A1-2018153865

---

**(57)** Изобретение относится к иммуноцитокину для нацеленной на злокачественную опухоль доставки IL-12, где указанный иммуноцитокин содержит фрагмент белка IL-12 и фрагмент домена, связывающего экстра-домен В фибронектина (EDB), и линкер между фрагментом белка IL-12 и фрагментом EDB-связывающего домена. Данное изобретение также относится к применению указанного иммуноцитокина, к фармацевтической композиции, содержащей указанный иммуноцитокин, и к терапевтическому набору предметов для нацеленной на злокачественную опухоль доставки IL-12.

---

**B1**

**043910**

**043910**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящая заявка относится к композициям, содержащим цитокин, антигенсвязывающий домен и улучшенный линкер.

### Уровень техники

IL-12 представляет собой гетеродимерный цитокин, содержащий две субъединицы, p35 и p40, связанные дисульфидными связями. IL-12 стимулирует выработку IFN $\gamma$  из Т-клеток и естественных клеток-киллеров, а также индуцирует дифференцировку Th1-хелперных клеток. IL-12 является ключевым медиатором врожденного и клеточного иммунитета с потенциалом противоопухолевой и антиметастатической активности.

Однако, как и многие другие цитокины, введение IL-12 связано с проявлением высокой токсичности (Cag et al., 1999), даже в дозах, составляющих всего 1 мкг на кг массы тела в день, что препятствует его разработке в качестве противоопухолевого препарата.

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает, среди прочего, улучшенные композиции и способы, которые можно использовать для эффективного лечения различных заболеваний и расстройств, связанных с экспрессией EDB фибронектина.

В частности, настоящее изобретение относится к IL-12, связанному с EDB-связывающими доменами, обладающему предпочтительными терапевтическими свойствами по сравнению с известными рекомбинантными конструкциями IL-12. Композиции, описанные здесь, неожиданно превосходят ранее известные конструкторы IL-12, сконструированные для нацеливания на EDB, и решают давно известную проблему безопасного и эффективного введения IL-12 для таргетного лечения заболевания или расстройства, например рака. Композиции и способы, описанные здесь, обеспечивают улучшенный терапевтический потенциал IL-12 за счет улучшения одного или более из его свойств: профиля биораспределения, его переносимости, его терапевтического окна и его эффективности в достижении места заболевания. Конструкторы, описанные здесь, также неожиданно демонстрируют превосходную технологичность.

В данной области остается потребность в улучшении проникновения в ткани иммуноцитоклинов для лечения. В данной области также существует потребность в улучшенной продукции иммуноцитоклинов для лечения, поскольку они представляют собой очень сложные белки, которые трудно получать.

Следовательно, целью настоящего изобретения является обеспечение улучшенных вариантов иммуноцитоклинов, например, белковых терапевтических средств, содержащих IL-12 и домен, связывающийся с EDB фибронектина. Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение иммуноцитоклинов, которые демонстрируют более эффективное продуцирование. Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение иммуноцитоклинов с улучшенной эффективностью в условиях *in vivo*, например, связыванием с мишенью или проникновением в ткани.

Настоящее изобретение обеспечивает композиции, содержащие антигенсвязывающий домен и цитокин, обладающие такими усовершенствованными свойствами. Изобретение и общие преимущества его признаков, включая соответствующие линкеры, будут подробно обсуждаться ниже.

Согласно одному аспекту изобретения обеспечивается композиция, содержащая:

- a) белок IL-12, содержащий первую субъединицу IL-12 и вторую субъединицу белка IL-12;
- b) пептид или белок, содержащий EDB-связывающий домен; и
- c) линкер между белком IL-12 и пептидом или белком, содержащим EDB-связывающий домен.

Предпочтительно две субъединицы IL-12 соединены друг с другом определенным линкером согласно следующей схеме (ориентация N $\rightarrow$ C): p40-линкер 1-p35.

Предпочтительно IL-12 представляет человеческий IL-12. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения одноцепочечное диатело связывается со сплайсинговой изоформой фибронектина. Предпочтительно указанный экстрадомен В (EDB) фибронектина представляет экстрадомен В человеческого фибронектина (UniProt: P02751).

В некоторых вариантах осуществления линкер между белком IL-12 и пептидом или белком, содержащим EDB-связывающий домен, содержит последовательность GSADGGSSAGGS DAG (SEQ ID NO: 4).

В некоторых вариантах осуществления пептид или белок, содержащий EDB-связывающий домен, включает scFv. В некоторых вариантах осуществления пептид или белок, содержащий EDB-связывающий домен, представляет диатело. В некоторых вариантах осуществления пептид или белок, содержащий EDB-связывающий домен, представляет одноцепочечное диатело.

В некоторых вариантах осуществления первая субъединица белка IL-12 представляет p40, и вторая субъединица представляет p35.

В некоторых вариантах осуществления первая субъединица белка IL-12 представляет p40, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, или ее фрагмент, где белок IL-12 может активировать рецептор IL-12.

В некоторых вариантах осуществления вторая субъединица белка IL-12 представляет p35, содер-

жащую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, или ее фрагмент, где белок IL-12 может активировать рецептор IL-12.

В некоторых вариантах осуществления пептид или белок, содержащий EDB-связывающий домен, является моноспецифическим или биспецифическим.

В некоторых вариантах осуществления пептид или белок, содержащий EDB-связывающий домен, связывается с экстрадоменом В (EDB) фибронектина.

В некоторых вариантах осуществления пептид или белок, содержащий EDB-связывающий домен, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с одной или более аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 28-33.

В некоторых вариантах осуществления пептид или белок, содержащий EDB-связывающий домен, содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 28-33.

В некоторых вариантах осуществления пептид или белок, содержащий EDB-связывающий домен, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с одной или более аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 7 и 5.

В некоторых вариантах осуществления пептид или белок, содержащий EDB-связывающий домен, содержит любую из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 7 и 5.

В некоторых вариантах осуществления пептид или белок, содержащий EDB-связывающий домен, содержит по меньшей мере одно из:

а) пары последовательностей в соответствии с вышеприведенным описанием, при условии, что по меньшей мере один из доменов имеет идентичность последовательности на уровне  $\geq 80\%$  относительно SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 5 соответственно, и/или

б) пары последовательностей в соответствии с вышеприведенным описанием, при условии, что по меньшей мере один из доменов имеет до 10 аминокислотных замен относительно SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 5 соответственно,

одновременно сохраняя свою способность связываться с экстрадоменом В (EDB) фибронектина.

В некоторых вариантах осуществления пептид или белок содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, где по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет консервативную аминокислотную замену.

В некоторых вариантах осуществления пептид или белок, содержащий EDB-связывающий домен:

имеет аффинность связывания с мишенью  $\geq 50\%$  с экстрадоменом В (EDB) фибронектина по сравнению с одним из пептидов или белков, содержащих анти-EDB-связывающий домен, как описано выше, и/или

конкурирует за связывание с экстрадоменом В (EDB) фибронектина с одним из пептидов или белков, содержащих EDB-связывающий домен, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления пептид или белок, содержащий EDB-связывающий домен, содержит два домена VH L19 и два домена VL L19.

В некоторых вариантах осуществления два домена VH L19 имеют одинаковую аминокислотную последовательность:

два домена VH L19 имеют различную аминокислотную последовательность;

два домена VL L19 имеют одинаковую аминокислотную последовательность или

два домена VL L19 имеют различную аминокислотную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления пептид или белок, содержащий EDB-связывающий домен, содержит один домен VH L19 и один домен VL L19.

В некоторых вариантах композиция содержит

домен р40, связанный с доменом р35 первым линкером (также называемым "линкером 1");

первый домен VH L19, связанный с доменом р35 линкером SAD;

первый домен VL L19, связанный с первым доменом VH L19 третьим линкером (также называемым "линкером 3");

второй домен VH L19, связанный с первым доменом VL L19 четвертым линкером (также называемым "линкером 4");

второй домен VL L19, связанный со вторым доменом VH L19 пятым линкером (также называемым "линкером 5").

В некоторых вариантах осуществления третий линкер и пятый линкер содержат одинаковую аминокислотную последовательность и/или могут быть заменены друг другом.

В некоторых вариантах осуществления домен р40 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, или ее

фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления домен р35 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, или ее фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления первый линкер ("линкер 1") представляет линкер GS.

В некоторых вариантах осуществления первый линкер содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления первый домен VH L19, второй домен VH L19 или оба содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 28-30.

В некоторых вариантах осуществления первый домен VL L19, второй домен VL L19 или оба содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 31-33.

В некоторых вариантах осуществления первый домен VH L19, второй домен VH L19 или оба содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления первый домен VL L19, второй домен VL L19 или оба содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления линкер SAD содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления третий линкер ("линкер 3") представляет линкер GS.

В некоторых вариантах осуществления третий линкер содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления пятый линкер ("линкер 5") представляет линкер GS.

В некоторых вариантах осуществления пятый линкер содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления третий линкер ("линкер 3") и пятый линкер ("линкер 5") содержат одинаковую аминокислотную последовательность и/или могут быть заменены друг другом.

В некоторых вариантах осуществления четвертый линкер ("линкер 4") представляет линкер GS.

В некоторых вариантах осуществления четвертый линкер содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления композиция состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16.

Согласно еще одному аспекту изобретения обеспечивается применение композиции по любому из вышеуказанных пунктов (для производства лекарственного средства) в лечении человека или животного, которому поставлен диагноз, страдает или подвержен риску развития неопластического заболевания или для профилактики такого патологического состояния.

В некоторых вариантах осуществления неопластическое заболевание выбрано из группы, состоящей из злокачественной меланомы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), метастатического колоректального рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефицитом репарации ошибок репарации ДНК (dMMR), гепатоцеллюлярного рака, рака желудка, плоскоклеточной карциномы кожи, рака шейки матки и диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL).

Согласно еще одному аспекту изобретения обеспечивается применение композиции в соответствии с вышеприведенным раскрытием (для производства лекарственного средства) для ингибирования ангиогенеза у человека или животного.

Согласно еще одному аспекту изобретения обеспечивается фармацевтическая композиция, содер-

жащая, по меньшей мере, композицию в соответствии с вышеприведенным описанием и, необязательно, один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.

Согласно еще одному аспекту изобретения обеспечивается комбинация, включающая (i) композицию в соответствии с вышеприведенным описанием или фармацевтическую композицию в соответствии с вышеприведенным описанием и (ii) одно или более терапевтически активных соединений.

Согласно еще одному аспекту изобретения обеспечивается способ лечения или профилактики расстройства или патологического состояния, ассоциированного с экспрессией или сверхэкспрессией EDB фибронектина, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества композиции в соответствии с вышеприведенным описанием, фармацевтической композиции в соответствии с вышеприведенным описанием, или комбинации в соответствии с вышеприведенным описанием.

Согласно еще одному аспекту изобретения обеспечивается терапевтический набор предметов, содержащий:

- a) композицию в соответствии с вышеприведенным описанием, фармацевтическую композицию в соответствии с вышеприведенным описанием или комбинацию в соответствии с вышеприведенным описанием,
- b) устройство для введения композиции, фармацевтической композиции или комбинации и
- c) инструкции по применению.

#### Краткое описание фигур

На фиг. 1A-1B: результаты экспериментов по экспрессии белка. См. ниже подраздел "Материалы и методы".

На фиг. 1A: 15-мерный линкер, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (обозначенный здесь "SAD"), показывает наилучшие выходы продукта для всех вариантов (также называемых здесь "клонами"). Выход почти на 100% выше по сравнению со 2-ым наилучшим вариантом, DDS.

Две последовательности в строке АККАS представляют SEQ ID NO: 9 и 18, две последовательности в строке AP7 представляют SEQ ID NO: 15 и 19, две последовательности в строке DDS представляют SEQ ID NO: 10 и 20, две последовательности в строке AP6 представляют SEQ ID NO: 14 и 21, две последовательности в строке G4S представляют SEQ ID NO: 11 и 22, две последовательности в строке SES представляют SEQ ID NO: 12 и 23, две последовательности в строке Alpha3 представляет SEQ ID NO: 13 и 24, и две последовательности в строке SAD представляют SEQ ID NO: 4 и 25.

Представлены N-концевые и C-концевые остатки (или 5'- или 3'-нуклеотиды) на фиг. 1, которые показаны серым цветом. Они не относятся к раскрытию настоящей заявки, для которых необходим поиск. Они просто показывают структуру, в которую могут быть вставлены соответствующие линкеры.

На фиг. 1B результаты анализа SDS-PAGE показывают молекулярную массу примерно 120 кДа для всех вариантов.

На фиг. 2 результаты экспериментов с ELISA. Все варианты связываются с доменом 7B89 человеческого фибронектина как в концентрации 10 мкг/мл, так и в концентрации 1 мкг/мл.

На фиг. 3 результаты экспериментов с Biacore. Все варианты демонстрируют сходное поведение связывания с доменом 7B89 человеческого фибронектина.

На фиг. 4 результаты эксклюзионной хроматографии (SEC). Все варианты показали сопоставимый профиль агрегации с основным пиком на 13 мл, который соответствует мономерному иммуноцитокину, и меньшим пиком на 10 мл, который соответствует агрегатам.

На фиг. 5 результаты экспериментов с иммунофлуоресцентным окрашиванием. Все варианты специфически окрашивали сосудистую сеть замороженных образцов сингенной тератокарциномы F9 по сравнению с отрицательным контролем.

На фиг. 6 результаты оценки нацеливания на опухоль *in vivo*. Все варианты и положительный контроль метили радиоактивным йодом <sup>125</sup>I и инъектировали (из расчета 4-9 мкг белка/животное) иммунокомпетентным мышам, несущим подкожно имплантированную мышечную тератокарциному F9. Результаты определения радиоактивности через 24 ч после инъекции показали накопление в опухоли для всех вариантов. Однако вариант "SAD" показал лучшее накопление в опухоли по сравнению с другими семью клонами ( $\pm 2,9\%$  ID/г (= процент инъектированной дозы на г ткани) по сравнению со вторым наилучшим вариантом (G4S)<sub>3</sub>, который показал  $\pm 2,4\%$  ID/г).

На фиг. 7 и 8 приведены форматы примерных иммуноцитоклинов с использованием IL-12 и антитела против фибронектина.

На фиг. 9 результаты анализа SEC различных слитых белков (A) huIL-12L19L19 "SAD", партия A; (B) huIL-12L19L19 "SAD", партия B; (C) huIL-12L19L19 "старый", партия A; (D) huIL-12L19L19 "старый", партия B.

На фиг. 10 результаты эксперимента с Biacore. Было показано, что вариант "SAD" имеет повышенную кажущуюся аффинность по сравнению с вариантом со "старым" линкером по отношению к домену 7B89 фибронектина (3,8 нМ против 6,7 нМ). Такой удивительный результат является неожиданным, поскольку изменение линкера может влиять на стабильность белка, но обычно не оказывает влияния на аффинность к его мишени.

На фиг. 11 результаты эксперимента по оценке нацеливания на опухоль *in vivo*. Варианты "SAD" и "старый" метили радиоактивным йодом  $^{125}\text{I}$  и инъецировали (из расчета 10-11 мкг белка/животное) иммунокомпетентным мышам, несущим подкожно имплантированную мышиную тератокарциному F9. Вариант "SAD" показал улучшенную способность к нацеливанию на опухоль по сравнению со "старым" вариантом линкера.

### Подробное описание изобретения

#### Определения

Термин "антитело" относится к молекуле семейства иммуноглобулинов, содержащей тетрамерную структурную единицу. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая из которых имеет одну "легкую" цепь (с молекулярной массой примерно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (с молекулярной массой примерно 50-70 кДа), соединенных дисульфидной связью. Известные гены иммуноглобулинов включают гены константной области  $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  и  $\mu$ , а также множество генов вариабельной области иммуноглобулина. Легкие цепи классифицируются как  $\kappa$  или  $\lambda$ . Тяжелые цепи классифицируются как  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  или  $\epsilon$ , которые, в свою очередь, определяют классы иммуноглобулинов, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. Антитела могут быть любого изотипа/класса (например, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE) или любого подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2).

Как легкие, так и тяжелые цепи делятся на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константная" и "вариабельная" используются в структурном и функциональном отношении. N-конец каждой цепи определяет вариабельную (V) область или домен примерно из 100-110 или более аминокислот, главным образом ответственную за распознавание антигена. Термины вариабельная область легкой цепи ( $V_L$ ) и вариабельная область тяжелой цепи ( $V_H$ ) относятся к указанным областям легкой и тяжелой цепей соответственно. В результате спаривания  $V_H$  и  $V_L$  образуется один антигенсвязывающий участок. Помимо V-областей как тяжелые цепи, так и легкие цепи содержат константную (C) область или домен. C-область секретируемой формы иммуноглобулина состоит из трех доменов C: CH1, CH2, CH3, необязательно CH4 (C $\mu$ ) и шарнирной области. C-область мембранной формы иммуноглобулина также имеет мембранные и внутриклеточные домены. Каждая легкая цепь имеет  $V_L$  на N-конце, за которой следует константный домен (C) на другом конце. Константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарное проникновение, связывание с Fc-рецептором, связывание комплемента и тому подобное. Согласно соглашению нумерация доменов константной области возрастает по мере того, как они становятся более удаленными от антигенсвязывающего участка или аминоконца антитела. N-конец содержит вариабельную область, и на C-конце находится константная область; домены CH3 и CL фактически содержат карбоксиконцевые домены тяжелой и легкой цепей соответственно. VL совмещается с VH, и CL совмещается с первым константным доменом тяжелой цепи. Как здесь используется, термин "антитело" охватывает традиционные структуры антител и варианты антител. Таким образом, в объем этого понятия входят полноразмерные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела человека и фрагменты антител.

Антитела находятся в виде цепей интактных иммуноглобулинов или в виде ряда хорошо охарактеризованных фрагментов антител, полученных расщеплением различными пептидазами. Как здесь используется, термин "фрагмент антитела" относится к одному или более участкам антитела, которые сохраняют способность специфически взаимодействовать (например, посредством связывания, стерического затруднения, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) с эпитопом антигена. Так, например, пепсин расщепляет антитело ниже дисульфидных связей в шарнирной области с образованием  $F(ab)_2$ , димера Fab', который сам представляет легкую цепь, соединенную с  $V_H$ - $C_{H1}$  дисульфидной связью.  $F(ab)_2$  может быть восстановлен в мягких условиях с разрушением дисульфидной связи в шарнирной области, с превращением тем самым димера  $F(ab)_2$  в мономер Fab'. Мономер Fab' по существу представляет Fab с участком шарнирной области (Paul, *Fundamental Immunology* 3d ed. (1993)). Несмотря на то, что различные фрагменты антител определены с точки зрения расщепления интактного антитела, специалист в данной области понимает, что такие фрагменты можно синтезировать *de novo* химически или с использованием методологии рекомбинантной ДНК. Как здесь используется, термин "фрагмент антитела" относится к одному или более участкам антитела, полученным модификацией цельных антител синтезом *de novo* с использованием методологий рекомбинантной ДНК, которые сохраняют специфичность связывания и функциональную активность. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fv, одноцепочечные антитела (ScFv), Fab, Fab', Fd (домены Vh и CH1), dAb (Vh и выделенный CDR); диатела и одноцепочечные диатела; и мультимерные варианты этих фрагментов (например,  $F(ab)_2$ ) с одинаковой специфичностью связывания. Фрагменты антител также могут быть включены в привитые цитокиновые белки для достижения специфичности и активности связывания, обеспеченных здесь.

Как здесь используется, Fab-фрагмент включает вариабельный домен тяжелой цепи, домен CH1 константной области, вариабельный домен легкой цепи и домен CL константной области легкой цепи. Взаимодействие доменов стабилизируется дисульфидной связью между доменами CH1 и CL. В некото-

рых вариантах осуществления домены тяжелой цепи в Fab находятся в порядке от N-конца к C-концу, VH-CH и домены легкой цепи Fab находятся в порядке от N-конца к C-концу, VL-CL. В некоторых вариантах осуществления домены тяжелой цепи Fab находятся в порядке от N-конца к C-концу, CH-VH и домены легкой цепи Fab находятся в порядке CL-VL. Хотя исторически Fab были получены посредством расщепления папаином интактного иммуноглобулина, в контексте настоящего описания "Fab" обычно получают рекомбинантно любым способом. Каждый Fab-фрагмент является одновалентным в отношении связывания антигена, т.е. он имеет один антигенсвязывающий участок.

"Определяющие комплементарность участки" или "определяющие комплементарность области" ("CDR") взаимозаменяемо относятся к гипервариабельным областям  $V_L$  и  $V_H$ . CDR представляют сайт, связывающийся с белком-мишенью, цепей антител, который обладает специфичностью для такого белка-мишени. В каждой  $V_L$  или  $V_H$  человека имеется три CDR (CDR1-3, пронумерованных последовательно от N-конца), составляющих примерно 15-20% вариабельных доменов. CDR структурно комплементарны эпитопу белка-мишени и, таким образом, непосредственно ответственны за специфичность связывания. Остальные участки VL или VH, так называемые каркасные области (FR), демонстрируют меньшую вариабельность в аминокислотной последовательности (Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000).

Положения CDR и каркасных областей можно определить с использованием различных хорошо известных в данной области систем нумерации, например по Kabat, Chothia, международной базе данных по иммуногенетике ImMunoGeneTics (IMGT) и AbM (см., например, Johnson et al., Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature, 342:877-883 (1989); Chothia et al., J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani et al., J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997)). Определение антигенсвязывающих участков также описано в следующих публикациях: Ruiz et al., Nucleic Acids Res., 28:219-221 (2000); Lefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001); MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996) и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989); Martin et al., Methods Enzymol., 203:121-153 (1991); и Rees et al., In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996).

Согласно системе нумерации по Kabat CDR в  $V_H$  состоят из аминокислотных остатков 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и CDR в  $V_L$  имеют аминокислотные остатки 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). Согласно системе нумерации по Chothia CDR в  $V_H$  состоят из аминокислот 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и CDR в  $V_L$  имеют аминокислотные остатки 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). Комбинируя определения CDR по Kabat и Chothia, CDR состоят из аминокислотных остатков: 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в человеческой  $V_H$  и из аминокислотных остатков: 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в человеческой  $V_L$ .

Как здесь используется, термин "вариабельная область легкой цепи антитела" или "вариабельная область тяжелой цепи антитела" относится к полипептиду, содержащему  $V_L$  или  $V_H$ , соответственно. Эндогенная  $V_L$  кодируется генными сегментами V (вариабельный) и J (соединительный), и эндогенная  $V_H$  посредством V, D (разнообразия) и J. Каждая из  $V_L$  или  $V_H$  включает CDR, а также каркасные области (FR). Термин "вариабельная область" или "V-область" взаимозаменяемо относится к тяжелой или легкой цепи, содержащей FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. V-область может представлять встречающуюся в природе, рекомбинантную или синтетическую. В настоящей заявке легкие цепи антител и/или тяжелые цепи антител могут в некоторых случаях совместно называться "цепями антител". Как представлено и описано далее в настоящем документе, "вариабельная область легкой цепи антитела" или "вариабельная область тяжелой цепи антитела" и/или "вариабельная область" и/или "цепь антитела" необязательно содержат полипептидную последовательность цитокина, привитую в CDR.

C-концевой участок тяжелой цепи иммуноглобулина, как здесь описано, содержащий, например, домены CH2 и CH3, представляет "Fc-область". Термин "Fc-область" в контексте настоящего описания относится к константной области антитела без первого домена константной области иммуноглобулина (CH1). Fc относится к двум последним доменам константной области иммуноглобулинов IgA, IgD и IgG и к трем последним доменам константной области иммуноглобулинов IgE и IgM, и также к N-концу гибкой шарнирной области этих доменов. Для IgA и IgM Fc может включать J-цепь. Для IgG Fc включает домены иммуноглобулина C $\gamma$ 2 и C $\gamma$ 3 и шарнирную область между C $\gamma$ 1 и C $\gamma$ . В данной области техники понятно, что границы Fc-области могут варьироваться, однако Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG обычно определяется как содержащая остатки C226 или P230 до его карбоксильного конца с использованием системы нумерации ЕС, как описано в публикации Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.). Термин "Fc-область" может относиться к этой области самостоятельно или к этой области в контексте антитела или фрагмента антитела. "Fc-область" включает встречающиеся в природе аллельные варианты Fc-области, например, в области CH2 и CH3, включая, например, модификации, которые модулируют эффекторную функцию. Fc-области также включают варианты, которые не приводят к изменениям биологической функции. Например, делеция одной или более аминокислот с N-конца или C-конца Fc-области иммуноглобулина не приводит к существенной потере биологической функции. Например, в некоторых вариантах осуществления C-концевой

лизин модифицируется, заменяется или делецируется. В конкретных вариантах осуществления один или более С-концевых остатков в Fc-области изменены или делецированы. В некоторых вариантах осуществления один или более С-концевых остатков в Fc (например, концевой лизин) делецированы. В еще одних некоторых вариантах осуществления один или более С-концевых остатков в Fc замещены альтернативной аминокислотой (например, замещению подвергается концевой лизин). Такие варианты выбираются в соответствии с общими правилами, известными в данной области техники, чтобы оказывать минимальное влияние на активность (см., например, Bowie et al., *Science* 247: 306-1310, 1990). Fc-область представляет участок иммуноглобулина (Ig), распознаваемый клеточными рецепторами, такими как FcR, и с которой связывается белок активации комплемента C1q. Нижняя шарнирная область, которая кодируется в 5'-участке экзона CH2, обеспечивает гибкость антитела для связывания с рецепторами FcR.

"Химерное антитело" представляет молекулу антитела, в которой: (а) константная область или ее часть изменена, заменена или обменена таким образом, что антигенсвязывающий участок (вариабельная область) связывается с константной областью другого или измененного класса, эффекторной функцией и/или вида или совершенно другой молекулой, которая придает химерным антителам новые свойства, например, с ферментом, токсином, гормоном, ростовым фактором и лекарственным средством; или (b) вариабельная область или ее часть изменена, заменена или обменена вариабельной областью, имеющей другую или измененную антигенную специфичность.

"Гуманизованное" антитело представляет антитело, которое сохраняет реактивность (например, специфичность связывания, активность) антитела, отличного от человеческого, и в то же время является менее иммуногенным для человека. Это может быть достигнуто, например, сохранением "нечеловеческих" участков CDR и заменой оставшихся частей антитела человеческими аналогами. См., например, Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3): 169-217 (1994).

"Человеческое антитело" включает антитела, имеющие вариабельные области, в которых как каркасные области, так и области CDR получены из последовательностей человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, то константная область также получена из таких человеческих последовательностей, например, последовательностей человеческой зародышевой линии, или мутированных вариантов последовательностей человеческой зародышевой линии или антитела, содержащего консенсусные каркасные последовательности, полученные из человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в публикации Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296: 57-86, 2000). Человеческие антитела могут включать аминокислотные остатки, не кодированные человеческими последовательностями (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro*, или соматической мутацией *in vivo*, или консервативная замена для обеспечения стабильности или производства).

Термин "выделенный" применительно к нуклеиновой кислоте или белку означает, что нуклеиновая кислота или белок по существу не содержат других клеточных компонентов, с которыми они связаны в естественном состоянии. Предпочтительно находятся в гомогенном состоянии. Могут находиться в сухом виде или в водном растворе. Чистоту и однородность обычно определяют с использованием методов аналитической химии, таких как электрофорез в полиакриламидном геле или жидкостная хроматография высокого давления. Белок, который является преобладающим видом, присутствующим в препарате, в значительной степени очищен. В частности, выделенный ген отделен от открытых рамок считывания, которые фланкируют ген и кодируют белок, отличный от представляющего интерес гена. Термин "очищенный" означает, что нуклеиновая кислота или белок дают по существу одну полосу в геле-электрофорезе. В частности, это означает, что нуклеиновая кислота или белок имеют чистоту по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%.

Термин "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) или рибонуклеиновой кислоте (РНК) и их полимерам в одноцепочечной или двухцепочечной форме. Если конкретно не ограничивается, то термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают свойствами связывания, сходными с референтной нуклеиновой кислотой, и метаболизируются аналогично встречающимся в природе нуклеотидам. Если не указано иное, то конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также включает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, также как четко указанную последовательность. В частности, замены вырожденных кодонов могут быть получены созданием последовательностей, в которых в третьем положении одного или более выбранных (или всех) кодонов произведена замена смешанным основанием и/или остатками дезоксиинозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.*, 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260: 2605-2608 (1985) и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8: 91-98 (1994)).

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" в контексте настоящего описания используются взаимозаменяемо для обозначения полимера, состоящего из аминокислотных остатков. Термины применимы к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный полученный химическим путем миметик соответствующей встречающейся в есте-

ственных условиях аминокислоты, а также к встречающимся в естественных условиях аминокислотным полимерам и не встречающимся в естественных условиях аминокислотным полимерам. Как здесь используется, термин "пептид или белок, содержащий EDB-связывающий домен", относится к пептиду или белку, который в целом или за счет его участка/фрагмента связывается с EDB, т.е. фибронектином, содержащим экстрадомен В.

Как правило, пептид может представлять, например, мономерную молекулу, имеющую длину  $\geq 3$  аминокислотных остатков и  $\leq 50$  аминокислотных остатков (следовательно, представлять олиго- или полипептид), тогда как белок может, например, быть мономерной или би- или полимерной молекулой с одним или несколькими белками, каждая цепь которых имеет длину  $\geq 50$  аминокислотных остатков.

Термин "аминокислота" относится к встречающимся в естественных условиях и синтетическим аминокислотам, а также к аминокислотным аналогам и аминокислотным миметикам, которые функционируют аналогично встречающимся в естественных условиях аминокислотам. Встречающиеся в естественных условиях аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также аминокислоты, которые затем модифицируются, например, такие как гидроксипролин,  $\alpha$ -карбоксихлутамин и  $O$ -фосфосерин. Понятие "аминокислотные аналоги" относится к соединениям, которые имеют такую же основную химическую структуру, что и встречающаяся в естественных условиях аминокислота, т.е. имеют атом углерода в альфа-положении, который связан с атомом водорода, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, например гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид и метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированный пептидный каркас, но сохраняют такую же химическую структуру, что и встречающаяся в естественных условиях аминокислота. Термин "аминокислотные миметики" относится к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличную от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют аналогично встречающейся в естественных условиях аминокислоте.

Термин "консервативно модифицированные варианты" относится как к аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновой кислоты. Относительно конкретных последовательностей нуклеиновой кислоты, то консервативно модифицированные варианты относятся к таким нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или в случае, когда нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, к практически идентичным последовательностям. За счет вырожденности генетического кода любой конкретный белок кодируется большим количеством функционально идентичных нуклеиновых кислот. Например, кодоны GCA, GCC, GCG и GCU все кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором аланин кодируется кодоном, кодон можно заменять на любые соответствующие известные кодоны без изменения кодируемого полипептида. Такие варианты нуклеиновой кислоты являются "молчащими вариациями", которые представляют собой один из видов консервативно модифицированных вариантов. В контексте настоящего описания подразумевается, что каждая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, включает также все возможные "молчащие вариации" нуклеиновой кислоты. Специалисту в данной области должно быть понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который, как правило, является единственным кодоном метионина, и TGG, который, как правило, является единственным кодоном триптофана) можно модифицировать с получением функционально идентичной молекулы. Следовательно, для каждой описанной последовательности подразумевается каждая "молчащая вариация" нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид.

Относительно аминокислотных последовательностей, то специалисту в данной области должно быть понятно, что отдельные замены, делеции или добавления в последовательности нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, которые изменяют, добавляют или делецируют одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот в кодируемой последовательности, приводят к получению консервативно модифицированного варианта, в котором изменение приводит к замене аминокислоты на химически сходную аминокислоту. Перечень консервативных замен, обеспечивающих получение функционально аналогичных аминокислот, хорошо известен в данной области. Такие консервативно модифицированные варианты в дополнении и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели. Каждая из следующих 8 групп содержит аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг друга: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T) и 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins (1984)).

В этом контексте "консервативная аминокислотная замена", как здесь используется, оказывает меньшее влияние на функцию антитела, чем неконсервативная замена. Несмотря на то, что существует много способов классификации аминокислот, часто их разделяют на шесть основных групп на основе их структуры и общих химических характеристик их R-групп.

В некоторых вариантах осуществления "консервативная аминокислотная замена" представляет за-

мену, при которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Например, в данной области были определены семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты, содержащие основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Другие консервативные аминокислотные замены также могут иметь место в семействах аминокислотных боковых цепей, например, при замене аспарагина на аспарагиновую кислоту для модификации заряда пептида. Консервативные изменения могут дополнительно включать замену химически гомологичных природных аминокислот (т.е. синтетической неприродной гидрофобной аминокислоты вместо лейцина, синтетической неприродной ароматической аминокислоты вместо триптофана).

"Процент идентичности последовательности" определяется сравнением двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, где часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. гэпы) по сравнению с референсной последовательностью (например, полипептидом), которая не содержит добавления или делеции, для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывают определением числа положений, в которых в обеих последовательностях находится идентичный нуклеотид или аминокислотный остаток, в результате чего получают число совпадающих положений, делением числа совпавших положений на общее число положений в окне сравнения и умножением результата на 100 с получением процента идентичности последовательностей.

Термины "идентичный" или процент "идентичности" в отношении двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми последовательностями. Две последовательности являются "по существу идентичными", если две последовательности имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т.е., по меньшей мере, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей в указанной области или, если она не указана, то во всей последовательности референсной последовательности), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или в определенной области, измеренной с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или выравниванием вручную и визуальным анализом. Раскрытие обеспечивает полипептиды или полинуклеотиды, которые по существу идентичны полипептидам или полинуклеотидам, соответственно, приведенным в качестве примера в настоящем документе. Необязательно, идентичность имеет место в области, длина которой составляет, по меньшей мере, примерно 15, 25 или 50 нуклеотидов или, более предпочтительно, в области длиной от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов или по всей длине референсной последовательности. В отношении аминокислотных последовательностей, то идентичность или существенная идентичность может иметь место в области длиной по меньшей мере 5, 10, 15 или 20 аминокислот, необязательно, по меньшей мере примерно 25, 30, 35, 40, 50, 75 или 100 аминокислот, необязательно, по меньшей мере, длиной примерно 150, 200 или 250 аминокислот или по всей длине референсной последовательности. Что касается более коротких аминокислотных последовательностей, например, аминокислотных последовательностей из 20 или менее аминокислот, то существенная идентичность имеет место, когда один или два аминокислотных остатка консервативно замещены в соответствии с консервативными заменами, определенными здесь выше.

Термины "субъект", "пациент" и "индивидуум" взаимозаменяемо относятся к млекопитающему, например человеку или млекопитающему примату, отличному от человека. Млекопитающее также может представлять лабораторное животное, относящееся к млекопитающим, например мышь, крыса, кролик, хомяк. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее может представлять млекопитающее, сельскохозяйственное животное (например, лошадь, овца, бык, свинья, верблюд) или млекопитающее, домашнее животное (например, собаку, кошку).

Как здесь используются, термины "лечить", "лечение" или "проводить лечение" любого заболевания или расстройства относятся в некоторых вариантах осуществления к ослаблению заболевания или расстройства (т.е. замедлению или остановке или уменьшению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В еще одном варианте осуществления "лечить", "лечение" или "проводить лечение" относится к ослаблению или улучшению по меньшей мере одного физического параметра, включая параметры, которые могут быть не заметными для самого пациента. В еще одном варианте осуществления "лечить", "лечение" или "проводить лечение" относится к модуляции заболевания или расстройства физически (например, стабилизации заметного симптома), физиологически (например, стабилизации физического параметра), или обоих. В еще одном варианте осуществления "ле-

чить", "лечение" или "проводить лечение" или "профилактика" относится к предупреждению или задержке начала или развития или прогрессирования заболевания или расстройства.

Термин "совместное введение" относится к одновременному присутствию двух (или более) активных агентов в организме субъекта. Активные агенты, которые вводятся совместно, можно доставлять одновременно или последовательно.

Различные аспекты изобретения подробно описаны в следующих разделах. Деление на разделы не предназначено для ограничения изобретения. Каждый раздел может быть применим к любому аспекту изобретения. Изобретение не ограничивается конкретными составными частями описанных композиций или стадиями процесса способов, описанных, поскольку такие композиции и способы могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, использованная здесь, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения.

Как используется в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения, артикли единственного числа "a", "an" и "the" включают ссылки на единственное и/или множественное число, если контекст явно не диктует иное. В данной заявке использование "или" означает "и/или", если не указано иное. Кроме того, следует понимать, что в случае указания диапазонов параметров, которые ограничены числовыми значениями, полагается, что диапазоны включают эти ограничительные значения. Раскрытия всего уровня техники, цитированные здесь, включены посредством ссылки во всей их полноте.

Термин "линкер GS", используемый здесь, относится к пептидному линкеру, который состоит преимущественно или исключительно из остатков глицина и серина (также называемому "линкером Gly-Ser"). В различных вариантах осуществления линкер GS представляет собой линкер с последовательностью, показанной здесь в любой из SEQ ID NO: 2, 6 или 8.

В этом контексте "консервативная аминокислотная замена", как здесь используется, оказывает меньшее влияние на функцию антитела, чем неконсервативная замена. Несмотря на то, что существует много способов классификации аминокислот, часто их разделяют на шесть основных групп на основе их структуры и общих химических характеристик их R-групп.

Как здесь используется, термин "аффинность связывания с мишенью" относится к аффинности связывающей молекулы по изобретению с ее мишенью и численно выражается с использованием значений "KD". В общем, более высокое значение KD соответствует более слабому связыванию. В некоторых вариантах осуществления "KD" измеряют с помощью анализа связывания радиоактивно меченого антигена (МА) или анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием, например, систем VIAcore™-2000 или VIAcore™-3000. В некоторых вариантах осуществления также определяют "скорость ассоциации" или "kon" и "скорость диссоциации" или "koff" с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В дополнительных вариантах осуществления "KD", "скорость ассоциации" и "скорость диссоциации" измеряются с использованием систем Octet®.

Как здесь используется, выражение "конкурирует за связывание" используется в отношении одного из антител, определенного последовательностями, указанными выше, означая, что фактическое антитело имеет активность, с которой оно связывается с той же мишенью или тем же эпитопом-мишенью, или доменом, или субдоменом, что и указанное антитело, определенное последовательностью, и является вариантом последнего. Эффективность (например, кинетика или термодинамика) связывания может быть такой же или более высокой или более низкой, чем эффективность последнего. Например, константа равновесия связывания для связывания с субстратом может быть различной для двух антител.

Как здесь используется, выражение "сохранение способности связываться с данной мишенью" означает, например, что соответствующий вариант имеет аффинность связывания с мишенью на уровне  $\geq 50\%$  по сравнению с таковой у немодифицированного пептида.

#### **EDB фибронектина**

Фибронектин (UniProt: P02751) представляет собой высокомолекулярный (~440 кДа) гликопротеин внеклеточного матрикса, который связывается с белками мембранных рецепторов, называемыми интегринами. Подобно интегринам фибронектин связывается с компонентами внеклеточного матрикса, такими как коллаген, фибрин и гепарансульфат-протеогликианы (например, синдеканы).

Фибронектин участвует в развитии рака. В карциноме легкого экспрессия фибронектина повышается, особенно в мелкоклеточной карциноме легкого. Адгезия клеток карциномы легкого к фибронектину повышает онкогенность и придает резистентность к химиотерапевтическим агентам, индуцирующим апоптоз. Фибронектин может стимулировать рост/выживаемость опухоли легкого и резистентность к терапии, и обсуждалось, что он представляет новую мишень для разработки новых противоопухолевых лекарств.

Фибронектин существует в виде белкового димера, состоящего из двух практически идентичных мономеров, связанных парой дисульфидных связей. Белок фибронектина продуцируется из одного гена, но альтернативный сплайсинг предшественника его мРНК из одной копии гена фибронектина имеет место в трех сайтах, кодирующих домены EDA, EDB и ИСКС, и приводит к появлению нескольких изоформ.

Изоформы фибронектина, содержащие домены EDA или EDB, известны как онкофетальные формы благодаря их роли в эмбриональном развитии и их ограниченному присутствию в нормальных тканях

взрослого человека. Эти изоформы также признаны важными маркерами ангиогенеза, критического физиологического процесса в период развития и необходимого для опухолевых клеток при прогрессировании рака. EDВ фибронектина экспрессируется в опухолевых тканях, особенно в карциномах молочной железы, опухолях головного мозга, клетках лимфомы и карциноме предстательной железы. За счет своего тканеспецифического профиля экспрессии EDВ фибронектина является привлекательным опухолевым антигеном для применения в таргетной терапии.

### IL-12

Интерлейкин-12 представляет гетеродимерный цитокин с многочисленными биологическими эффектами на иммунную систему. Он состоит из двух субъединиц, p35 и p40, которые необходимы для секреции активной формы IL-12, p70. Интерлейкин-12 продуцируется дендритными клетками (DC), приводя к повышению созревания и презентации антигенов, что позволяет инициировать Т-клеточный ответ на опухолеспецифические антигены. Он также регулирует секрецию IL-12 DC, создавая механизм положительной обратной связи для усиления ответа. После инициирования ответа IL-12 играет фундаментальную роль в регуляции иммунной системы профилем Th1-цитокинов, индуцируя CD4+ Т-клетки на секрецию интерферона-гамма (IFN- $\gamma$ ) и приводя к ответу цитотоксических CD8+ Т-клеток.

IL-12 также является сильным провоспалительным цитокином, который приводит к секреции других цитокинов, включая фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ), который в сочетании с IFN- $\gamma$  является условием для продукции цитотоксических CD4+ Т-лимфоцитов (CTL). Кроме того, IL-12 может стимулировать активацию клеток врожденного иммунитета, таких как макрофаги и эозинофилы, посредством индукции IFN- $\gamma$  и других цитокинов. Затем эта активация приводит к секреции IL-12 этими клетками и дальнейшей амплификации ответов как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Однако высокие уровни IL-12 и, следовательно, IFN- $\gamma$ , также ассоциировались с индукцией антагонистических молекул, таких как IL-10, и истощением сигнальных молекул даунстрим IL-12, таких как STAT4.

Предшествующие попытки применения IL-12 в качестве терапевтического средства были безуспешными, поскольку IL-12 в лучшем случае демонстрировал умеренные противоопухолевые эффекты, которые часто сопровождалась неприятно высокими токсическими побочными эффектами, включающими лихорадку, утомляемость, гематологические изменения, гипергликемию и/или дисфункцию органов.

Термин "p35", используемый здесь, означает полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной ниже:

```
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLRLRAVSNNMLQKARQTLEFYPCSTSEEIDHEDITKDKTST
VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSYEDLKMYQVEFKTM
NAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHA
FRIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO: 3)
```

Термин "p40", используемый здесь, означает полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной ниже:

```
IWELKKDVYVVELDWYDPAGEMVVLTCDTPEEDGITWLDQSSEVLGSGKTL
TIQVKEFGDAGQYTCCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKPKNKTLRCEAK
NYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEC
QEDSACPAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSFFIRDIIKPPPKNLQKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD
RYYSWSEWASVPCS (SEQ ID NO:1)
```

Как здесь используется, термин "IL-12" означает полипептид, который (i) включает обе:

(a) p35 или ее фрагмент, где p35 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной ниже:

```
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLRLRAVSNNMLQKARQTLEFYPCSTSEEIDHEDITKD
KTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSYEDLKMYQVE
FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPPQKSSLEEDFYKTKIKLC
ILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO:3)
```

и

(b) p40 или ее фрагмент, где p40 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной ниже:

```
IWELKKDVYVVELDWYDPAGEMVVLTCDTPEEDGITWLDQSSEVLGSGKTL
TIQVKEFGDAGQYTCCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKPKNKTLRCEAK
NYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEC
QEDSACPAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSFFIRDIIKPPPKNLQKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD
RYYSWSEWASVPCS (SEQ ID NO:1)
```

и (ii) могут активировать рецептор IL-12.

### Линкеры

В некоторых вариантах осуществления один или более пептидных линкеров независимо выбраны из последовательности  $(\text{Gly}_n\text{-Ser})_m$ , последовательности  $(\text{Gly}_n\text{-Ala})_m$  или любой комбинации последовательности  $(\text{Gly}_n\text{-Ser})_m/(\text{Gly}_n\text{-Ala})_m$ , где каждый  $n$  независимо представляет собой целое число от 1 до 5, и каждый  $m$  независимо представляет собой целое число от 0 до 10. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет  $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_m$ , где  $m$  представляет целое число от 0 до 10. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет  $(\text{Gly}_4\text{-Ala})_m$ , где  $m$  представляет целое число от 0 до 10. Примеры линкеров включают, не ограничиваясь этим, некоторые варианты осуществления, где один или более линкеров включают повторы  $\text{G}_4\text{S}$ , например линкер  $\text{Gly-Ser GGGGS}$  (SEQ ID NO: 34), или  $(\text{GGGS})_m$ , где  $m$  представляет положительное целое число, равное или большее 1. Например,  $m=1$ ,  $m=2$ ,  $m=3$ ,  $m=4$ ,  $m=5$  и  $m=6$ ,  $m=7$ ,  $m=8$ ,  $m=9$  и  $m=10$ . В некоторых вариантах осуществления линкер включает несколько повторов  $\text{GGGS}$  (SEQ ID NO: 34), в том числе, не ограничиваясь этим,  $(\text{GGGS})_3$  или  $(\text{GGGS})_4$ . В некоторых вариантах осуществления  $\text{Ser}$  может быть заменен на  $\text{Ala}$ , например, линкеры  $\text{G/A}$ , такие как  $(\text{GGGA})_m$  (SEQ ID NO: 35) или  $(\text{GGGA})_m$ , где  $m$  представляет собой положительное целое число, равное или большее 1. В некоторых вариантах осуществления линкер включает несколько повторов  $\text{GGGA}$  (SEQ ID NO: 35). В еще одних вариантах осуществления линкер включает комбинации и множество  $\text{GGGS}$  (SEQ ID NO: 34) и  $\text{GGGA}$  (SEQ ID NO: 35).

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность  $\text{GGGSGGGSGGGGS}$  (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность  $\text{GSADGGSSAGGSDAG}$  (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность  $\text{GSSGG}$  (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность  $\text{SSSSGSSSSGSSSSG}$  (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность  $\text{GGGAKGGGKAGGGS}$  (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность  $\text{GGGDGGGDGGGS}$  (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность  $\text{GGGSGGGEGGGGS}$  (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность  $\text{AEAAAKEAAAKEAAKA}$  (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность  $\text{APAPAPAPAP}$  (SEQ ID NO: 14). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность  $\text{APAPAPAPAPAP}$  (SEQ ID NO: 15).

### IL-12, связанный с анти-EDB антителом

Настоящее изобретение обеспечивает, среди прочего, способы и композиции для лечения заболеваний или расстройств, ассоциированных с экспрессией EDB фибронектина, включая рак. Описанное здесь представляет новые композиции и способы, в которых фибронектин используется в качестве мишени для достижения нацеленной на злокачественную опухоль доставки IL-12. Такой подход обещает полноценно использовать терапевтический потенциал IL-12, одновременно снижая системную токсичность и увеличивая терапевтическое окно IL-12.

Несмотря на то, что ранее были описаны другие конструкты, содержащие IL-12 и домен, нацеленный на EDB фибронектина, раскрытые в настоящее время композиции удивительно превосходят их.

В международной заявке WO2006/119897, содержание которой включено здесь посредством ссылки, раскрыты три различных молекулярных формата IL-12 в комбинации с антителом, направленным на EDB фибронектина, названным "L19".

Одним из форматов был  $\text{sc(IL-12)-scFv}$  (L19), показанный на фиг. 7А. Данный формат, состоящий из гетеродимера IL-12, в котором две субъединицы соединены через пептидный линкер (отсюда "одноцепочечный" IL-12 или  $\text{sc(IL-12)}$ ), и где указанный IL-12 затем соединяется, через второй пептидный линкер, с антителом L19, которое также находится в формате одноцепочечного Fv (следовательно,  $\text{scFv(L19)}$ ). Такой формат показал среднюю способность к нацеливанию на опухоль, что согласуется с результатами предшествующего уровня техники.

Еще одним форматом был гомодимер  $\text{sc(IL-12)-SIP(L19)}$ , показанный на фиг. 7В. Формат SIP ("небольшой иммунный белок") был разработан и представлен заявителями в WO 2003/076469 и также называется "миниантителом". SIP представляет гомодимер, состоящий из двух субъединиц, содержащих  $\text{scFv}$ , соединенный с доменом  $\text{CH}_4$ . Два домена  $\text{CH}_4$  соединены друг с другом дисульфидным мостиком. Несмотря на то, что предшествующий уровень техники указывает на то, что нацеливающие на опухоль свойства L19 можно улучшить с использованием формата SIP, не наблюдали повышенного поглощения этого конъюгата опухолями.

Еще один формат представлял гетеродимер из субъединиц p40 и p35 IL-12, соединенных друг с другом дисульфидным мостиком, и где каждая субъединица была слита с  $\text{scFv(L19)}$ , образуя гетеродимер  $\text{scFv(L19)-p35/p40-scFv(L19)}$ , показанный на фиг. 7С. С этим гетеродимерным форматом было достигнуто заметное улучшение поглощения композиции опухолями.

В международной заявке WO2013/014149, содержание которой включено здесь посредством ссылки

ки, раскрывается два новых альтернативных молекулярных формата IL-12, соединенных с антителом против EDA фибронектина, названным "F8".

В данном случае другой формат иммуноконъюгатов IL-12 включает "одноцепочечное диатело". По существу, он состоит из двух scFv антител с коротким линкером из 5 аминокислот (тем самым, образуется "диатело"), соединенных друг с другом более длинным пептидным линкером из 15 аминокислот.

Было показано, что молекулярный формат, включающий IL-12, слитый с моноспецифическим одноцепочечным диателом F8 (см. фиг. 8B), оказался улучшенным вариантом с точки зрения нацеливания на опухоль за счет: (i) гетеродимера scFv(F8)-p35/p40-scFv(F8) (фиг. 8A), который в своем варианте L19 оказался лучшим форматом, раскрытым в WO 2006/119897, или (ii) двух молекул IL-12, соединенных с диателом (фиг. 8C).

### L19

"Антитело L19" в контексте настоящего описания означает любое антитело, которое связывается с EDB фибронектина или любым его участком и содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность, по меньшей мере, на уровне 75% с одной или несколькими из следующих аминокислотных последовательностей:

VH L19 (SEQ ID NO: 7)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSS  
GTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVTVSS

VL L19 (SEQ ID NO: 5)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRA  
TGIPDRFSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK

CDR1 VH (SEQ ID NO: 28)

SFSMS

CDR2 VH (SEQ ID NO: 29)

SISGSSGTTYADSVKGR

CDR3 VH (SEQ ID NO: 30)

PFYFDY

CDR1 VL (SEQ ID NO: 31)

RASQSVSSSFLA

CDR2 VL (SEQ ID NO: 32)

YASSRAT

CDR3 VL (SEQ ID NO: 33)

QQTGRIPPT

Диатело L19 (SEQ ID NO: 36)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSS  
GTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVTVSSGSSGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYAS  
SRATGIPDRFSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK

### Фармацевтические композиции

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей, по меньшей мере, один конъюгат по изобретению и, необязательно, фармацевтически приемлемый эксципиент.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению обычно содержат терапевтически эффективное количество конъюгата по изобретению и необязательно вспомогательные вещества, такие как фармацевтически приемлемый эксципиент(ы). Указанные фармацевтические композиции получают способами, хорошо известными в области фармации. Носитель или эксципиент может представлять собой жидкое вещество, которое может служить в качестве носителя или среды для активного ингредиента. Подходящие носители или эксципиенты хорошо известны в данной области и включают, например, стабилизаторы, антиоксиданты, агенты, регулирующие pH, эксципиенты для контролируемого высвобождения.

Фармацевтический препарат по изобретению можно адаптировать, например, для парентерального применения и можно вводить пациенту в форме растворов или тому подобное. Составы, содержащие композицию по настоящему изобретению, можно вводить пациенту. Введение предпочтительно проводят в "терапевтически эффективном количестве", которое достаточно для того, чтобы оказать пациенту положительное действие. Такой положительный эффект может представлять, по меньшей мере, ослабление по меньшей мере одного симптома. Фактическое количество, предназначенное для введения, а также скорость и время введения будут зависеть от характера и тяжести заболевания, которое подвергается лечению. Назначение схему лечения, например, решение о дозах и т.д., находится в ведении врачей общей практики и других медицинских специалистов. Лечение можно повторять ежедневно, два раза в не-

делю, раз в неделю или раз в месяц по усмотрению врача.

Фармацевтические композиции для перорального введения могут находиться в форме таблеток, капсул, порошка или жидкости. Таблетка может содержать твердый носитель, такой как желатин или адьювант. Жидкие фармацевтические композиции обычно содержат жидкий носитель, такой как вода, нефтепродукт, животные жиры или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Можно включить физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

Для внутривенной инъекции или инъекции в очаг поражения активный ингредиент должен находиться в форме водного раствора, приемлемого для парентерального введения, который не содержит пирогенов и имеет подходящее значение pH, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области техники могут приготовить подходящие растворы, используя, например, изотонические носители, такие как инъекционный раствор хлорида натрия, инъекционный раствор Рингера, инъекционный раствор Рингера лактата. При необходимости можно включить консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

Кроме того, следует понимать, что варианты осуществления, раскрытые здесь, не следует истолковывать как отдельные варианты осуществления, которые не относятся друг к другу. Признаки, обсуждаемые в связи с конкретным вариантом осуществления, предназначены для раскрытия также в связи с другими вариантами осуществления, приведенными здесь. Если в одном случае конкретный признак не раскрыт в одном варианте осуществления, но раскрыт в другом, то специалисту в данной области техники будет понятно, что это не обязательно означает, что указанный признак не предназначен для раскрытия в сочетании с указанным другим вариантом осуществления. Специалисту должно быть понятно, что сущность данной заявки состоит в том, чтобы раскрыть указанный признак также для другого варианта осуществления, но это сделано просто для целей ясности и для сохранения заявки в легко контролируемом объеме.

Кроме того, содержание ссылок, упомянутых здесь, включено посредством ссылки. В частности, это относится к документам предшествующего уровня техники, которые раскрывают стандартные или рутинные методы. В этом случае включение посредством ссылки в основном имеет целью обеспечить достаточное раскрытие информации и избежать длительных повторов.

Как правило, композиция по изобретению способна связываться со специфическими структурами-мишенями в клетке, ткани, органе или в организме пациента, где эти структуры-мишени определяются специфичностью пептида или белка, содержащего EDB-связывающий домен.

Попав в мишень, IL-12 стимулирует выработку  $IFN\gamma$  из T-клеток и естественных клеток-киллеров, а также индуцирует дифференцировку Th1-хелперных клеток. IL-12 является ключевым медиатором врожденного и клеточного иммунитета. Если пептид или белок, содержащий EDB-связывающий домен в конструкторе, является специфичным для структуры-мишени, например, рецептора или белка внеклеточного матрикса, который характеризует новообразование, например, опухоль, гематологическое заболевание или клетки, находящиеся в процессе перерождения в раковые клетки, то связывание композиции индуцирует опосредованную IL-12 высокую противоопухолевую и антимагистатическую активность.

Заявители с удивлением обнаружили, что когда линкер, содержащий аминокислотный мотив, включающий GSADGGSSAGSDAG, используется для связывания IL-12 с пептидом или белком, содержащим EDB-связывающий домен (т. е. с диателом, раскрытым в WO 2013/014149), то может быть достигнута лучшая эффективность нацеливания на опухоль, а также превосходный выход продукта. В то же время, поведение связывания этого варианта превосходит поведение связывания варианта с более коротким линкером GSADGG, условно названного здесь "старым" и раскрытого в WO 2013/014149.

Заявители сначала оценили и охарактеризовали восемь клонов человеческого IL-12, связанного с антителом L19, в формате одноцепочечного диатела (huIL-12L19L19) с различными полипептидными линкерами между цитокином и одноцепочечным диателом L19.

Пять клонов, обозначенные: (i) "AKKAS", (ii) "DDS", (iii) "(G4S)<sub>3</sub>", (iv) "SAD" и (v) "SES", содержат линкеры для конъюгации иммуноцитокинов с рекомбинантными антителами, и они были выбраны за счет их различного электрического заряда (нейтральный, положительно заряженный, отрицательно заряженный).

Были разработаны три дополнительных клон, обозначенные: (vi) Alpha3, (vii) AP6 и (viii) AP7. В отношении этих трех клонов, то в данном случае были рассмотрены и реализованы на практике принципы, представленные в публикации Chen et al. (2013). В этом обзоре предполагается, что жесткие линкеры могут иметь лучшую стабильность и могут сохранять правильное расстояние между цитокином и антителом, повышая тем самым терапевтическую эффективность.

Ни один из линкеров (i)-(viii) ранее не тестировался на этом специфическом иммуноцитокине.

Неожиданно было обнаружено, что линкер "SAD" существенно повышает (i) эффективность нацеливания на опухоль и (ii) выход продукта IL-12, связанного с пептидом или белком, содержащим EDB-связывающий домен, без (iii) нарушения поведения связывания с EDB по сравнению с другими клонами. Это довольно удивительно, поскольку, несмотря на рассмотрение и использование принципов, изложенных в публикации Chen, только линкер SAD обеспечил композицию рядом превосходных свойств по

сравнению как со "старым" клоном (более подробно описанным ниже), так и с другими новыми вариантами, описанными здесь.

Наконец, девятый клон, обозначенный здесь как "старый", содержащий линкер, раскрытый в WO 2013/014149, использовали для сравнения с линкером "SAD". Неожиданно было обнаружено, что линкер "SAD", несмотря на то, что он имеет аналогичную первую часть последовательности, как в "старом" линкере, обладает превосходной аффинностью связывания с EDB.

Кроме того, результаты эксклюзионной хроматографии показали, что линкер "SAD" имеет более высокое относительное содержание мономера по сравнению со "старым" линкером, означая, что сборка полного конъюгата является более эффективной. Ожидается, что высокое относительное содержание мономера, обеспеченное линкером "SAD", увеличит общий выход продукта.

Как здесь используется, термин "одноцепочечное диатело" относится к конструктору из двух одноцепочечных Fv(scFv) антител с коротким линкером, предпочтительно длиной 3-10 аминокислот, более предпочтительно длиной 5 аминокислот (также известного как "диатело"), соединенные друг с другом более длинным линкером, предпочтительно длиной 5-20 аминокислот, более предпочтительно длиной 15 аминокислот, согласно следующей схеме (ориентация N→C): VHL9-линкер 3-VLL19-линкер 4-VHL19-линкер3-VLL19.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения первая субъединица гетеродимерного белка IL-12 представляет р40 и вторая субъединица представляет р35.

Как обсуждалось выше, изоформы фибронектина, содержащие домены EDA или EDB, известны как онкофетальные формы за счет их значения в процессах развития и их реэкспрессии в опухолях, в отличие от ограниченного присутствия в нормальных тканях взрослых субъектов.

Эти изоформы также признаны важными маркерами ангиогенеза, критического физиологического процесса в период развития и необходимого для опухолевых клеток при прогрессировании рака.

Следовательно экстрадомен В (EDB) фибронектина является привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии, включающей применение иммуноцитоклинов, как здесь обсуждается.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения одноцепочечное диатело может содержать антигенсвязывающий домен, имеющий определяющие комплементарность участки (CDR), или домены VH и/или VL антитела, способные специфически связываться с интересующим антигеном, например, один или более доменов CDR или VH и/или VL антитела, способных специфически связываться с антигеном экстрадомена В фибронектина.

Антигенсвязывающий домен может формироваться посредством расположения определяющих комплементарность участков (CDR). Структура для переноса CDR или ряда CDR, как правило, представляет собой последовательность тяжелой или легкой цепи антитела или ее существенную часть, в которой CDR или ряд CDR располагаются в положении, соответствующем CDR или ряду CDR встречающихся в природе переменных доменов VH и VL антител, кодированных перестроенными генами иммуноглобулина. Структуры и положения переменных доменов иммуноглобулина можно определить с использованием системы нумерации по Kabat et al. (1987) (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4<sup>th</sup> Edition, US Department of Health and Human Services) и ее обновленных вариантов, теперь доступных в Интернете (на [immuno.bme.nwu.edu](http://immuno.bme.nwu.edu) или найти "Kabat", используя любую поисковую систему).

Под участком CDR или CDR подразумевается гипервариабельная область тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, как определено в монографии Kabat et al. (1987) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 4<sup>th</sup> Edition, US Department of Health and Human Services (Kabat et al., (1991a), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5<sup>th</sup> Edition, US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington и более поздние издания). Обычно антитело содержит 3 CDR тяжелой цепи и 3 CDR легкой цепи. Термин CDR или CDRs используется здесь для того, чтобы указать, в зависимости от конкретного случая, один из этих участков или несколько участков, или даже все эти участки, которые содержат большинство аминокислотных остатков, ответственных за связывание с антигеном или эпитопом, за счет аффинности антитела, который оно распознает.

Таким образом, одноцепочечное диатело может содержать антигенсвязывающий участок, имеющий один, два, три, четыре, пять или шесть CDR или домены VH и/или VL антитела L19.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения одноцепочечное диатело может содержать антигенсвязывающий домен, имеющий определяющие комплементарность участки (CDR) антитела L19, представленные в SEQ ID NO: 28-33. Антигенсвязывающий участок может содержать домены VH и/или VL антитела L19, представленные в SEQ ID NO: 7 и 5 соответственно.

Антигенсвязывающий участок может содержать один, две, три, четыре, пять или шесть CDR антитела L19. Аминокислотные последовательности CDR L19 представляют

- SEQ ID NO: 28 (CDR1 VH);
- SEQ ID NO: 29 (CDR2 VH);
- SEQ ID NO: 30 (CDR3 VH);
- SEQ ID NO: 31 (CDR1 VL);
- SEQ ID NO: 32 (CDR2 VL) и/или
- SEQ ID NO: 33 (CDR3 VL).

Последовательности SEQ ID NO: 28-30 представляют аминокислотные последовательности участков CDR VH (1-3 соответственно) человеческого моноклонального антитела L19. Последовательности SEQ ID NO: 31-33 представляют аминокислотные последовательности участков CDR VL (1-3 соответственно) человеческого моноклонального антитела L19. Аминокислотная последовательность доменов VH и VL антитела L19 соответствует SEQ ID NO: 7 и 5 соответственно.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения одноцепочечное диатело содержит по меньшей мере одно из:

а) набора, содержащего 3 CDR тяжелой цепи, определенных здесь как SEQ ID NO: 28-30, и 3 CDR легкой цепи, определенных здесь как SEQ ID NO: 31-33;

б) набора из 3 CDR тяжелой цепи в VH, определенной здесь как SEQ ID NO: 7, и набора из 3 CDR легкой цепи в VL, определенной здесь как SEQ ID NO: 5;

с) комбинации CDR тяжелой цепи/CDR легкой цепи по п.а) или б), при условии, что по меньшей мере один из CDR имеет до 3 аминокислотных замен относительно соответствующего CDR, указанного в п. а) или б), одновременно сохраняя его способность связываться с экстрадоменом В (EDB) фибронектина;

д) комбинации CDR тяжелой цепи/CDR легкой цепи по п.а) или б), при условии, что по меньшей мере один из CDR имеет идентичность последовательности на уровне  $\geq 66\%$  относительно соответствующего CDR, указанного в п.а) или б), одновременно сохраняя свою способность связываться с экстрадоменом В (EDB) фибронектина;

где CDR вставлены в подходящий белковый каркас, чтобы быть способным связываться с экстрадоменом В (EDB) фибронектина.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один из CDR имеет идентичность последовательности на уровне  $\geq 67$ , предпочтительно  $\geq 68$ , более предпочтительно любую из  $\geq 69$ ,  $\geq 70$ ,  $\geq 71$ ,  $\geq 72$ ,  $\geq 73$ ,  $\geq 74$ ,  $\geq 75$ ,  $\geq 76$ ,  $\geq 77$ ,  $\geq 78$ ,  $\geq 79$ ,  $\geq 80$ ,  $\geq 81$ ,  $\geq 82$ ,  $\geq 83$ ,  $\geq 84$ ,  $\geq 85$ ,  $\geq 86$ ,  $\geq 87$ ,  $\geq 88$ ,  $\geq 89$ ,  $\geq 90$ ,  $\geq 91$ ,  $\geq 92$ ,  $\geq 93$ ,  $\geq 94$ ,  $\geq 95$ ,  $\geq 96$ ,  $\geq 97$ ,  $\geq 98$  или наиболее предпочтительно на уровне  $\geq 99\%$  относительно соответствующих CDR.

В еще одном варианте осуществления, по меньшей мере, один из CDR был модифицирован посредством созревания аффинности или других модификаций, что привело к модификации последовательности по сравнению с последовательностями, раскрытыми выше.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один из CDR имеет до 2, и предпочтительно 1 аминокислотную замену относительно соответствующего CDR, указанного в п.а) или б).

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения одноцепочечное диатело содержит по меньшей мере одно из:

а) доменов VH и VL антитела L19, представленных в SEQ ID NO: 7 и 5;

б) пары последовательностей переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи по п.а), при условии, что по меньшей мере один из доменов имеет идентичность последовательности на уровне  $\geq 80\%$  относительно SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 5, соответственно, и/или

с) пары последовательностей переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи по п.а), при условии, что по меньшей мере один из доменов имеет до 10 аминокислотных замен относительно SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 5 соответственно,

одновременно сохраняя свою способность связываться с экстрадоменом В (EDB) фибронектина.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из доменов имеет идентичность последовательности на уровне  $\geq 81$ , предпочтительно  $\geq 82$ , более предпочтительно  $\geq 83$ ,  $\geq 84$ ,  $\geq 85$ ,  $\geq 86$ ,  $\geq 87$ ,  $\geq 88$ ,  $\geq 89$ ,  $\geq 90$ ,  $\geq 91$ ,  $\geq 92$ ,  $\geq 93$ ,  $\geq 94$ ,  $\geq 95$ ,  $\geq 96$ ,  $\geq 97$ ,  $\geq 98$  или наиболее предпочтительно на уровне  $\geq 99\%$  относительно SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 5 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один из доменов имеет до 9, предпочтительно до 8, более предпочтительно до 7, 6, 5, 4, 3 или 2 и наиболее предпочтительно 1 аминокислотную замену относительно SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 5 соответственно.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, по меньшей мере, одна аминокислотная замена в одноцепочечном диателе представляет собой консервативную аминокислотную замену.

Согласно еще одному варианту осуществления композиция имеет полноразмерную структуру "[p40]-[линкер1]-[p35]-[линкерSAD]-[VHL19]-[линкер3]-[VLL19]-[линкер4]-[VHL19]-[линкер3]-[VLL19]".

Согласно еще одному варианту осуществления композиция имеет полноразмерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 16.

### Расстройства

Согласно еще одному аспекту изобретения обеспечивается применение композиции в соответствии с вышеприведенным описанием (для производства лекарственного средства) в лечении человека или животного, которому поставлен диагноз, страдает или подвержен риску развития неопластического заболевания, или для профилактики такого патологического состояния.

Согласно еще одному аспекту изобретения обеспечивается применение композиции по любому из вышеуказанных пунктов (для производства лекарственного средства) для ингибирования ангиогенеза у

человека или животного.

Таким образом, конъюгат, описанный здесь, можно использовать в способе лечения неопластического заболевания или ингибирования ангиогенеза посредством нацеливания PL-12 на новообразованные сосуды *in vivo*.

Термин "неопластическое заболевание" охватывает злокачественное перерождение клеток и рак, включая опухоли и гематологические заболевания.

Также обеспечивается способ лечения рака или ингибирования ангиогенеза посредством нацеливания агента, в частности терапевтического агента, например, PL-12 на новообразованные сосуды у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества конъюгата, описанного здесь, пациенту. Патологические состояния, поддающиеся лечению с использованием композиции, описанной здесь, включают рак, другие опухоли и неопластические состояния. Композицию можно использовать для ингибирования ангиогенеза и, следовательно, для лечения ревматоидного артрита, диабетической ретинопатии, возрастной мышечной дистрофии, ангиом, опухолей и рака. Лечение может включать профилактическое лечение. Композицию также можно применять для введения в диагностических способах, например, в нацеливании на и диагностике ангиогенеза, который может быть связан с любым из вышеуказанных патологических состояний. Другие заболевания и патологические состояния также можно диагностировать и лечить в соответствии с природой белкового терапевтического или диагностического агента, содержащегося в композиции, и специфичностью нацеливаемого участка.

Типы рака, подходящие для лечения, как здесь описано, включают любой тип солидной или несолидной опухоли или злокачественной лимфомы и, в частности, рака печени, лимфомы, лейкоза (например, острого миелоидного лейкоза), саркомы, рака кожи, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака матки, рака яичника, рака предстательной железы, рака легкого, колоректального рака, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака почки, рака желудка и рака головного мозга. Рак может иметь семейную историю или быть спорадическим. Рак может быть метастатическим или неметастатическим.

Предпочтительно рак представляет рак, выбранный из группы, включающей рак почки, рак молочной железы, рак печени, рак легкого, лимфому, саркому (например, гастроинтестинальную стромальную опухоль), рак кожи (например, меланому), колоректальный рак и нейроэндокринные опухоли.

В некоторых вариантах осуществления неопластическое заболевание характеризуется экспрессией или сверхэкспрессией EDB фибронектина.

Композиции по изобретению можно вводить пациенту, нуждающемуся в лечении, любым подходящим путем, обычно инъекцией в кровоток и/или непосредственно в участок, подлежащий лечению, например, опухоль или опухолевую сосудистую сеть. Точная доза и частота ее введения будут зависеть от ряда факторов, пути введения, размера и местоположения области, подлежащей лечению (например, опухоли).

В отношении ответственности субъект отвечает на лечение, если показатель рака (например, гематологический рак, например рост, пролиферация и/или выживаемость раковых клеток) у субъекта замедляется или уменьшается на детектируемую величину, например, примерно на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более, что определяют любым подходящим показателем, например массой, количеством или объемом клеток. В одном примере субъект отвечает на лечение, если продолжительность его жизни увеличивается примерно на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или более сверх ожидаемой продолжительности жизни, если лечение не проводится. В еще одном примере субъект отвечает на лечение, если субъект имеет увеличенную выживаемость без прогрессирования заболевания, общую выживаемость или увеличенное время до прогрессирования заболевания. Для определения того, отвечает ли пациент на лечение, можно использовать несколько методов, включая, например, критерии, приведенные в Руководстве по клинической практике в онкологии NCCN (NCCN Guidelines®).

#### **Комбинированная терапия**

Композицию можно вводить самостоятельно или в комбинации с другими видами лечения, одновременно или последовательно, в зависимости от патологического состояния, подлежащего лечению. Другие виды лечения могут включать введение подходящих доз обезболивающих препаратов, таких как нестероидные противовоспалительные препараты (например, аспирин, ибупрофен или кетопрофен), или опиаты, такие как морфин, или противорвотные средства.

Согласно дополнительному аспекту изобретения обеспечивается комбинация композиции или фармацевтической композиции в соответствии с вышеприведенным описанием и одного или более терапевтически активных соединений.

Согласно дополнительному аспекту изобретения обеспечивается способ лечения или профилактики расстройства или патологического состояния, ассоциированного с экспрессией или сверхэкспрессией EDB фибронектина, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества композиции, фармацевтической композиции или комбинации в соответствии с вышеприведенным описанием.

### Наборы

Согласно еще одному аспекту изобретения обеспечивается набор предметов, содержащий:

- a) композицию, фармацевтическую композицию или комбинацию согласно вышеприведенному описанию,
- b) устройство для введения композиции, фармацевтической композиции или комбинации и
- c) инструкции по применению.

В некоторых вариантах осуществления такой набор предметов содержит предварительно заполненный шприц, снабженный подходящей информационной листовкой для пациента. В еще одном варианте осуществления такой набор предметов содержит бутылки для инфузии с подходящими инструкциями для пользователя.

Компоненты набора предпочтительно являются стерильными и находятся в герметично закрытых флаконах или других контейнерах.

Набор может дополнительно содержать инструкции по применению компонентов в способе, описанном здесь. Компоненты набора могут находиться или быть упакованными в контейнер, например, мешок, коробку, банку, жестяную или блистерную упаковку.

### Примеры

Несмотря на то, что изобретение было иллюстрировано и подробно описано на фигурах и в предшествующем описании, такую иллюстрацию и описание следует рассматривать в качестве иллюстративной или примерной, а не ограничивающей; изобретение не ограничивается раскрытыми вариантами осуществления. Специалисты в данной области техники могут понять и осуществить на практике другие вариации раскрытых вариантов осуществления заявленного изобретения на основе изучения фигур, раскрытия и прилагаемой формулы изобретения. В формуле изобретения слово "содержащий" не исключает других предметов или стадий, и неопределенный артикль "а" или "an" не исключает множественного числа. Тот факт, что определенные меры изложены во взаимно различных зависимых пунктах, не означает, что комбинацию этих мер нельзя использовать для получения преимущества. Любые ссылочные номера в формуле изобретения не должны рассматриваться как ограничивающие объем.

Все аминокислотные последовательности, раскрытые здесь, показаны от N-конца к C-концу; все последовательности нуклеиновых кислот, раскрытые здесь, показаны в 5'→3'ориентации.

#### Пример 1.

Заявители неожиданно обнаружили, что, когда определенные линкеры используются для соединения IL-12 с одноцепочечным диателом (т. е. улучшенный формат, чем раскрытый в WO 2013/014149), то можно достичь лучшей эффективности нацеливания на опухоль, а также более высокого выхода продукта.

Заявители оценили и охарактеризовали восемь клонов человеческого IL-12, соединенного с антителом L19 в формате одноцепочечного диатела (huIL-12L19L19), с различным полипептидным линкером между цитокином и одноцепочечным диателом L19.

Пять клонов, которые были обозначены: (i) "AKKAS", (ii) "DDS", (iii) << (G4S)<sub>3</sub>>>, (iv) "SAD" и (v) "SES", содержат линкеры для конъюгации иммуноцитокинов с рекомбинантными антителами и были выбраны за счет их различного электрического заряда (нейтральный, положительно заряженный, отрицательно заряженный).

Были разработаны еще три дополнительных клон, обозначенные: (vi) Alpha3, (vii) AP6 и (viii) AP7. В отношении этих трех клонов, то в данном случае были рассмотрены и реализованы на практике идеи, представленные в публикации Chen et al. (2013). В этом обзоре предполагается, что жесткие линкеры могут иметь лучшую стабильность и могут сохранять правильное расстояние между цитокином и антителом, повышая тем самым терапевтическую эффективность.

Ни один из линкеров (i)-(viii) ранее не тестировался на этом специфическом иммуноцитокине.

С удивлением было обнаружено, что линкер "SAD" значительно повышает эффективность нацеливания на опухоль и выход продукта IL-12, связанного с одноцепочечным диателом, и в то же время в равной степени способен связываться с EDB по сравнению с другими клонами.

### Материалы и методы

Варианты, тестированные в примерах, имеют следующую общую структуру:

Домен (N->C)	p4	Линкер p 1	p3	Линкер p 2	VH L19	Линкер p 3	L1 9V L	Линкер p 4	VH L19	Линкер 3/5	VL L19
SEQ ID NO	1	2	3	4,9-15	7	6	5	8	7	6	5

Различные варианты (также называемые здесь "клонами") отличаются друг от друга последовательностью линкера 2, как подробно показано в табл. 2.

Таблица 2

Линкер 2	SEQ ID NO	Последовательность
AKKAS	9	GGGAKGGGGKAGGGS
DDS	10	GGGGDGGGGDGGGGS
(G4S) <sub>3</sub>	11	GGGSGGGSGGGGS
SAD	4	GSADGGSSAGGSDAG
SES	12	GGGSGGGGEGGGGS
Alpha3	13	AEAAAKEAAAKEAAKA
AP6	14	APAPAPAPAPAP
AP7	15	APAPAPAPAPAPAP

#### Клонирование восьми слитых белков с различными линкерами

Кодирующую последовательность huIL-12L19L19 получали сборкой различных фрагментов с использованием ПЦП: антитело L19 и IL12, представляющий полезную нагрузку. Ген L19 амплифицировали с помощью ПЦП из ранее созданной матрицы слитого белка L19-IL2 с использованием соответствующих праймеров. Второй ген L19 амплифицировали с помощью ПЦП с использованием соответствующих праймеров.

В то же время участок гена домена р35 IL-12 амплифицировали с помощью ПЦП из ранее полученного иммуноцитоккина на основе IL12 с использованием соответствующих праймеров. Два промежуточных фрагмента собирали с помощью ПЦП (для получения фрагмента P35-L19), подвергали двойному расщеплению с помощью рестриктаз BamHI/BspEI и клонировали в вектор с двойным расщеплением, содержащий р35. Затем вновь полученный вектор р35-L19 подвергали двойному расщеплению с помощью рестриктаз BspEI/NotI-HF и лигировали с геном второго фрагмента диатела L19. Фрагмент р35-L19L19 расщепляли с помощью BamHI/NotI-HF и клонировали в ранее дважды расщепленный экспрессионный вектор, традиционно используемый для клеток млекопитающих рсDNA3.1 (+), несущий ген субъединицы р40, в результате чего получали полноразмерный IL12-L19L19.

Различные линкеры между фрагментами IL12 и одноцепочечным диателом L19 вставляли с помощью ПЦП-сборки фрагментов "А" (кодирующий участок р35 с линкером), и фрагмента "В" (кодирующий линкер и участок антитела). Различные фрагменты "А" и фрагменты "В" амплифицировали из IL12-L19L19 в качестве матрицы с использованием соответствующих праймеров.

Стратегия клонирования, разработанная для клона AP7, приводила к получению мутантного клона (названного AP6). Все продукты ПЦП подвергали двойному расщеплению рестриктазами BamHI-HF и BspEI и лигировали в плазмиду р35-L19L19 рсDNA3.1. Полученные плазмиды амплифицировали, дважды расщепляли рестриктазами NotI-HF и BamHI-HF и вставку субклонировали в плазмиду рсDNA3.1, содержащую IL12. Полученные ДНК-плазмиды амплифицировали и использовали для трансфекции клеток.

#### Экспрессия и очистка восьми слитых белков с различными линкерами

Для получения различных слитых человеческих IL-12 использовали клетки CHO-S при культивировании в суспензии. Варианты huIL-12L19L19 экспрессировали с использованием транзientной экспрессии генов. Для 1 мл продукта  $4 \times 10^6$  клеток CHO-S в суспензии центрифугировали и ресуспендировали в 1 мл среды, подходящей для CHO-S. Затем к клеткам добавляли 0,625 мкг плазмидной ДНК, и затем 2,5 мкг полиэтиленимина (PEI; 1 мг/мл раствора в воде при pH 7,0) в расчете на миллион клеток и осторожно перемешивали. Трансфектированные культуры инкубировали в шейкере-термостате при 31°C в течение 6 суток.

Наконец, слитые белки, полученные транзientной экспрессией генов, очищали из клеточной культуральной среды с помощью аффинной хроматографии с белком А, и затем диализировали против PBS.

#### SDS-PAGE

Правильную молекулярную массу слитых белков анализировали в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с использованием SDS-PAGE 10% и SDS-PAGE 12%.

#### ELISA

Для проверки правильного связывания различных слитых белков на основе IL-12, планшеты для постановки ELISA покрывали в течение ночи 50 мкг/мл домена 7B89 фибронектина (см. WO 2001/062800 A1, содержание которой включено здесь посредством ссылки). Иммуноцитокнины тестировали в концентрациях 10 и 1 мкг/мл. В качестве вторичного реагента использовали пероксидазу хрена-белок А. Продукт анализа развивали с использованием растворимого субстрата BM-Blue POD. Колориметрическую реакцию останавливали добавлением 333 мМ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и измеряли оптическую плотность при длинах волн 450 и 650 нм с использованием планшетного ридера.

#### Эксклюзионная хроматография и Biacore

Эксклюзионную хроматографию проводили на системе AKTA FPLC с использованием колонки Superdex Increase 200. Эксперименты по оценке аффинности проводили с использованием поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biacore X100 с очищенными клонами huIL-12L19L19 на биосенсор-

ном чипе CM5, покрытом доменом 7B89 фибронектина. Образцы инжестировали в виде серийных разведений в диапазоне концентраций от 1 мкМ до 250 нМ.

#### **Иммунофлуоресценция**

Для подтверждения способности различных слитых белков huIL-12 связываться с опухолевыми клетками, проводили иммунофлуоресцентный анализ на срезах замороженного образца сингенной тератокарциномы F9 (8 мкм). Срезы опухоли фиксировали в ледяном ацетоне (5 мин). После фиксации покровные стекла промывали и блокировали 20% фетальной бычьей сывороткой в PBS в течение 45 мин. Клоны huIL-12L19L19 в концентрации 5 мкг/мл добавляли в 2% раствор BSA/PBS на 1 ч при комнатной температуре. Затем покровные стекла дважды промывали PBS и наносили вторичное мышинное антитело против человеческого интерлейкина-12 в конечном разведении 1:1000 в 2% растворе BSA/PBS при комнатной температуре на 1 ч. Затем покровные стекла дважды промывали PBS и наносили третичное козье антимышинное антитело в конечном разведении 1:500. DAPI использовали для противоокрашивания ядер.

#### **Радиомечение и оценка нацеливания на опухоли in vivo**

Для подтверждения способности различных слитых белков на основе IL-12 связываться с опухолью in vivo, оценивали их нацеливающую способность с использованием анализа биораспределения. 100 мкг каждого клона IL-12L19L19 метили радиоактивным йодом  $^{125}\text{I}$  и хлораминем гидратом T, и очищали на колонке PD10. Радиоактивно меченные белки вводили в латеральную хвостовую вену иммунокомпетентных мышей, несущих подкожно имплантированную мышиную тератокарциному F9. Вводимая доза на мышь варьировала от 4 до 9 мкг. Мышей подвергали эвтаназии через 24 ч после инъекции. Органы взвешивали, и измеряли радиоактивность с использованием гамма-счетчика Packard Cobra. Уровень радиоактивности в репрезентативных органах выражали в процентах инъецированной дозы на грамм ткани (% ID/g  $\pm$  стандартная ошибка).

#### **Результаты**

##### **Клонирование, экспрессия и SDS-PAGE**

Восемь вариантов слитых белков huIL-12L19L19 были успешно клонированы, где каждый содержал различный полипептидный линкер между цитокином и одноцепочечным диателом L19. Анализ SDS-PAGE показал молекулярную массу примерно 120 кДа для всех вариантов, что подтверждает ожидаемый размер белка (примерно 109 кДа, негликозилированный). Выходы экспрессии (транзientной экспрессии генов в клетках CHO-S) варьировали для всех вариантов от 3,5 до 5 мг/л. Удивительно, но клон, обозначенный "SAD", показал выход на уровне 9 мг/л, который был значительно выше, чем выход с другими 7 клонами. Результаты показаны на фиг. 1.

##### **ELISA**

Результаты анализа ELISA восьми клонов Alpha3, AP6, AP7, DDS, SES, AKKAS, (G4S)<sub>3</sub> и SAD подтвердили связывание (как в концентрации 10 мкг/мл, так и в концентрации 1 мкг/мл) с доменом 7B89 человеческого фибронектина. Результаты показаны на фиг. 2.

##### **BIAcore**

Более точное определение константы аффинности проводили с помощью анализа BIAcore на биосенсорном чипе, покрытом доменом 7B89 человеческого фибронектина (фиг. 3). Образцы инжестировали в виде серийных разведений, концентрация была равна 1000, 750, 500 и 250 нМ (фиг. 3). Кажущуюся KD определяли с помощью программного обеспечения BIAcore X100 Evaluation.

##### **Эксклюзионная хроматография**

Восемь клонов Alpha3, AP6, AP7, DDS, SES, AKKAS, (G4S)<sub>3</sub> и SAD были охарактеризованы с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC-200), где все клоны показали сопоставимый профиль с наличием основного пика, соответствующего мономерному иммуноцитокину (фиг. 4).

#### **Иммунофлуоресценция**

Эксперимент с иммунофлуоресценцией проводили с клонами Alpha3, AP6, AP7, DDS, SES, AKKAS, (G4S)<sub>3</sub> и SAD на срезе замороженного образца сингенной тератокарциномы F9 (8 мкм). Все клоны показали специфическое связывание на сосудистой сети по сравнению с отрицательным контролем (фиг. 5).

#### **Оценка нацеливания на опухоль in vivo**

Нацеливание in vivo оценивали с помощью анализа биораспределения. Восемь клонов Alpha3, AP6, AP7, DDS, SES, AKKAS, (G4S)<sub>3</sub> и SAD, а также положительный контроль (одноцепочечное диатело L19, соединенное с мышиным IL-12), метили радиоактивным йодом  $^{125}\text{I}$  и инъецировали (из расчета 4-9 мкг белка/животное) иммунокомпетентным мышам, несущим подкожно имплантированную мышиную тератокарциному F9. Результаты измерения радиоактивности через 24 ч после инъекции свидетельствовали о накоплении в опухоли для всех клонов, однако клон "SAD" показал более высокое накопление в опухоли по сравнению с другими семью клонами (фиг. 6).

##### **Пример 2.**

В дополнительной серии сравнительных экспериментов было неожиданно обнаружено, что линкер "SAD" также превосходит "старый" (и более короткий) линкер GSADGG (SEQ ID NO: 26), раскрытый в WO 2013/014149, в отношении способности к связыванию, мономерного профиля и способности нацеливания на опухоль.

### Материал и методы

Варианты, тестированные в этом примере, имеют следующую общую структуру:

Домен	p4	Линкер	p3	Линкер	VH	Линкер	VL	Линкер	VH	Линкер	VL
н	0	p 1	5	p 2	L1	p3	L1	p 4	L19	3/5	L19
(N→C)					9		9				
SEQ ID NO	1	2	3	4,26	7	6	5	8	7	6	5

Различные варианты (также называемые здесь "клонами") отличаются друг от друга последовательностью линкера 2:

Линкер 2	SEQ ID NO	Последовательность
SAD	4	GSADGGSSAGGSDAG
«Старый»	26	GSADGG

#### Клонирование слитых белков

Слитые белки, содержащие huIL-12, слитые посредством линкера из 6 или 15 аминокислот, с антителом L19 в формате одноцепочечного диатела (а именно, варианты huIL-12L19L19, "старый" и huIL-12L19L19, "SAD" соответственно) клонировали, как описано выше.

#### Экспрессия слитых белков

Слитые белки, содержащие huIL-12, слитый посредством линкера из 6 или 15 аминокислот, с антителом L19 в формате одноцепочечного диатела (а именно, варианты huIL-12L19L19, "старый" и huIL-12L19L19, "SAD" соответственно) получали транзиторной экспрессией генов в суспензии адаптированных клеточных культур CHO. После трансфекции клетки поддерживали в среде ProCHO-4 (с добавлением 4 мМ ультраглутамин) в течение 6 суток при 31°C при встряхивании, после чего культуральный супернатант собирали центрифугированием и дополнительно обрабатывали для очистки слитого белка.

#### Очистка слитых белков с использованием смолы с белком А

Суспензионные культуры трансфектированных клеток CHO центрифугировали в течение 30 мин при 5000 об/мин при 4°C. Супернатант дополнительно осветляли фильтрованием с использованием 0,45 мкм фильтров. Смолу с белком А добавляли к отфильтрованному супернатанту и смесь инкубировали при встряхивании в течение примерно 1 ч. Затем смолу собирали на колонке для жидкостной хроматографии и промывали "буфером А" (100 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, 0,1% Твин 20 в PBS, pH 7,4) с последующей второй промывкой "буфером В" (500 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА в PBS, pH 7,4). Слитые белки, содержащие huIL-12, элюировали под действием силы тяжести, используя 100 мМ ТЕА. Аликвоты собирали и фракции, содержащие слитый белок, что подтверждали УФ-спектрометрией, объединяли и диализовали против PBS в течение ночи.

#### Эксклюзионная хроматография слитых белков

Эксклюзионную хроматографию слитых белков проводили с использованием колонки Superdex 200 Increase 10/300 GL с PBS в качестве рабочего буфера в системе ÄKTA-FPLC. 100 мкл растворов белка инжектировали в петлю и автоматически вводили на колонку. УФ-поглощение при 280 нм оценивали во времени. Профили SEC слитых белков анализировали с использованием функции интеграции пиков программного обеспечения UNICORN для количественного определения процентного содержания мономерной фракции по отношению к общей площади в % или площади пика в %. Для исключения артефактов пиков, вызванных загрузкой образца или солями, присутствующими в буферах для образцов, для количественного анализа учитывали только интервал между удерживающим объемом 5-17,5 мл.

#### Biacore

Измерение аффинности в экспериментах с поверхностным плазмонным резонансом проводили на приборе BiacoreX100 с очищенными клонами "старый" и "SAD" на биосенсорном чипе CM5, только что покрытом 7B89 фибронектина. Образцы инжектировали в виде серийных разведений с концентрацией 250, 125 нМ и 62,5 мМ (фиг. 10). Кажущуюся KD определяли с помощью программного обеспечения Biacore X100 Evaluation.

#### Радиомечение и оценка нацеливания на опухоли in vivo

Образцы очищенного белка huIL-12L19L19 "SAD" (с линкером GSADGGSSAGGSDAG, SEQ ID NO 4) и huIL-12L19L19 "старый" (с линкером GSADGG, SEQ ID NO 26) (100 мкг) метили радиоактивным йодом <sup>125</sup>I и хлорамином гидратом Т, и очищали на колонке PD10. Белки метили радиоактивным йодом после аффинной хроматографии с белком А. Белки вводили в латеральную хвостовую вену иммунокомпетентных (129/Sv) мышей, несущих подкожно имплантированную мышиную тератокарциному F9. Вводимая доза на мышь варьировала от 10 до 11 мкг. Мышей подвергали эвтаназии через 24 ч после инъекции. Образцы органов взвешивали, и радиоактивность измеряли с использованием гамма-счетчика Packard Cobra. Рассчитывали поглощение белка в различных органах и выражали в виде процента инъецированной дозы на грамм ткани (% ID/г ± стандартная ошибка). Поглощение белка в опухоли коррелировало

с ростом опухоли, как описано в публикации Tarli et al. (1999).

### Результаты

#### Экспрессия и очистка слитых белков и эксклюзионная хроматография

Два варианта huIL-12L19L19 "SAD" и huIL-12L19L19 "старый" получали транзientной экспрессией генов в клетках CHO. Эксперименты выполняли в двух повторностях, где две серии экспериментов по получению продукта выполняли на разные дни, в результате чего получали партии А и В соответственно. После одностадийной очистки с помощью аффинной хроматографии с белком А и диализа против PBS оценивали гомогенность белковых образцов с помощью эксклюзионной хроматографии (фиг. 9). Оба варианта белка показали определенную степень агрегации белка, что выражалось в наличии высокомолекулярных вариантов, элюируемых при раннем удерживающем объеме. Вариант huIL-12L19L19 "SAD" в обоих случаях показал лучший профиль, что подтверждается количественным определением мономерной фракции белков с использованием функции интеграции пиков программного обеспечения UNICORN. Действительно, вариант huIL-12L19L19 "SAD" продемонстрировал более низкую тенденцию к агрегации по сравнению с вариантом huIL-12L19L19 "старый", с учетом площади пика мономера в процентах от общей площади под кривой над базовой линией (средние значения: 54,57% против 46,69% соответственно) или площади пика мономера в процентах от суммы всех интегрированных пиков (средние значения: 58,83% против 52,74% соответственно) (табл. 1).

Таблица 1

Количественная оценка мономерной фракции различных слитых белков, оцененная с помощью функции интеграции пиков с использованием программного обеспечения UNICORN. (\*) Площадь пика в процентах от общей площади под кривой над базовой линией. (°) Площадь пика в процентах от суммы всех интегрированных пиков

Белок	Длина линкера (аминокислоты)	Партия	Объем удерживания мономера (мл)	Площадь мономерного пика/Общая площадь пика (*) (%)	Средняя площадь/Общая площадь пика (*) (%)	Площадь мономерного пика/Площадь пика (°) (%)	Средняя площадь/Площадь пика (°) (%)
huIL-12L19L19 "SAD"	15	А	11,70	54,06	54,57	58,51	58,83
huIL-12L19L19 "SAD"	15	В	11,72	55,08		59,14	
huIL-12L19L19 "старый"	6	А	11,87	46,73	46,69	48,99	52,74
huIL-12L19L19 "старый"	6	В	11,86	46,65		56,48	

#### Biacore

По оценкам программного обеспечения Biacore X100 Evaluation кажущаяся KD составила 6,7 нМ для "старого" клона (huIL-12L19L19, "старый" с линкером GSADGG) и 3,8 нМ для клона "SAD" (huIL-12L19L19, "SAD" с линкером GSADGGSSAGGSADAG) (фиг. 10).

#### Оценка нацеливания на опухоль in vivo

Радиоактивность, измеренная через 24 ч после инъекции, показала, что клон "SAD" имеет неожиданно лучшее поглощение опухолями по сравнению со "старым" клоном (фиг. 11).

#### Пример 3.

Эффективность варианта huIL-12L19L19 "SAD" оценивают у пациентов-людей со злокачественной меланомой, мелкоклеточным раком легкого (NSCLC), почечноклеточной карциномой, уротелиальной карциномой, плоскоклеточной карциномой головы и шеи (HNSCC), метастатическим колоректальным раком с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефицитом репарации ошибок репарации ДНК (dMMR), гепатоцеллюлярным раком, раком желудка, плоскоклеточной карциномой кожи, раком шейки матки и диффузной В-крупноклеточной лимфомой (DLBCL). По меньшей мере одна когорта пациентов демонстрирует прогрессирование заболевания на схеме лечения на основе блокирования иммунных контрольных точек, назначенной в качестве немедленной предварительной обработки.

Пациенты получают вариант huAD-12L19L19 "SAD" внутривенным введением один раз в неделю в течение 8 недель. Пациенты получают дозы 4 мкг/кг; 8 мкг/кг; 12 мкг/кг; 16 мкг/кг или 20 мкг/кг.

Пациенты находятся под наблюдением в течение 6 месяцев с начала лечения или до отмены согласия на участие в испытании или до прогрессирования заболевания.

Фармакокинетический анализ IL12-L19L19L19-L12 проводят с использованием анализа сэндвич-типа с захватом слитой молекулы и фрагмента IL12. Антитела против слитых белков человека (HAFa) тестируют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса и анализа сэндвич-типа с захватом. Противоопухолевую активность, например эффективность, оценивают на неделе 8, 16 и 24 с использованием критериев ответа солидных опухолей RECIST (версия 1.1) или с помощью критериев ответа злокачественной лимфомы LUGANO.

#### Дополнительные варианты осуществления

Согласно первой серии вариантов осуществления обеспечивается следующее:

1. Конъюгат, содержащий:
    - a) гетеродимерный белок IL-12, имеющий первую и вторую субъединицу,
    - b) одноцепочечное тело и
    - c) линкер между белком IL-12 и одноцепочечным диателом, где линкер содержит аминокислотный мотив, содержащий SAD.
  2. Конъюгат по п. 1, где линкер SAD содержит аминокислотный мотив GSADGGSSAGGSDAG (SEQ ID NO: 4).
  3. Конъюгат по любому из пп.1 или 2, где первая субъединица гетеродимерного белка IL-12 представляет р40, и вторая субъединица представляет р35.
  4. Конъюгат по любому из пп.1-3, где одноцепочечное диатело является моноспецифическим или биспецифическим.
  5. Конъюгат по любому из пп.1-4, где одноцепочечное диатело связывается с экстрадоменом В (EDB) фибронектина.
  6. Конъюгат по любому из пп.1-5, где одноцепочечное диатело содержит два домена VH L19 и два домена VL L19.
  7. Конъюгат по любому из пп.1-6, который имеет полноразмерную структуру [р40]-[линкер1]-[р35]-[линкер SAD]-[VHL19]-[линкер3]-[VLL19]-[линкер4]-[VHL19]-[линкер3]-[VLL19].
  8. Конъюгат по любому из пп.1-7, который имеет полноразмерную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16.
  9. Применение конъюгата по любому из вышеуказанных пунктов (для производства лекарственного средства) в лечении человека или животного:
    - которому поставлен диагноз,
    - страдает или
    - подвержен риску развития неопластического заболевания, или для профилактики такого патологического состояния.
  10. Применение конъюгата по любому из вышеуказанных пунктов (для производства лекарственного средства) в ингибировании ангиогенеза у человека или животного.
  11. Фармацевтическая композиция, содержащая, по меньшей мере, конъюгат по любому из пп.1-8 и необязательно один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.
  12. Комбинация, включающая (i) конъюгат по любому из пп.1-8 или фармацевтическую композицию по п.11 и (ii) одно или более терапевтически активных соединений.
  13. Способ лечения или профилактики расстройства или патологического состояния, ассоциированного с экспрессией или сверхэкспрессией EDB фибронектина, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества конъюгата по любому из пп.1-8, фармацевтической композиции по п.11 или комбинации по п.12.
  14. Терапевтический набор предметов, включающий:
    - a) конъюгат по любому из пп.1-8, фармацевтическую композицию по п.11 или комбинацию по п.12,
    - b) устройство для введения конъюгата, композиции или комбинации, и
    - c) инструкции по применению.
- Согласно второй серии вариантов осуществления обеспечивается следующее:
1. Конъюгат, содержащий:
    - a) гетеродимерный белок IL-12, имеющий первую и вторую субъединицу,
    - b) одноцепочечное диатело и
    - c) линкер между белком IL-12 и одноцепочечным диателом, где линкер содержит аминокислотный мотив, содержащий GSADGGSSAGGSDAG (SEQ ID NO: 4).
  2. Конъюгат по п.1, где первая субъединица гетеродимерного белка IL-12 представляет р40, и вторая субъединица представляет р35.
  3. Конъюгат по любому из пп.1 или 2, где одноцепочечное диатело является моноспецифическим или биспецифическим.
  4. Конъюгат по любому из пп.1-3, где одноцепочечное диатело связывается с экстрадоменом В

(EDB) фибронектина.

5. Конъюгат по любому из пп.1-4, где одноцепочечное диатело содержит два домена VH L19 и два домена VL L19.

6. Конъюгат по любому из пп.1-5, который имеет полноразмерную структуру [p40]-[линкер1]-[p35]-[линкерSAD]-[VHL19]-[линкер3]-[VLL19]-[линкер4]-[VHL19]-[линкер3]-[VLL19].

7. Конъюгат по любому из пп.1-6, который имеет полноразмерную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16.

8. Применение конъюгата по любому из вышеуказанных пунктов (для производства лекарственного средства) в лечении человека или животного, которому поставлен диагноз, страдает или подвержен риску развития неопластического заболевания, или для профилактики такого патологического состояния.

9. Применение конъюгата по любому из вышеуказанных пунктов (для производства лекарственного средства) в ингибировании ангиогенеза у человека или животного.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая, по меньшей мере, конъюгат по любому из пп.1-7 и, необязательно один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.

11. Комбинация, включающая (i) конъюгат по любому из пп.1-7 или фармацевтическую композицию по п.10 и (ii) одно или более терапевтически активных соединений.

12. Способ лечения или профилактики расстройства или патологического состояния, ассоциированного с экспрессией или сверхэкспрессией EDB фибронектина, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества конъюгата по любому из пп.1-7, фармацевтической композиции по п.10 или их комбинации по п.11.

13. Терапевтический набор предметов, включающий:

а) конъюгат по любому из пп.1-7, фармацевтическую композицию по п.10 или комбинацию по п.11,

б) устройство для введения конъюгата, композиции или комбинации и

с) инструкции по применению.

Согласно третьей серии вариантов осуществления обеспечивается следующее:

1. Конъюгат, содержащий:

а) гетеродимерный белок IL-12, имеющий первую и вторую субъединицу,

б) одноцепочечное диатело, и

с) линкер между белком IL-12 и одноцепочечным диателом, где линкер содержит аминокислотный мотив, содержащий GSADGGSSAGGSDAG (SEQ ID NO: 4).

2. Конъюгат по п.1, где первая субъединица гетеродимерного белка IL-12 представляет р40, и вторая субъединица представляет р35.

3. Конъюгат по любому из пп.1 или 2, где одноцепочечное диатело является моноспецифическим или биспецифическим.

4. Конъюгат по любому из пп.1-3, где одноцепочечное диатело связывается с экстрадоменом В (EDB) фибронектина.

5. Конъюгат по любому из вышеуказанных п.1-4, где одноцепочечное диатело содержит антиген-связывающий домен, имеющий определяющие комплементарность участки (CDR) антитела L19, представленные в SEQ ID NO: 28-33.

6. Конъюгат по любому из пп.1-5, где одноцепочечное диатело содержит домены VH и VL антитела L19, представленные в SEQ ID NO: 7 и 5.

7. Композиция по любому из пп.1-6, где одноцепочечное диатело содержит по меньшей мере одно из:

а) пары последовательностей переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи по п.6 при условии, что по меньшей мере один из доменов имеет идентичность последовательности на уровне  $\geq 80\%$  относительно SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 5 соответственно, и/или

б) пары последовательностей переменных доменов тяжелой цепи/легкой цепи по п.6, при условии, что по меньшей мере один из доменов имеет до 10 аминокислотных замен относительно SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 5 соответственно,

одновременно сохраняя свою способность связываться с экстрадоменом В (EDB) фибронектина.

8. Конъюгат по любому из пп.1-7, где по меньшей мере одна аминокислотная замена в одноцепочечном диателе представляет консервативную аминокислотную замену.

9. Конъюгат по любому из пп.1-8, где одноцепочечное диатело

имеет аффинность связывания с мишенью  $\geq 50\%$  с экстрадоменом В (EDB) фибронектина по сравнению с одним из антител по п.5 или 6, и/или

конкурирует за связывание с экстрадоменом В (EDB) фибронектина с одним из антител по п.5 или 6.

10. Конъюгат по любому из пп.1-9, где одноцепочечное диатело содержит два домена VH L19 и два домена VL L19.

11. Конъюгат по любому из пп.1-11, который имеет полноразмерную структуру [p40]-[линкер1]-[p35]-[линкер SAD]-[VHL19]-[линкер3]-[VLL19]-[линкер4]-[VHL19]-[линкер3]-[VLL19].

12. Конъюгат по любому из пп.1-11, который имеет полноразмерную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16.

13. Применение конъюгата по любому из вышеуказанных пунктов (для производства лекарственного средства) в лечении человека или животного, которому поставлен диагноз, страдает или подвержен риску развития неопластического заболевания или для профилактики такого патологического состояния.

14. Применение конъюгата по любому из вышеуказанных пунктов (для производства лекарственного средства) для ингибирования ангиогенеза у человека или животного.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая, по меньшей мере, конъюгат по любому из пп.1-12 и, необязательно, один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.

16. Комбинация, включающая (i) конъюгат по любому из пп.1-12 или фармацевтическую композицию по п.15 и (ii) одно или более терапевтически активных соединений.

17. Способ лечения или профилактики расстройства или патологического состояния, ассоциированного с экспрессией или сверхэкспрессией EDB фибронектина, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества конъюгата по любому из пп.1-12, фармацевтической композиции по п.15 или их комбинации по п.16.

18. Терапевтический набор предметов, включающий:

а) конъюгат по любому из пп.1-12, фармацевтическую композицию по п.15 или комбинацию по п.16,

б) устройство для введения конъюгата, композиции или комбинации и

с) инструкции по применению.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения линкер SAD содержит аминокислотный мотив GSADGGSSAGGSDAG (SEQ ID NO: 4). Как здесь используется, термин "одноцепочечное диатело" относится к конструкту из двух одноцепочечных Fv(scFv) антител с коротким линкером, предпочтительно длиной 5 аминокислот, конъюгированных друг с другом более длинным линкером, предпочтительно длиной 15 аминокислот, в соответствии со следующей схемой (ориентация N→C): VHL19-линкер 3-VLL19-линкер 4-VHL19-линкер 3-VLL19.

Согласно одному варианту осуществления изобретения линкер 3 представляет GSSGG (SEQ ID NO: 6), и линкер 4 представляет SSSGSSSSGSSSSG (SEQ ID NO: 8). Согласно одному варианту осуществления изобретения первая субъединица гетеродимерного белка IL-12 представляет р40, и вторая субъединица представляет р35. Предпочтительно две субъединицы конъюгированы друг с другом посредством данного линкера согласно следующей схеме (ориентация N→C): р40-линкер1-р35.

Предпочтительно IL-12 представляет человеческий IL-12. В предпочтительном варианте осуществления линкер 1 представляет GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 2). Согласно одному варианту осуществления изобретения одноцепочечное диатело является моноспецифическим или биспецифическим. Согласно одному варианту осуществления изобретения одноцепочечное диатело связывается со сплайс-инговой изоформой фибронектина. Согласно одному варианту осуществления изобретения одноцепочечное диатело связывается с экстрадоменом В (EDB) фибронектина.

**Ссылки (раскрытия, которые были в полном объеме включены здесь посредством ссылки)**

Car et al., Toxicologic Pathology (1999), 27(1), 58-63

Chen et al., Adv Drug Deliv Rev. (2013), 65(10), 1357-1369

WO 2013/014149

WO 2006/119897

Tarli et al., Blood (1999), 94(1), 192-198.

#### **Последовательности**

Следующие последовательности составляют часть раскрытия настоящей заявки. С этой заявкой также предоставляется список электронных последовательностей, совместимых с WIPO ST 25. Во избежание сомнений, если имеются расхождения между последовательностями в следующей таблице и списком электронных последовательностей, то последовательности в этой таблице должны считаться правильными.

SEQ ID NO	Идентификатор	Последовательность
1	P40	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEV LSHLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAK NYSGRFTCWLLTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA ATLSAERVRGDNKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIEV MVDAVHKLKYENYTSFFIRDIIKPDPPKNLQKPLKNS RQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWAS VPCS
2	Линкер 1	GGGGSGGGSGGGGS
3	P35	RNLPVATPDPMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTL EFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEF KTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSE TVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSY LNAS
4	Линкер 2 ("SAD")	GSADGGSSAGGSDAG
5	VL L19	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQ KPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL

		EPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK
6	Линкер 3/Линкер 5	GSSGG
7	VH L19	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGTLVT VSS
8	Линкер 4	SSSSGSSSSGSSSSG
9	Линкер 2 ("АККАС")	GGGAKGGGKAGGGS
10	Линкер 2 ("DDS")	GGGGDGGGGDGGGS
11	Линкер 2 ("G4S <sub>3</sub> ")	GGGSGGGSGGGGS
12	Линкер 2 ("SES")	GGGSGGGGEGGGGS
13	Линкер 2 ("Alpha 3")	AEAAAKEAAAKEAAKA
14	Линкер 2 ("AP6")	APAPAPAPAPAP
15	Линкер 2 ("AP7")	APAPAPAPAPAPAP
16	Полноразмерный вариант SAD	IWELKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCCHKGGEV LSHLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAK NYSGRFTCWWTITISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEV MVDAVHKLKYENYTSFFIRDIIKPDPPKNLQKPLKNS RQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWAS VPCSGGGSGGGSGGGSRNLPVATPDPGMFPLHH SQNLLRAVSNMLQKARQTLFYPCTSEEIDHEDITKDKT STVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFM MALCLSSIEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD QNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIK LCILHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGSADGGSSAGGSDA GEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWV RQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGTLVT

		<p>VSSGSSGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSS          FLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTD          FTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSS          SGSSSSGSSSGEVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGF          TFSFMSWVRQAPGKLEWVSSISGSSGTTYADSVK          GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPPYF          DYWGQGTLLTVSSGSSGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATL          SCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIP          DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFG          QGTKVEIK</p>
17	<p>Полноразмерный          muIL-12-L19-L19</p>	<p>MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLCTDTPPEEDIT          WTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYCHKGGETL          SHSHLLLHKENGWSTEILKNFNKTKFLKCEAPNYSGR          FTCSWLVRNMDLKFNIKSSSSPDSRAVTCGMASLSA          EKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEAR          QQNKYENYSTSFIRDIIKPDPPKNLQMRPLKNSQVEVS          WEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQ          KGAFVERTSTEVQCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKW          ACVPCRVRSGGGGSGGGGSGGGSRVIPVSGPARCLSQ          SRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQ          TSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTRGSLPPQKTSL          MMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILD          KGMLVAIDELMQLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKM          KLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSAGSADGEVQLLESG          GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFMSWVRQAPGKLE          WVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN          SLRAEDTAVYYCAKPPYFDYWGQGTLLTVSSGSSGG          EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQ          KPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR          EPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSGS          SSSGEVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFMS          WVRQAPGKLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISR          DNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPPYFDYWGQGT          LTVSSGSSGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSV          SSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGS</p>

		GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK
18	Нуклеотидная последовательность линкера АККАС	ggagggggag ctaaaggtgg cgggggcaag gcagggggag ggagt
19	Нуклеотидная последовательность линкера AP7	gcaccagcac cagcaccagc accagcacca gcaccagcac ca
20	Нуклеотидная последовательность линкера DDS	ggaggtgggg gtgatgggg gggaggtgac ggcggaggtg ggtct
21	Нуклеотидная последовательность линкера AP6	gcaccagcac cagcaccagc accagcacca gcacca
22	Нуклеотидная последовательность линкера (G4S) <sub>3</sub>	ggtggagcgc ggtcaggcgg agggggttct ggcgggagtg gatcg
23	Нуклеотидная последовательность линкера SES	ggtgggggtg ggtccggagg cggagcgcaa ggcggaggtg ggtcg
24	Нуклеотидная последовательность линкера Alpha3	gcagaagcag cagcaaaaga agcagcagca aaagaagcag cagcaaaagc a
25	Нуклеотидная последовательность линкера SAD	gggtctgcag acggcggatc atcagctggg ggaagtgcag cagga
26	Линкер 2 (“старый”)	GSADGG
27	Полноразмерный “старый” вариант	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLQSSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEV LSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAK NYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA ATLSAERVRGDNKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIEV MVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNS

		RQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWAS VPCSGGGGGGGGGGGGGSRNLPVATPDPGMFCLHH SQNLLRAVSNMLQKARQTLFYPCTSEEDHEDITKDKT STVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSM MALCLSSYEDLKMVQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD QNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIK LCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGSADGGEVQLLESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQTLTVSSGSSGG EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQ KPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR EPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGS SSSGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQT LTVSSGSSGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSV SSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK
28	CDR1 VH L19	SFSMS
29	CDR2 VH L19	SISGSSGTTYADSVKG
30	CDR3 VH L19	PFPYFDY
31	CDR1 VL L19	RASQSVSSSFLA
32	CDR2 VL L19	YASSRAT
33	CDR3 VL L19	QQTGRIPPT
34	Линкер GGGGS	GGGGS
35	Линкер GGGGA	GGGGA
36	Диатело L19	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQTLTV VSSGSSGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSS FLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGT FTLISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуноцитокин для нацеленной на злокачественную опухоль доставки IL-12, где злокачественная опухоль экспрессирует экстра-домен В фибронектина (EDB-FN), содержащий полную последовательность SEQ ID NO: 16.

2. Применение иммуноцитокина по п.1 для лечения человека или животного, которому поставлен диагноз, страдает или подвержен риску развития неопластического заболевания, вызванного злокачественными клетками, экспрессирующими EDB-FN, или для профилактики такого патологического состояния.

3. Применение по п.2, где неопластическое заболевание выбрано из группы, состоящей из злокачественной меланомы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), метастатического колоректального рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефицитом репарации ошибок репарации ДНК (dMMR), гепатоцеллюлярного рака, рака желудка, плоскоклеточной карциномы кожи, рака шейки матки и диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL).

4. Применение иммуноцитокина по п.1 для ингибирования ангиогенеза в опухолях, экспрессируемых EDB-FN.

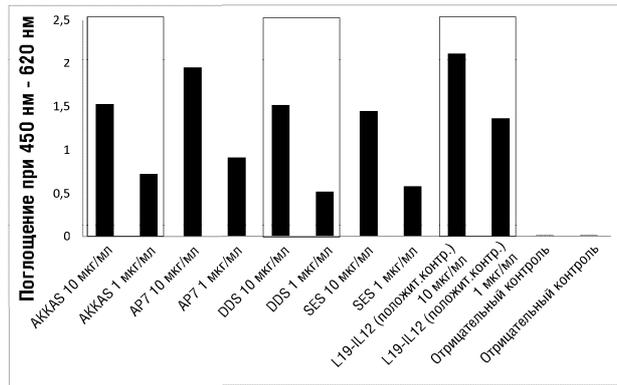
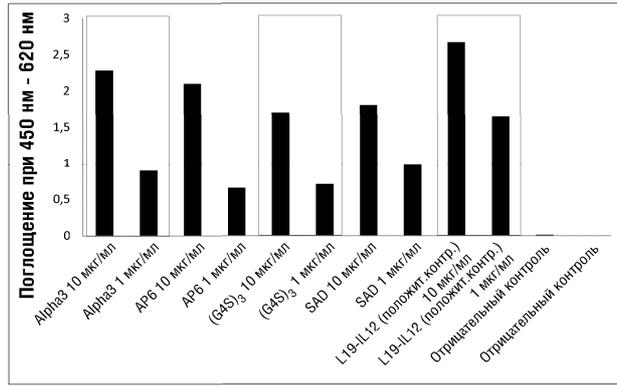
5. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноцитокин по п.1 и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.

6. Комбинация для нацеленной на злокачественную опухоль доставки IL-12, где злокачественная опухоль экспрессирует EDB-FN, содержащая:

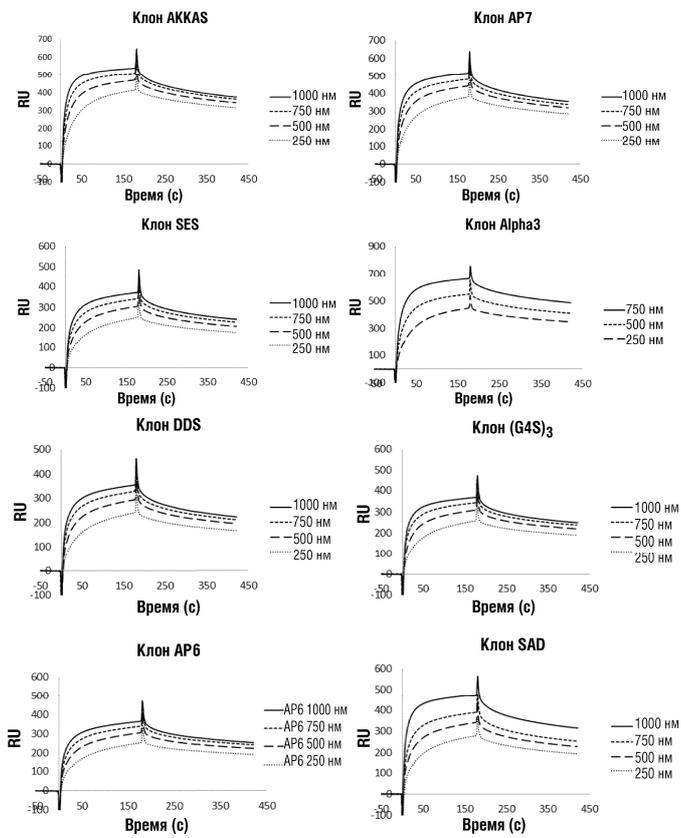
(i) иммуноцитокин по п.1 или фармацевтическую композицию по п.5 и

(ii) одно или более терапевтически активных соединений для лечения злокачественных опухолей.

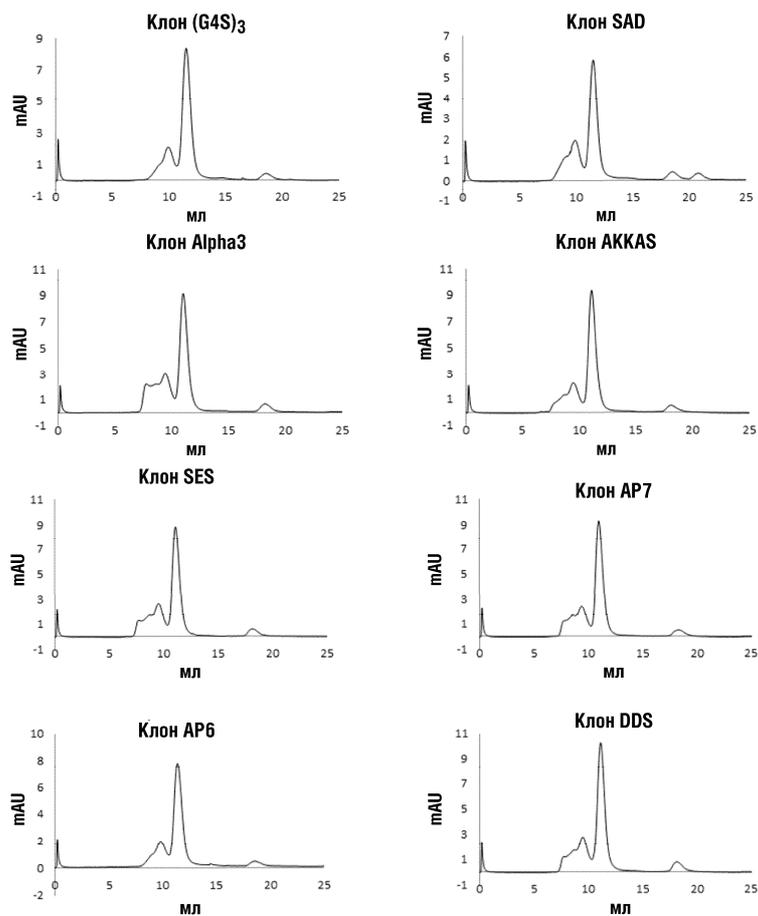




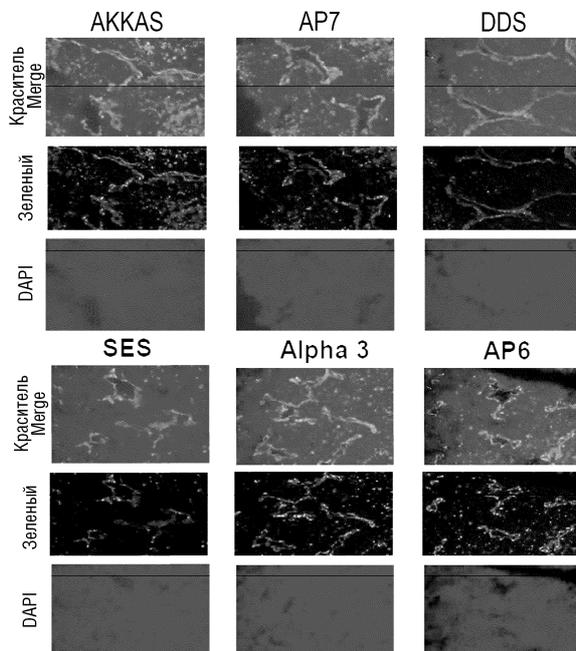
Фиг. 2

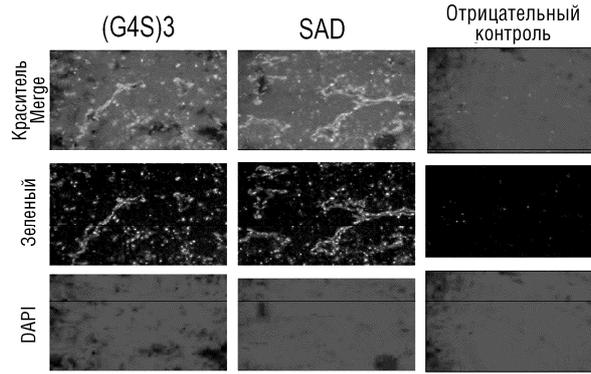


Фиг. 3

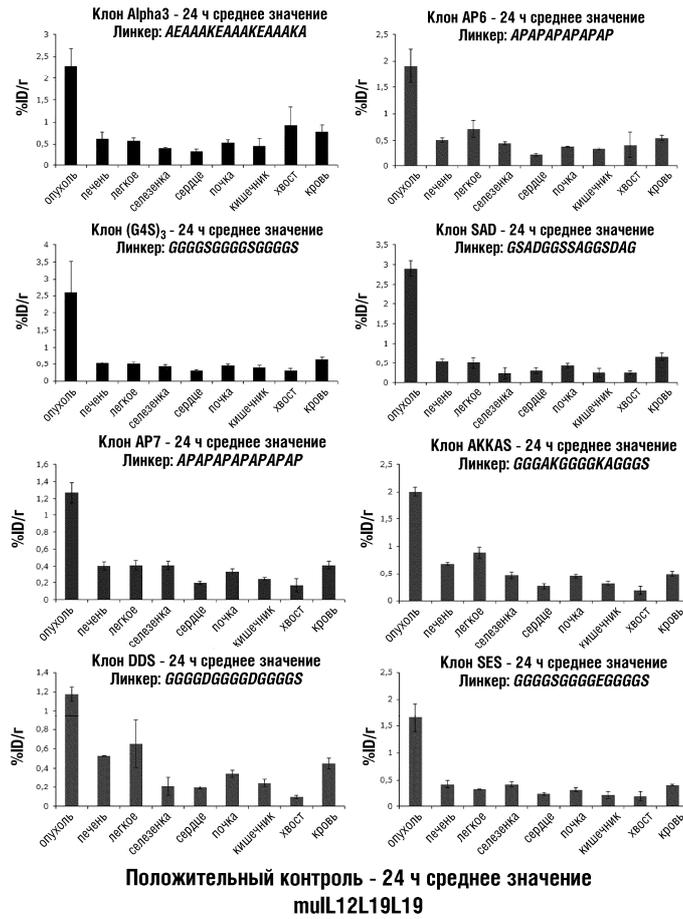


Фиг. 4

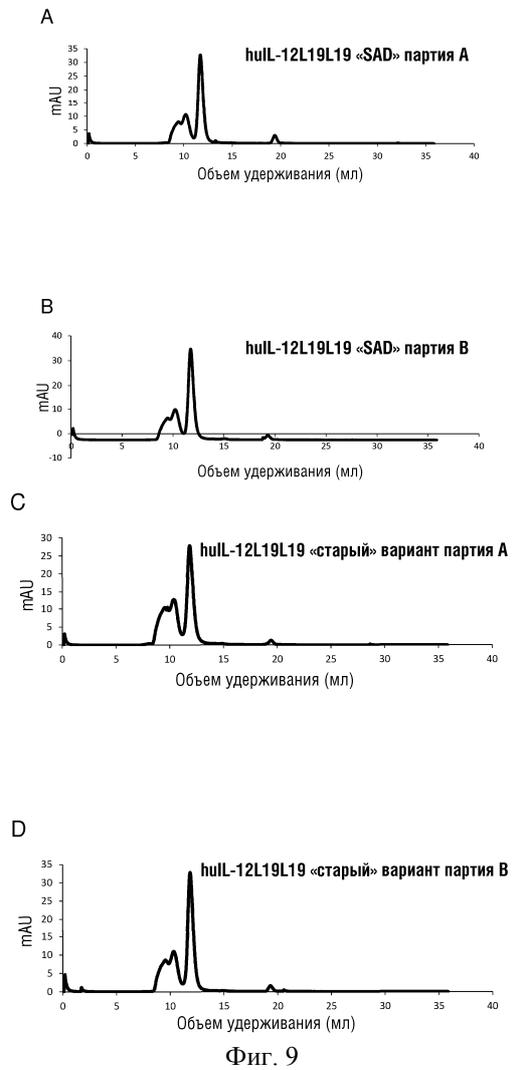
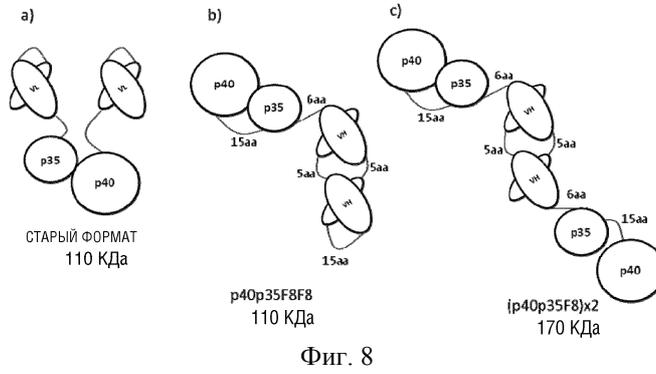
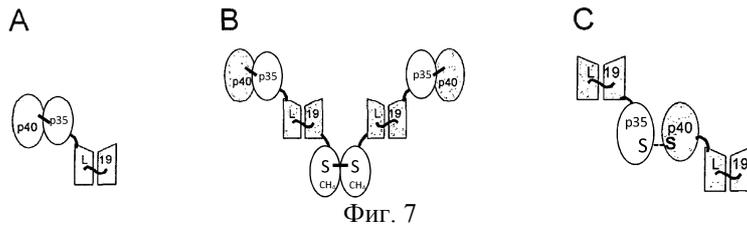


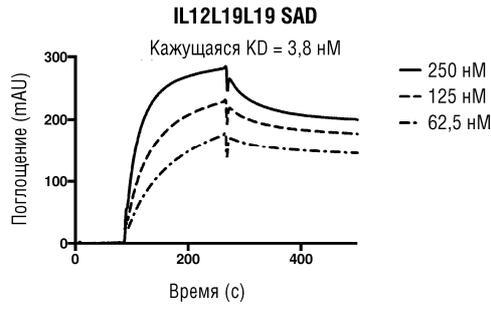
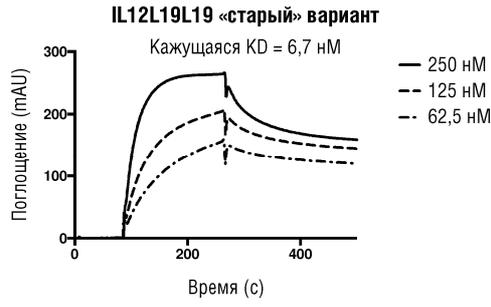


Фиг. 5



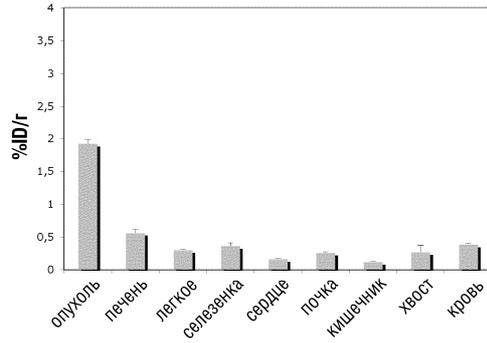
Фиг. 6



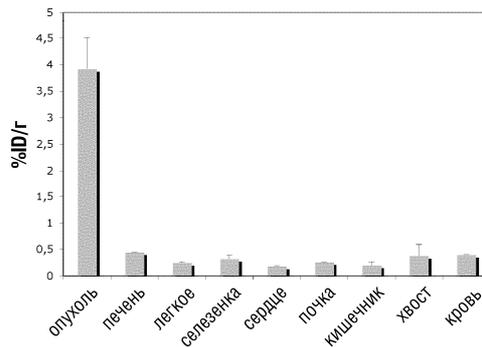


Фиг. 10

Нацеливание на опухоль через 24 ч  
после введения «старого» варианта



Нацеливание на опухоль через 24 ч  
после введения варианта «SAD»



Фиг. 11

