(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202490928 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.06.20

(22) Дата подачи заявки
2022.10.12

(51) Int. Cl. ***C07K 14/54*** (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(54) НОВЫЕ ИММУНОКОНЪЮГАТЫ ИНТЕРЛЕЙКИНА-7

(31) **21202553.0**
(32) **2021.10.14**
(33) **EP**
(86) **PCT/EP2022/078330**
(87) **WO 2023/062050 2023.04.20**

(71) Заявитель:
Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Карпи Гутьеррес Сирлос Алехандро (DE), Кодарри Деак Лаура, Дурини Грета, Фраймозер-Грундшобер Анне, Кляйн Кристиан (CH), Колль Йоханн (DE), Лауэнер Лаура, Мёсснер Эккехард, Николини Валерия, Шуленбург Синди, Уманья Пабло (CH)

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

(57) Настоящее изобретение в целом относится к мутантным полипептидам интерлейкина-7, иммуноконъюгатам, в частности иммуноконъюгатам, содержащим мутантный полипептид интерлейкина-7 и антитело, которое связывается с PD-1. Кроме того, изобретение относится к полинуклеотидным молекулам, кодирующим мутантные полипептиды интерлейкина-7 или иммуноконъюгаты, а также к векторам и клеткам-хозяевам, содержащим такие полинуклеотидные молекулы. Изобретение также относится к способам получения мутантных полипептидов интерлейкина-7, иммуноконъюгатов, фармацевтических композиций, содержащих таковые, и к способам их применения.

202490928 A1

202490928 A1

НОВЫЕ ИММУНОКОНЪЮГАТЫ ИНТЕРЛЕЙКИНА-7

Область техники

Настоящее изобретение в целом относится к мутантным полипептидам интерлейкина-7, иммуноконъюгатам, в частности иммуноконъюгатам, содержащим мутантный полипептид интерлейкина-7 и антитело, которое связывается с PD-1. Кроме того, изобретение относится к полинуклеотидным молекулам, кодирующим мутантный полипептид интерлейкина-7 или иммуноконъюгаты, а также к векторам и клеткам-хозяевам, содержащим такие полинуклеотидные молекулы. Изобретение также относится к способам получения мутантного полипептида интерлейкина-7 или иммуноконъюгатов, фармацевтических композиций, содержащих таковые, и путям их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Интерлейкин-7 (ИЛ-7) представляет собой цитокин, в основном секретируемый стромальными клетками лимфоидных тканей. Он участвует в созревании лимфоцитов, например, путем стимуляции дифференцировки мультипотентных гемопоэтических стволовых клеток в лимфобласты. ИЛ-7 необходим для развития и выживания Т-клеток, а также для гомеостаза зрелых Т-клеток. Недостаток ИЛ-7 вызывает остановку незрелых иммунных клеток (Lin J. et al. (2017), Anticancer Res. 37(3):963-967).

ИЛ-7 связывается с рецептором ИЛ-7, который состоит из альфа-цепи ИЛ-7R (ИЛ-7Rα, CD127), а также общей гамма-цепи (γc, CD132, ИЛ-2Rγ), который является общим для интерлейкинов ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-9, ИЛ-15 и ИЛ-21 (Rochman Y. et al., (2009) Nat Rev Immunol. 9:480–490). В то время как γc экспрессируется большинством гемопоэтических клеток, ИЛ-7Rα почти исключительно экспрессируется клетками лимфоидного происхождения (Mazzucchelli R. and Durum S.K. (2007 г.) Nat Rev Immunol. 7(2):144-54). ИЛ-7Rα обнаруживается на поверхности Т-клеток при их дифференцировке от наивных до эффекторных, в то время как его экспрессия снижена на терминально дифференцированных Т-клетках и практически отсутствует на поверхности регуляторных Т-клеток. Уровни экспрессии мРНК и белка ИЛ-7Rα отрицательно

регулируются ИЛ-2, поэтому ИЛ-7Rα подавляется в недавно активированных Т-клетках, экспрессирующих ИЛ-2Rα (CD25) (Xue H.H, et al. 2002, PNAS. 99(21):13759-64), этот механизм обеспечивает опосредованную ИЛ-2 быструю клональную экспансию недавно примированных Т-клеток, в то время как роль ИЛ-7 заключается в одинаковом поддержании всех клонов Т-клеток. ИЛ-7Rα также недавно описывали в только что охарактеризованной популяции предшественников CD8 Т-клеток, TCF-1+ PD-1+ стволовых CD8 Т-клетках, которые обнаруживаются в опухоли пациентов с раком, отвечающих на блокаду PD-1 (Hudson et al., 2019, Immunity 51, 1043-1058; Im et al., PNAS, vol. 117, no. 8, 4292-4299; Siddiqui et al., 2019, Immunity 50, 195-211; Held et al., Sci., Transl. Med. 11; eaay6863 (2019); Vodnala and Restifo, Nature, Vol 576, 19/26 December 2019). Хотя до сегодняшнего дня нет научных описаний действия ИЛ-7 на стволовые Т-клетки, такие как CD8, ИЛ-7 можно использовать для расширения этой популяции опухолереактивных Т-клеток с целью увеличения числа пациентов, отвечающих на ингибиторы контрольных точек.

ИЛ-7, ИЛ-7Rα и γc образуют тройной комплекс, который передает сигналы по пути JAK/STAT (преобразователь сигнала Янус-киназа (JAK) и активатор транскрипции (STAT)), а также по сигнальному каскаду PI3K/Akt (фосфатидилинозитол 3-киназа (PI3K), серин/треониновая протеинкиназа, протеинкиназа B (AKT)), что приводит к развитию и гомеостазу B- и Т-клеток (Niu N. and Qin X. (2013) Cell Mol Immunol. 10(3):187-189, Jacobs et al., (2010), J Immunol.184(7): 3461–3469).

ИЛ-7 представляет собой мономерный белок на основе 4-спирального пучка, массой 25 кДа. Длина спирали варьируется от 13 до 22 аминокислот, что аналогично длине спирали других распространенных гамма-цепей (γc, CD132, ИЛ-2Rγ), связывающих интерлейкины. Однако ИЛ-7 демонстрирует уникальный поворотный мотив в спирали A, который, как было показано, стабилизирует взаимодействие ИЛ-7/ИЛ-7Rα (McElroy, C.A. et al., (2009) Structure 17: 54-65). В то время как спираль A взаимодействует с обеими рецепторными цепями ИЛ-7Rα и γc, спираль C взаимодействует преимущественно с ИЛ-7Rα, а спираль D взаимодействует с цепью γc (последовательности и структурные выравнивания основаны на PDB:3DI2 и PDB:2ERJ). Варианты ИЛ-7 с модификациями для

снижения гетерогенности и/или снижения аффинности/активности были описаны в WO 2020/127377 A1 и WO 2020/236655 A1.

Белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1 или CD279) является представителем ингибиторов семейства рецепторов CD28, которое также включает CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD-1 представляет собой рецептор клеточной поверхности и экспрессируется на активированных B-клетках, T-клетках и миелоидных клетках (Okazaki et al (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170:711-8). Структура PD-1 представляет собой мономерный трансмембранный белок типа 1, состоящий из одного внеклеточного домена, подобного иммуноглобулину, и цитоплазматического домена, содержащего ингибиторный мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITIM) и мотив переключения иммунорецептора на основе тирозина (ITSM). Были идентифицированы два лиганда для PD-1, PD-L1 и PD-L2, которые, как было показано, снижают уровень активации T-клеток при связывании с PD-1 (Freeman et al (2000) J Exp Med 192: 1027-34; Latchman et al (2001) Nat Immunol 2:261-8; Carter etal (2002) Eur J Immunol 32:634-43). Как PD-L1, так и PD-L2 являются гомологами B7, которые связываются с PD-1, но не связываются с другими представителями семейства CD28. Один лиганд для PD-1, PD-L1, встречается в большом количестве при различных раковых заболеваниях человека (Dong et al (2002) Nat. Med 8:787-9). Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 приводит к уменьшению инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, уменьшению пролиферации, опосредованной T-клеточным рецептором, что позволяет раковым клеткам уклоняться от иммунного ответа (Dong et al. (2003) J. MoI. Med. 81:281-7; Blank et al. (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54:307-314; Konishi et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:5094-100). Подавление иммунитета можно обратить вспять, ингибируя местное взаимодействие PD-1 с PD-L1, и эффект является аддитивным, когда также блокируется взаимодействие PD-1 с PD-L2 (Iwai et al. (2002) Proc. Nat 7. Acad. ScL USA 99: 12293-7; Brown et al. (2003) J. Immunol. 170:1257-66).

Антитела, которые связываются с PD-1, описаны, например, в WO 2017/055443 A1.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложен новый подход к нацеливанию мутантной формы ИЛ-7 с благоприятными свойствами для иммунотерапии непосредственно на иммунные эффекторные клетки, такие как цитотоксические Т-лимфоциты, а не на опухолевые клетки, путем конъюгации мутантного полипептида ИЛ-7 с антителом, которое связывается с PD-1. Это приводит к цис-доставке мутантного ИЛ-7 к экспрессирующим PD-1 иммунным субпопуляциям, а именно к опухолереактивным Т-клеткам, например, субпопуляциям CD8+ PD1+ TCF+ Т-клеток и их потомству.

Мутанты ИЛ-7, используемые в настоящем изобретении, разрабатывались для преодоления проблем, связанных с цитокиновой иммунотерапией, в частности, токсичности, вызванной индукцией VLS, толерантности к опухоли, вызванной индукцией AICD, и иммуносупрессии, вызванной активацией T_{reg}-клеток. В дополнение к ускользанию опухолей от нацеливания на опухоль, как упоминалось выше, нацеливание мутантного ИЛ-7 на иммунные эффекторные клетки может дополнительно увеличить предпочтительную активацию опухолеспецифических ЦТЛ по сравнению с иммуносупрессивными T_{reg}-клетками из-за более низких уровней экспрессии PD-1 и ИЛ-7Rα на Tregs, чем на ЦТЛ. При использовании антитела, которое связывается с PD-1, подавление активности Т-клеток, вызванное взаимодействием PD-1 с его лигандом PD-L1, может быть дополнительно обращено вспять, что дополнительно усиливает иммунный ответ.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к мутантному полипептиду интерлейкина-7 (ИЛ-7), содержащему аминокислотную замену в положении G85 ИЛ-7 человека согласно SEQ ID NO: 28, причем аминокислотная замена снижает аффинность связывания мутантного полипептида интерлейкина-7 с ИЛ-7Rα по сравнению с полипептидом интерлейкина-7, содержащим SEQ ID NO: 28. В одном аспекте мутантный полипептид интерлейкина-7 содержит аминокислотную замену G85E. В дополнительном аспекте мутантный полипептид интерлекина-7 дополнительно содержит аминокислотную замену в положении K81. В другом варианте осуществления мутантный полипептид интерлейкина-7 содержит аминокислотную замену K81E.

В одном аспекте мутантный полипептид интерлейкина-7 дополнительно содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении,

выбранном из группы, состоящей из T93 и S118, при этом указанная аминокислотная замена снижает гликозилирование мутантного полипептида интерлейкина-7 по сравнению с мутантным полипептидом интерлейкина-7 без указанных аминокислотных замен. В одном аспекте указанная аминокислотная замена(ы) выбрана из группы T93A и S118A. В другом аспекте мутантный полипептид интерлейкина-7 содержит аминокислотные замены T93A и S118A.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложен иммуноконъюгат, содержащий (i) мутантный полипептид ИЛ-7, описанный в настоящем документе, и (ii) антитело. В одном аспекте указанное антитело связывается с PD-1. В одном аспекте антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, и FR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, в положениях 71-73 в соответствии с нумерацией по Кабату, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

В одном аспекте антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13. В дополнительном аспекте антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%,

96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO:18.

В одном аспекте иммуноконъюгат содержит не более одного мутантного полипептида ИЛ-7.

В другом аспекте антитело содержит Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц. В одном аспекте Fc-домен представляет собой Fc-домен класса IgG, в частности подкласса IgG1. В дополнительном аспекте Fc-домен представляет собой Fc-домен человека.

В одном аспекте антитело представляет собой иммуноглобулин класса IgG, в частности подкласса IgG1.

В одном аспекте Fc-домен содержит модификацию, способствующую ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена. В одном аспекте в CH3-домене первой субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим больший объем боковой цепи, с созданием, таким образом, выпуклости в CH3-домене первой субъединицы, которая может располагаться в полости в CH3-домене второй субъединицы, а в CH3-домене второй субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим меньший объем боковой цепи, с созданием, таким образом, полости в CH3-домене второй субъединицы, в которой может располагаться выпуклость из CH3-домена первой субъединицы. В другом аспекте в первой субъединице Fc-домена остаток треонина в положении 366 замещен остатком триптофана (T366W), а во второй субъединице Fc-домена остаток тирозина в положении 407 замещен остатком валина (Y407V), и необязательно остаток треонина в положении 366 замещен остатком серина (T366S), а остаток лейцина в положении 368 замещен остатком аланина (L368A) (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В дополнительном аспекте в первой субъединице Fc-домена дополнительно остаток серина в позиции 354 замещен остатком цистеина (S354C), или остаток глутаминовой кислоты в позиции 356 замещен остатком цистеина (E356C), а во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток тирозина в позиции 349 замещен остатком цистеина (Y349C) (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

В одном аспекте мутантный полипептид ИЛ-7 слит на его аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой одной из субъединиц Fc-домена, в частности, первой субъединицы Fc-домена, необязательно с помощью линкерного пептида. В одном аспекте линкерный пептид имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В другом аспекте Fc-домен содержит одну или более аминокислотных замен, которые уменьшают связывание с Fc-рецептором, в частности, Fcγ-рецептором, и/или эффекторную функцию, в частности, антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ). В одном аспекте указанная одна или более аминокислотных замен происходят в одном или более положениях, выбранных из группы L234, L235 и P329 (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В одном аспекте каждая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает иммуноконъюгат, содержащий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33, полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 34, и полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40.

В одном аспекте иммуноконъюгат главным образом состоит из мутантного полипептида ИЛ-7 и молекулы иммуноглобулина IgG1, соединенных посредством линкерной последовательности. В другом аспекте иммуноконъюгат главным образом состоит из мутантного полипептида ИЛ-7 и молекулы иммуноглобулина IgG1, соединенных посредством линкера SEQ ID NO: 19.

В одном аспекте предложен один или более выделенных полинуклеотидов, кодирующих мутантный полипептид ИЛ-7 по настоящему изобретению или иммуноконъюгат по настоящему изобретению. В одном аспекте в настоящем изобретении предложены один или более векторов, в частности векторов

экспрессии, содержащих полинуклеотид(ы) по настоящему изобретению. В одном аспекте в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид(ы) или вектор(ы) по настоящему изобретению.

В одном аспекте предложен способ получения мутантного полипептида ИЛ-7 или иммуноконъюгата, содержащего мутантный полипептид ИЛ-7 и антитело, которое связывается с PD-1, включающий (а) культивирование клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии мутантного полипептида ИЛ-7 или иммуноконъюгата по настоящему изобретению, и необязательно (б) восстановление мутантного полипептида ИЛ-7 или иммуноконъюгата. В одном аспекте в изобретении предложен мутантный полипептид ИЛ-7 или иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид ИЛ-7 и антитело, которое связывается с PD-1, полученное с помощью указанного способа.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая мутантный полипептид ИЛ-7 или иммуноконъюгат по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложены мутантный полипептид ИЛ-7 или иммуноконъюгат по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложен мутантный полипептид ИЛ-7 или иммуноконъюгат по настоящему изобретению для применения в лечении заболевания. В одном аспекте указанное заболевание представляет собой рак.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предложено применение мутантного полипептида ИЛ-7 или иммуноконъюгата по настоящему изобретению в производстве лекарственного средства для лечения заболевания. В одном аспекте указанное заболевание представляет собой рак.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения заболевания у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму терапевтически эффективного количества композиции, содержащей мутантный полипептид ИЛ-7 или иммуноконъюгат по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемой форме. В одном аспекте указанное заболевание представляет собой рак.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ стимуляции иммунной системы индивидуума, включающий введение указанному

индивидууму эффективного количества композиции, содержащей мутантный полипептид ИЛ-7 или иммуноконъюгат по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемой форме.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1: Схематическое изображение формата иммуноконъюгата IgG-ИЛ-7, содержащего два Fab-домена (вариабельный домен, константный домен), гетеродимерный Fc-домен и мутантный полипептид ИЛ-7, слитый с С-концом Fc-домена.

Фиг. 2: Профили N-гликозилирования вариантов PD1-ИЛ7 (N-гликаны, высвобождаемые из фрагмента Fc и ИЛ7). Следы в сплошной линии получены из вариантов, экспрессируемых в стабильных трансформированных клетках CHO, а следы в пунктирной линии экспрессируются во временно трансфицированных клетках CHO. PD1-ИЛ7 VAR21, полностью гликозилированный, экспрессировался в стабильных трансформированных (А) и временно трансфицированных (Г) клетках CHO. PD1-ИЛ7 VAR21, частично гликозилированный, экспрессировался в стабильных трансформированных (Б) и временно трансфицированных (Д) клетках CHO. PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21, частично гликозилированый, экспрессировался в стабильных трансформированных (В) и временно трансфицированных (Е) клетках CHO.

Фиг. 3А и 3Б: Передача сигналов ИЛ-7R (STAT5-P) в совместно культивируемых предварительно блокированных PD1 и $PD1^+$ CD4 Т-клетках при обработке с помощью PD1-ИЛ7 VAR21 полностью и частично гликозилированным (фиг. 3А) и PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21 полностью и частично гликозилированным (фиг. 3Б). Передача сигналов ИЛ-7R (STAT5-P), представленная как частота Т-клеток STAT5-P, в совместно культивируемых $PD1^+$ (сплошная линия) и предварительно блокированных PD-1 (пунктирная линия) CD4 Т-клетках при воздействии через 12 мин. Для полностью и частично гликозилированного PD1-ИЛ7 VAR21 объединяли данные двух разных производственных партий с разными системами экспрессии (переходной и стабильной экспрессией) (среднее ± СКО).

Фиг. 4: Воздействие в виде концентрации лекарственного средства, обнаруживаемой в сыворотке крови гуманизированных мышей через 4 и 72 часа после первого и второго подкожного введения PD1-ИЛ7 VAR21, полностью

гликозилированного, PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21, полностью гликозилированного, и PD1-ИЛ7дт.

Фиг. 5А и 5Б: Передача сигналов ИЛ-7R (STAT5-P) в совместно культивируемых предварительно блокированных PD1 и $PD1^+$ CD4 Т-клетках при обработке эталонными молекулами 5-8 (фиг. 5А) и эталонными молекулами 9-10 (фиг. 5Б) по сравнению с PD1-ИЛ7 VAR21, полностью гликозилированным. Передача сигналов ИЛ-7R (STAT5-P), представленная как частота STAT5-P, в совместно культивируемых $PD1^+$ (сплошная линия) и предварительно блокированных PD-1 (пунктирная линия) CD4 Т-клетках при воздействии через 12 мин. Среднее значение ± СОО для 3 доноров.

Подробное описание изобретения

Определения

В настоящем документе термины используют так, как это общепринято в данной области техники, если ниже не приведено иное определение.

Подразумевается, что термин «аминокислотная мутация», как используется в настоящем документе, включает аминокислотные замены, делеции, вставки и модификации. Можно осуществлять любую комбинацию замены, делеции, вставки и модификации, чтобы получить конечную конструкцию, при условии, что конечная конструкция обладает необходимыми характеристиками, например, сниженным связыванием с ИЛ-7Rα и/или ИЛ-2Rγ. Делеции и вставки в аминокислотной последовательности включают амино- и/или карбоксиконцевые делеции и вставки аминокислот. Примером терминальной делеции является делеция остатка в положении 1 полноразмерного ИЛ-7 человека. Предпочтительными аминокислотными мутациями являются аминокислотные замены. В целях изменения, например, характеристик связывания полипептида ИЛ-7, в особенности предпочтительными являются неконсервативные аминокислотные замены, т. е. замещение одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей отличные структурные и/или химические свойства. Предпочтительные аминокислотные замены включают замену гидрофобной аминокислоты на гидрофильную. Аминокислотные замены включают замещение не встречающимися в природе аминокислотами или встречающимися в природе аминокислотными производными двадцати стандартных аминокислот (например, 4-гидроксипролином, 3-метилгистидином, орнитином, гомосерином, 5-

гидроксилизином). Аминокислотные мутации можно создавать, используя хорошо известные в данной области техники генетические или химические способы. Генетические способы могут включать сайт-направленный мутагенез, ПЦР, генный синтез и т.п. Подразумевается, что также могут быть применимы способы изменений групп боковых цепей аминокислот способами, отличными от генной инженерии, такими как химическая модификация.

«Аффинность» относится к силе суммарных нековалентных взаимодействий между одним связывающим сайтом молекулы (например, рецептором) и его партнером по связыванию (например, лигандом). Если не указано иное, в контексте данного документа «аффинность связывания» относится к характерной аффинности связывания, которая отображает 1:1 взаимодействие между членами пары связывания (например, антигенсвязывающим фрагментом и антигеном или рецептором и его лигандом). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y в общем случае можно выразить константой диссоциации ($K_Д$), которая представляет собой отношение констант диссоциации и ассоциации ($k_{дисс.}$ и $k_{асс.}$, соответственно). Таким образом, эквивалентные аффинности могут включать разные константы скорости при условии, что отношение между константами скорости остается одинаковым. Аффинность можно измерять хорошо отработанными способами, известными в данной области техники, включая способы, описанные в данном документе. Конкретным способом измерения аффинности является поверхностный плазмонный резонанс (ППР).

ИЛ-7 связывается с рецептором ИЛ-7, который состоит из альфа-цепи ИЛ-7R (также называемой в данном документе ИЛ-7Rальфа, ИЛ-7Rα, ИЛ7Rα, ИЛ-7a, ИЛ7Ra или CD127), а также обычной гамма-цепи (также обозначаемая в данном документе как γc, CD132, ИЛ-2Rгамма, ИЛ-2Rg, ИЛ2Rg, ИЛ-2Rγ или ИЛ2Rγ), которая общая для интерлейкинов ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-9, ИЛ-15 и ИЛ-21 (Rochman Y. et al., (2009) Nat Rev Immunol. 9:480–490).

Аффинность мутантного полипептида ИЛ-7 или полипептида дикого типа к рецептору ИЛ-7 можно определить в соответствии со способом, изложенным в WO 2012/107417, способом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с применением стандартного прибора, такого как инструмент BIAcore (GE Healthcare) и субъединиц рецептора, которые могут быть получены путем рекомбинантной экспрессии (смотрите, например, Shanafelt et al., Nature

Biotechnol 18, 1197-1202 (2000)). В качестве альтернативы, аффинность связывания мутантов ИЛ-7 с рецептором ИЛ-7 можно оценить с использованием клеточных линий, о которых известно, что они экспрессируют одну или другую такую форму рецептора. Конкретные иллюстративные и примерные варианты осуществления для измерения аффинности связывания описаны в данном документе выше.

В контексте данного документа термин «интерлейкин-7» или «ИЛ-7» относится к любому нативному ИЛ7 из любого источника, относящегося к позвоночным, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. Данный термин охватывает непроцессированный ИЛ-7, а также любую форму ИЛ-7, полученную в результате процессинга в клетке. Данный термин также включает варианты ИЛ-7 природного происхождения, например сплайс-варианты или аллельные варианты. Аминокислотная последовательность примерного ИЛ-7 человека представлена в SEQ ID NO: 28.

Термин «мутантный ИЛ-7» или «мутантный полипептид ИЛ-7», используемый в данном документе, охватывает любые мутантные формы различных форм молекулы ИЛ-7, включая полноразмерный ИЛ-7, укороченные формы ИЛ-7 и формы, в которых ИЛ-7 связан с другой молекулой, например, путем слияния или химической конъюгации. «Полноразмерный» при использовании в отношении ИЛ-7 предназначен для обозначения зрелой молекулы ИЛ-7 природной длины. Например, полноразмерный ИЛ-7 человека относится к молекуле, имеющей полипипептидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 28. Различные формы мутантов ИЛ-7 характеризуются наличием по меньшей мере одной аминокислотной мутации, влияющей на взаимодействие ИЛ-7 с ИЛ7Rальфа и/или ИЛ2Rгамма. Такая мутация может включать замену, делецию, усечение или модификацию аминокислотного остатка дикого типа, обычно расположенного в этом положении. Предпочтительны мутанты, полученные с помощью аминокислотной замены. Если не указано иное, мутантный ИЛ-7 может упоминаться в данном документе как мутантная пептидная последовательность ИЛ-7, мутантный полипептид ИЛ-7, мутантный белок ИЛ-7, мутантный аналог ИЛ-7 или вариант ИЛ-7.

Обозначение различных форм ИЛ-7 в настоящем документе сделано относительно последовательности, показанной в SEQ ID NO: 28. Для указания одной и той же мутации в данном документе можно использовать различные обозначения. Например, мутация валина в положении 15 на аланин может быть обозначена как 15A, A15, A_{15}, V15A или Val15Ala.

Под «молекулой ИЛ-7 человека», используемой в данном документе, понимается молекула ИЛ-7, содержащая аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 91%, по меньшей мере на приблизительно 92%, по меньшей мере на приблизительно 93%, по меньшей мере на приблизительно 94%, по меньшей мере на приблизительно 95% или по меньшей мере на приблизительно 96% идентичной последовательности SEQ ID NO:28 ИЛ-7 человека. В частности, идентичность последовательности составляет по меньшей мере приблизительно 95%, более конкретно по меньшей мере приблизительно 96%. В конкретных вариантах осуществления молекула ИЛ-7 человека представляет собой полноразмерную молекулу ИЛ-7.

Используемый в данном документе термин «дикий тип» формы ИЛ-7 представляет собой форму ИЛ-7, которая во всем остальном аналогична мутантному полипептиду ИЛ-7, за исключением того, что форма дикого типа имеет аминокислоту дикого типа в каждом аминокислотном положении мутантного полипептида ИЛ-7. Например, если мутантный ИЛ-7 представляет собой полноразмерный ИЛ-7 (т. е. ИЛ-7, не слитый или конъюгированный с какой-либо другой молекулой), форма дикого типа этого мутанта представляет собой полноразмерный нативный ИЛ-7. Если мутантный ИЛ-7 представляет собой слияние между ИЛ-7 и другим полипептидом, кодируемым в нисходящем направлении ИЛ-7 (например, цепи антитела), форма дикого типа этого мутантного ИЛ-7 представляет собой ИЛ-7 с аминокислотной последовательностью дикого типа, слитую с одним и тем же нисходящим полипептидом. Более того, если мутантный ИЛ-7 представляет собой укороченную форму ИЛ-7 (мутированная или модифицированная последовательность в неукороченной части ИЛ-7), то форма этого мутантного ИЛ-7 дикого типа представляет собой укороченный ИЛ-7, который имеет последовательность дикого типа. Для сравнения аффинности связывания с рецептором ИЛ-7, связывания с рецептором ИЛ-7 или биологической активности

различных форм мутантов ИЛ-7 с соответствующей формой ИЛ-7 дикого типа термин «дикий тип» охватывает формы ИЛ-7, содержащие одну или несколько аминокислотных мутаций, которые не влияют на связывание рецептора ИЛ-7 по сравнению с встречающимся в природе нативным ИЛ-7. В определенных вариантах осуществления данного изобретения полипептид ИЛ-7 дикого типа, с которым сравнивают мутантный полипептид ИЛ-7, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

Под «регуляторными Т-клетками» или «T_{reg}-клетками» подразумевают специализированный тип $CD4^+$ Т-клеток, которые могут подавлять ответы других Т-клеток, называемые периферической толерантностью. Клетки T_{reg} характеризуются повышенной экспрессией α-субъединицы рецептора ИЛ-2 (CD25), низким уровнем или отсутствием ИЛ-7Rα (CD127) и фактора транскрипции forkhead box P3 (FOXP3) (Sakaguchi, Annu Rev Immunol 22, 531-62 (2004)) и играют решающую роль в индукции и поддержании периферической самотолерантности к антигенам, в том числе экспрессируемым опухолями. Используемый в данном документе термин «эффекторные клетки» относится к популяции лимфоцитов, на выживание и/или гомеостаз которых влияет ИЛ-7. Эффекторные клетки включают клетки памяти CD4+ и CD8+ и недавно примированные Т-клетки, включая опухолереактивные стволовые Т-клетки.

Используемый в настоящем документе термин «PD1», «PD1 человека», «PD-1» или «PD-1 человека» (также известный как белок запрограммированной клеточной смерти 1 или фактор запрограммированной клеточной смерти 1) относится к белку PD1 человека (SEQ ID NO: 21, белок без сигнальной последовательности) / (SEQ ID NO: 22, белок с сигнальной последовательностью). Также см. № доступа Q15116 в UniProt (версия 156). Используемые в данном документе термины антитело, «связывающееся с PD-1», «специфически связывающееся с PD-1», «которое связывается с PD-1» или «антитело к PD-1» относится к антителу, которое способно связывать PD-1, особенно полипептид PD-1, экспрессируемый на клеточной поверхности, с достаточной аффинностью, так что антитело можно использовать в качестве диагностического и/или терапевтического агента для нацеливания на PD-1. В одном варианте осуществления степень связывания антитела к PD-1 с неродственным белком, отличным от PD-1, составляет менее приблизительно 10% от связывания антитела с PD-1, как измерено, например, с помощью

радиоиммуноанализа (RIA), или проточной цитометрии (FACS), или анализа поверхностного плазмонного резонанса с использованием биосенсорной системы, такой как система Biacore®. В определенных вариантах осуществления антитело, которое связывается с PD-1, имеет значение KD аффинности связывания для связывания с PD-1 человека ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, ≤ 0,1 нМ, ≤ 0,01 нМ или ≤ 0,001 нМ (например, 10^{-8} М или меньше, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М). В одном варианте осуществления значение КД аффинности связывания определяют в анализе поверхностного плазмонного резонанса с использованием внеклеточного домена (ECD) PD-1 человека (PD-1-ECD, смотрите SEQ ID NO: 27) в качестве антигена.

Под выражением «специфическое связывание» подразумевается, что связывание является избирательным в отношении антигена и может быть отделено от нежелательных или неспецифических взаимодействий. Способность антитела связываться с конкретным антигеном (например, PD-1) можно определить с помощью ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA) или других методик, известных специалисту в данной области техники, например, метода поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (с анализом на приборе BIAcore) (Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), и традиционных анализов связывания (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). В одном варианте осуществления степень связывания антитела с неродственным белком составляет менее чем приблизительно 10% связывания антитела с антигеном при измерении, например, методом ППР. Антитело, содержащееся в описанном в данном документе иммуноконъюгате, специфически связывается с PD-1.

В контексте настоящего документа термин «полипептид» относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин «полипептид» относится к любой цепи из двух или более аминокислот и не относится к конкретной длине продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, «белок», «аминокислотная цепь» или любой другой термин, используемый для обозначения цепи из двух или более аминокислот, включены в определение «полипептид», а термин «полипептид» может использоваться вместо или взаимозаменяемо с любым из этих терминов. Термин «полипептид» также предназначен для обозначения продуктов постэкспрессионных модификаций полипептида, включая, без ограничения,

гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификацию не встречающимися в природе аминокислотами. Полипептид может быть получен из природного биологического источника или получен с помощью рекомбинантной технологии, но не обязательно транслируется с указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Его можно получить любым способом, в том числе путем химического синтеза. Полипептиды могут иметь определенную трехмерную структуру, хотя они не обязательно имеют такую структуру. Полипептиды с определенной трехмерной структурой называются свернутыми, а полипептиды, которые не обладают определенной трехмерной структурой, но могут принимать большое количество различных конформаций, называются развернутыми.

Под «выделенным» полипептидом, или его вариантом, или производным подразумевается полипептид, который не находится в своем естественном окружении. Никакого конкретного требования по уровню очистки не существует. Например, выделенный полипептид может быть удален из его нативного или природного окружения. Рекомбинантно полученные полипептиды или белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, считаются выделенными для целей настоящего изобретения, как нативные, так и рекомбинантные полипептиды, которые были отделены, фракционированы или частично или полностью очищены любым подходящим методом.

«Процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей» относительно эталонной полипептидной последовательности определяется как процентная доля аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными с аминокислотными остатками в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и внесения, в случае необходимости, гэпов для достижения максимальной идентичности последовательностей, но без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотной последовательности можно осуществлять различными способами, которые известны в данной области техники, например, используя общедоступное компьютерное программное обеспечение, такое как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, Clustal W, Megalign (DNASTAR) или программный пакет FASTA.

Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. При этом в контексте данного документа значения % идентичности аминокислотных последовательностей получают, используя программу ggsearch из пакета FASTA версии 36.3.8c или более поздней с матрицей сравнения BLOSUM50. Программный пакет FASTA был создан W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), “Improved Tools for Biological Sequence Analysis”, PNAS 85:2444-2448; W. R. Pearson (1996) “Effective protein sequence comparison” Meth. Enzymol. 266:227-258; и Pearson et. al. (1997) Genomics 46:24-36, и находится в открытом доступе на http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml. В альтернативном варианте для сравнения последовательностей можно использовать общедоступный сервер на http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi, используя программу ggsearch (global protein:protein) и параметры по умолчанию (BLOSUM50; open: -10; продление: -2; Ktup = 2) для обеспечения выполнения общего, а не местного, выравнивания. Процент идентичности аминокислот дан в заголовке выходных данных выравнивания.

Термин «полинуклеотид» относится к выделенной молекуле или конструкции нуклеиновой кислоты, например, матричной РНК (мРНК), вирусной РНК или плазмидной ДНК (пДНК). Полинуклеотид может содержать традиционную фосфодиэфирную связь или нетрадиционную связь (например, амидную связь, такую, как встречается в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Термин «молекула нуклеиновой кислоты» относится к любому одному или более сегментам нуклеиновой кислоты, например, фрагментам ДНК или РНК, присутствующим в полинуклеотиде.

Под «выделенными» молекулой нуклеиновой кислоты или полинуклеотидом подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которая была удалена из своего нативного окружения. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащийся в векторе, считается выделенным в контексте настоящего изобретения. Дополнительные примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, находящиеся в гетерологичных клетках-хозяевах, или очищенные (частично или главным образом) полинуклеотиды в

растворе. Выделенный полинуклеотид включает полинуклеотидную молекулу, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат эту полинуклеотидную молекулу, но в которых полинуклеотидная молекула присутствует внехромосомно или в хромосомном положении, которое отличается от ее природного хромосомного положения. Выделенные молекулы РНК включают *in vivo* или *in vitro* РНК-транскрипты по настоящему изобретению, а также положительные и отрицательные формы цепей и двухцепочечные формы. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты в соответствии с настоящим изобретением дополнительно включают такие молекулы, полученные синтетически. Дополнительно полинуклеотид или нуклеиновая кислота могут представлять собой или включать регуляторный элемент, такой как промотор, сайт связывания рибосомы или терминатор транскрипции.

«Выделенный полинуклеотид (или нуклеиновая кислота), кодирующие [например, иммуноконъюгат по данному изобретению]» относится к одной или более полинуклеотидным молекулам, кодирующим тяжелые и легкие цепи антитела и/или полипептиды ИЛ-7 (или их фрагменты), включая такую(ие) полинуклеотидную(ые) молекулу(ы) в одном векторе или отдельных векторах и такие молекулы нуклеиновых кислот, присутствующие в одной или более локациях в клетке-хозяине.

Термин «экспрессионная кассета» относится к полинуклеотиду, созданному рекомбинантным или синтетическим способом, с рядом определенных элементов нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают возможность транскрипции конкретной нуклеиновой кислоты в клетке-мишени. Рекомбинантная экспрессионная кассета может быть включена в плазмиду, хромосому, митохондриальную ДНК, пластидную ДНК, вирус или фрагмент нуклеиновой кислоты. Как правило, рекомбинантная экспрессионная кассета, как часть экспрессионного вектора, содержит, помимо других последовательностей, последовательность нуклеиновой кислоты, предназначенную для транскрипции, и промотор. В определенных вариантах осуществления экспрессионная кассета содержит полинуклеотидные последовательности, которые кодируют иммуноконъюгаты по данному изобретению или их фрагменты.

Термины «вектор» или «экспрессионный вектор» относятся к молекуле ДНК, которую используют для внесения и управления экспрессией конкретного

гена, с которым она функционально связана, в клетке. Этот термин включает вектор в виде самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую его внесли. Экспрессионный вектор по настоящему изобретению содержит экспрессионную кассету. Экспрессионные векторы делают возможной транскрипцию больших количеств стабильной мРНК. После того, как экспрессионный вектор оказывается в клетке, клеточная транскрипционная и/или трансляционная машинерия вырабатывает молекулу рибонуклеиновой кислоты или белок, кодируемые геном. В одном варианте осуществления экспрессионный вектор по изобретению содержит экспрессионную кассету, которая содержит полинуклеотидные последовательности, которые кодируют иммуноконъюгаты по данному изобретению или их фрагменты.

Термины «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые была внесена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают «трансформантов» и «трансформированные клетки», которые включают первично трансформированные клетки и полученное от них потомство вне зависимости от числа пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным исходной клетке по содержанию нуклеиновой кислоты и может содержать мутации. В данный документ включено мутантное потомство, которое имеет такую же функцию или биологическую активность, в отношении которых проводится скрининг или отбор изначально трансформированных клеток. Клетка-хозяин представляет собой любой тип клеточной системы, который можно использовать для генерации иммуноконъюгатов по настоящему изобретению. Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, такие как клетки HEK, клетки CHO, клетки BHK, клетки NS0, клетки SP2/0, клетки миеломы YO, клетки миеломы мышей P3X63, клетки PER, клетки PER.C6 или клетки гибридомы, клетки дрожжей, клетки насекомых и клетки растений, если называть только некоторые, но также клетки, присутствующие в организме трансгенного животного, трансгенного растения или культивируемой растительной или животной ткани.

Термин «антитело» в данном документе используется в самом широком смысле и включает различные структуры антител, включая, но не ограничиваясь этим, моноклональные антитела, поликлональные антитела,

мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют необходимую антигенсвязывающую активность.

В контексте данного документа термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции, по существу, гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением возможных вариантных антител, например, содержащих естественные мутации или возникающих во время получения препарата моноклональных антител, причем такие варианты в общем случае присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно содержат разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело препарата моноклональных антител направлено против одной детерминанты на антигене. Таким образом, определение «моноклональный» указывает на характеристику антитела, как полученного из, по существу, гомогенной популяции антител, и его не следует интерпретировать как требование получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для применения в соответствии с настоящим изобретением можно получать с помощью ряда методик, включая, но не ограничиваясь этим, метод гибридомы, методы рекомбинантных ДНК, методы фагового дисплея и методы с использованием трансгенных животных, содержащих все или часть локусов человеческого иммуноглобулина, причем такие методы и другие типичные методы получения моноклональных антител описаны в данном документе.

«Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое было отделено от компонента его естественного окружения, т. е. которое не находится в своей естественной среде. Никакого конкретного требования по уровню очистки не существует. Например, выделенное антитело может быть удалено из его нативного или естественного окружения. Рекомбинантно полученные антитела, экспрессируемые в клетках-хозяевах, считаются выделенными в контексте данного изобретения, как и нативные или рекомбинантные антитела, которые были отделены, фракционированы или частично или полностью очищены любым подходящим методом. Таким образом, иммуноконъюгаты по настоящему изобретению выделены. В некоторых вариантах осуществления

антитело является очищенным до более чем 95% или 99% чистоты по определению, например, электрофоретическими (например, ДСН-ПААГ, изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ), капиллярный электрофорез) или хроматографическими (например, ионообменная или обращенно-фазовая ВЭЖХ) способами. Обзор методов оценки чистоты антител см., например, в Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

В контексте данного документа термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «цельное антитело» используются взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, по существу, сходную со структурой нативного антитела.

«Фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител (например, scFv) и однодоменные антитела. Обзор некоторых фрагментов антител см. в Holliger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136 (2005). Обзор фрагментов scFv см., например, в Plückthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); также см. WO 93/16185 и патенты США №№ 5571894 и 5587458. Обсуждение фрагментов Fab и $F(ab')_2$, содержащих остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации и имеющих повышенное время полужизни in vivo, смотрите в патенте США №5869046. Диатела представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые могут быть двухвалентными или биспецифическими. См., например, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003); и Hollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). Триатела и тетратела также описаны в Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь или часть вариабельного домена тяжелой цепи или весь или часть вариабельного домена легкой цепи антитела. В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело (Domantis, Inc., Waltham, MA; смотрите, например, патент США № 6248516 B1). Фрагменты антител можно получать с помощью ряда методик, включая без ограничения протеолитическое расщепление

интактного антитела, а также выработку рекомбинантными клетками-хозяевами (например, *E. coli* или фага), как описано в данном документе.

Термин «молекула иммуноглобулина» относится к белку, имеющему структуру антитела природного происхождения. Например, иммуноглобулины класса IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины массой приблизительно 150000 дальтон, состоящие из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, которые связаны дисульфидными связями. В направлении от N-конца к С-концу каждая тяжелая цепь содержит вариабельный домен (VH), также называемый вариабельным доменом тяжелой цепи или вариабельной областью тяжелой цепи, за которым следуют три константных домена (CH1, CH2 и CH3), также называемых константной областью тяжелой цепи. Аналогично, в направлении от N-конца к С-концу каждая легкая цепь содержит вариабельный домен (VL), также называемый вариабельным доменом легкой цепи или вариабельной областью легкой цепи, за которым следует константный домен легкой цепи (CL), также называемый константной областью легкой цепи. Тяжелая цепь иммуноглобулина может быть отнесена к одному из пяти типов, называемых α (IgA), δ (IgD), ε (IgE), γ (IgG) или μ (IgM), некоторые из которых могут быть дополнительно поделены на подтипы, например, γ_1 (IgG_1), γ_2 (IgG_2), γ_3 (IgG_3), γ_4 (IgG_4), α_1 (IgA_1) и α_2 (IgA_2). Легкая цепь иммуноглобулина может быть отнесена к одному из двух типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотной последовательности ее константного домена. Иммуноглобулин состоит главным образом из двух молекул Fab и домена Fc, связанных посредством шарнирной области иммуноглобулина.

Термин «антигенсвязывающий домен» относится к части антитела, которая содержит участок, специфически связывающийся и комплементарный с частью антигена или со всем антигеном. Антигенсвязывающий домен может быть образован, например, одним или более вариабельными доменами антитела (также называемыми вариабельными областями антитела). В частности, антигенсвязывающий домен содержит вариабельный домен легкой цепи антитела (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи антитела (VH).

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела обычно имеют сходные структуры, при

этом каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три гипервариабельные области (HVR). (См., например, Kindt et al. Kuby Immunology, 6 изд., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)). Одного домена VH или VL может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. В контексте настоящего документа в связи с последовательностями вариабельных областей «нумерация по Кабату» относится к системе нумерации, описанной в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

В контексте настоящего документа аминокислотные позиции всех константных областей и доменов тяжелой и легкой цепи пронумерованы в соответствии с системой нумерации по Кабату, описанной в Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), называемой в данном документе «нумерацией соголасно Кабату» или «нумерацией по Кабату». В частности, систему нумерации по Кабату (смотрите страницы 647-660 в Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) используют для константного домена легкой цепи CL изотипа каппа или лямбда, а систему нумерации по индексу EU по Кабату (смотрите страницы 661-723) используют для константных доменов тяжелой цепи (CH1, шарнирная область, CH2 и CH3), что в таком случае дополнительно подчеркивается в данном документе названием «нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату».

В контексте данного документа термин «гипервариабельная область» или «HVR» относится к каждой из областей вариабельного домена антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности («определяющие комплементарность области» или «CDR») и/или образуют структурно определенные петли («гипервариабельные петли»), и/или содержат контактирующие с антигенами остатки («антигенные контакты»). Как правило, антитела содержат шесть HVR: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Иллюстративные HVR в данном документе включают:

(a) гипервариабельные петли, находящиеся в аминокислотных остатках 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(б) CDR, находящиеся в аминокислотных остатках 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(в) антигенные контакты, находящиеся в аминокислотных остатках 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); и

(г) комбинации из (а), (б) и/или (в), содержащие аминокислотные остатки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) и 94-102 (H3).

Если не указано иное, остатки HVR и другие остатки в вариабельном домене (например, остатки FR) нумеруются в данном документе в соответствии с Kabat et al., выше.

«Каркасная область» или «FR» относится к остаткам вариабельного домена, отличным от остатков гипервариабельной области (HVR). FR вариабельного домена обычно состоит из четырех FR-доменов: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно, последовательности HVR и FR в общем случае расположены в VH (или VL) в следующем порядке: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

«Гуманизированное» антитело относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки из отличных от человеческих HVR и аминокислотные остатки из человеческих FR. В определенных вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит практически все из по меньшей мере одного и, как правило, двух вариабельных доменов, в которых все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют таковым из нечеловеческого антитела, а все или практически все FR соответствуют таковым из человеческого антитела. Такие вариабельные домены называются в данном документе «гуманизированной вариабельной областью». Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, полученную из человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления некоторые остатки FR в гуманизированном антителе замещены соответствующими остатками нечеловеческого антитела (например, антитела, из которого получены остатки HVR), например, с целью восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

«Гуманизированная форма» антитела, например антитела нечеловеческого происхождения, относится к антителу, которое было подвергнуто гуманизации. Другие формы «гуманизированных антител», охватываемые настоящим изобретением, представляют собой те, в которых константная область была дополнительно модифицирована или изменена относительно исходного антитела для обеспечения свойств в соответствии с изобретением, в особенности в отношении связывания C1q и/или связывания Fc-рецептора (FcR).

«Человеческое антитело» представляет собой антитело, которое имеет аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемого человеком или клеткой человека, или полученного из отличного от человеческого источника, в котором используются репертуары человеческих антител или другие последовательности, кодирующие человеческие антитела. Данное определение человеческого антитела явным образом исключает гуманизированное антитело, содержащее отличные от человеческих антигенсвязывающие остатки. В определенных вариантах осуществления человеческое антитело получено от отличного от человека трансгенного млекопитающего, например, мыши, крысы или кролика. В определенных вариантах осуществления человеческое антитело получено из линии клеток гибридомы. Антитела или фрагменты антител, выделенные из библиотек человеческих антител, также считаются в данном документе человеческими антителами или фрагментами человеческих антител.

«Класс» антитела или иммуноглобулина относится к типу константного домена или константной области, содержащихся в его тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них можно дополнительно поделить на подклассы (изотипы), например, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 и IgA_2. Константные домены тяжелой цепи, соответствующие разным классам иммуноглобулинов, называются α, δ, ε, γ и μ, соответственно.

В настоящем документе термин «Fc-домен» или «Fc-область» используют для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Этот термин включает Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-области. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи IgG могут немного варьироваться, Fc-область тяжелой цепи IgG человека по определению обычно простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксиконца тяжелой цепи. При этом антитела, вырабатываемые

клетками-хозяевами, могут подвергаться посттрансляционному расщеплению одной или более, в частности, одной или двух аминокислот из С-конца тяжелой цепи. Следовательно, антитело, вырабатываемое клеткой-хозяином посредством экспрессии специфической молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полноразмерную тяжелую цепь, может содержать полноразмерную тяжелую цепь или может содержать расщепленный вариант полноразмерной тяжелой цепи (что также называется в данном документе «расщепленным вариантом тяжелой цепи»). Это может быть случаем, когда двумя последними С-концевыми аминокислотами тяжелой цепи являются глицин (G446) и лизин (K447, нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). Следовательно, С-концевой лизин (Lys447) или С-концевые глицин (Gly446) и лизин (K447) Fc-области могут присутствовать или нет. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей, включая Fc-домены (или субъединицу Fc-домена по определению в данном документе), обозначены в данном документе без С-концевого глицин-лизинового дипептида, если не указано иное. В одном варианте осуществления изобретения тяжелая цепь, содержащая субъединицу Fc-домена по определению в данном документе, содержащаяся в иммуноконъюгате в соответствии с изобретением, содержит дополнительный С-концевой глицин-лизиновый дипептид (G446 и K447, нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В одном варианте осуществления изобретения тяжелая цепь, содержащая субъединицу Fc-домена по определению в данном документе, содержащаяся в иммуноконъюгате в соответствии с изобретением, содержит дополнительный С-концевой остаток глицина (G446, нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). Композиции по изобретению, такие как описанные в данном документе фармацевтические композиции, содержат популяцию иммуноконъюгатов по изобретению. Популяция иммуноконъюгатов может содержать молекулы, имеющие полноразмерную тяжелую цепь, и молекулы, имеющие расщепленный вариант тяжелой цепи. Популяция иммуноконъюгатов может состоять из смеси молекул, имеющих полноразмерную тяжелую цепь, и молекул, имеющих расщепленный вариант тяжелой цепи, в котором по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% иммуноконъюгатов имеют расщепленный вариант тяжелой цепи. В одном варианте осуществления изобретения композиция, содержащая популяцию

иммуноконъюгатов по изобретению, содержит иммуноконъюгат, содержащий тяжелую цепь, содержащую субъединицу Fc-домена по определению в данном документе с дополнительным С-концевым глицин-лизиновым дипептидом (G446 и K447, нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В одном варианте осуществления изобретения композиция, содержащая популяцию иммуноконъюгатов по изобретению, содержит иммуноконъюгат, содержащий тяжелую цепь, содержащую субъединицу Fc-домена по определению в данном документе с дополнительным С-концевым остатком глицина (G446, нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В одном варианте осуществления изобретения композиция содержит популяцию иммуноконъюгатов, состоящую из молекул, содержащих тяжелую цепь, содержащую субъединицу Fc-домена по определению в данном документе; молекул, содержащих тяжелую цепь, содержащую субъединицу Fc-домена по определению в данном документе с дополнительным С-концевым остатком глицина (G446, нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату); и молекул, содержащих тяжелую цепь, содержащую субъединицу Fc-домена по определению в данном документе с дополнительным С-концевым глицин-лизиновым дипептидом (G446 и K447, нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). Если в данном документе не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует системе нумерации EU, также называемой EU-индексом, как это описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 (также см. выше) В контексте данного документа термин «субъединица» Fc-домена относится к одному из двух полипептидов, образующих димерный Fc-домен, т. е. полипептиду, содержащему С-концевые константные области тяжелой цепи иммуноглобулина, способные к стабильной самоассоциации. Например, субъединица Fc-домена IgG содержит константные домены CH2 IgG и CH3 IgG.

«Модификация, способствующая ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена» представляет собой манипуляцию с пептидным остовом или посттрансляционные модификации субъединицы Fc-домена, которые уменьшают или предотвращают ассоциацию полипептида, содержащего субъединицу Fc-домена, с идентичным полипептидом с образованием гомодимера. В контексте настоящего документа модификация, способствующая ассоциации, в частности,

включает отдельные модификации, проведенные в каждой из субъединиц Fc-домена, ассоциация которых необходима (т. е. в первой и второй субъединицах Fc-домена), причем модификации являются комплементарными по отношению друг к другу так, чтобы способствовать ассоциации двух субъединиц Fc-домена. Например, модификация, способствующая ассоциации, может изменять структуру или заряд одной или обеих субъединиц Fc-домена так, чтобы сделать их ассоциацию стерически или электростатически выгодной, соответственно. Таким образом, (гетеро)димеризация происходит между полипептидом, содержащим первую субъединицу Fc-домена, и полипептидом, содержащим вторую субъединицу Fc-домена, которые могут быть неидентичными в том смысле, что дополнительные компоненты, слитые с каждой из субъединиц (например, антигенсвязывающие фрагменты), не являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления модификация, способствующая ассоциации, включает аминокислотную мутацию в Fc-домене, в частности аминокислотную замену. В конкретном варианте осуществления модификация, способствующая ассоциации, включает отдельную аминокислотную мутацию, в частности аминокислотную замену, в каждой из двух субъединиц Fc-домена.

Термин «эффекторные функции», при использовании в отношении антител, относится к видам биологической активности, обеспечиваемым Fc-областью антитела, которые варьируются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ), связывание Fc-рецептора, антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ), секрецию цитокинов, опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора) и активацию B-клеток.

Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (АЗКЦ) представляет собой иммунный механизм, приводящий к лизису покрытых антителом клеток-мишеней иммунными эффекторными клетками. Клетки-мишени представляют собой клетки, с которыми специфически связываются антитела или их производные, содержащие Fc-область, в общем случае посредством белковой части, N-концевой относительно Fc-области. Как

используется в данном документе, термин «уменьшенная АЗКЦ» определяется как уменьшение числа клеток-мишеней, лизированных за заданное время при заданной концентрации антитела в среде, окружающей клетки-мишени, посредством определенного выше механизма АЗКЦ, и/или как повышение концентрации антитела в среде, окружающей клетки-мишени, необходимое для обеспечения лизиса заданного числа клеток-мишеней за заданное время посредством механизма АЗКЦ. Снижение АЗКЦ определяется относительно АЗКЦ, опосредованной таким же антителом, вырабатываемым таким же типом клеток-хозяев, с использованием таких же стандартных способов получения, очистки, составления и хранения (которые хорошо известны специалистам в данной области техники), но которое не было сконструировано. Например, уменьшение АЗКЦ, опосредованное антителом, содержащим в Fc-домене аминокислотную замену, которая уменьшает АЗКЦ, определяется относительно АЗКЦ, опосредованной таким же антителом без аминокислотной замены в Fc-домене. Подходящие анализы для измерения АЗКЦ хорошо известны в данной области техники (смотрите, например, публикацию PCT № WO 2006/082515 или публикацию PCT № WO 2012/130831).

«Активирующий Fc-рецептор» представляет собой Fc-рецептор, который после взаимодействия с Fc-доменом антитела вызывает события передачи сигналов, которые стимулируют несущую рецептор клетку осуществлять эффекторные функции. Человеческие активирующие Fc-рецепторы включают FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) и FcαRI (CD89).

Как используется в настоящем документе, считается, что термины «конструировать, сконструированный, конструирование» включают любую манипуляцию с пептидным остовом или посттрансляционные модификации встречающегося в природе или рекомбинантного полипептида или его фрагмента. Конструирование включает модификации аминокислотной последовательности, профиля гликозилирования или групп боковых цепей отдельных аминокислот, а также комбинации этих подходов.

«Сниженное связывание», например, сниженное связывание с Fc-рецептором или CD25, относится к снижению аффинности для соответствующего взаимодействия по определению, например, с помощью ППР. Для ясности этот термин также включает снижение аффинности до нуля (или ниже предела обнаружения аналитического метода), т. е. полное устранение

взаимодействия. И наоборот, «повышенное связывание» относится к повышению аффинности связывания для соответствующего взаимодействия.

В контексте данного документа термин «иммуноконъюгат» относится к молекуле полипептида, которая включает по меньшей мере одну молекулу ИЛ-7 и по меньшей мере одно антитело. Молекула ИЛ-7 может присоединяться к антителу с помощью различных взаимодействий и в различных конфигурациях, как описано в данном документе. В конкретных вариантах осуществления молекула ИЛ-7 слита с антителом через пептидный линкер. Конкретные иммуноконъюгаты по изобретению главным образом состоят из одной молекулы ИЛ-7 и антитела, соединенных одной или несколькими линкерными последовательностями.

Под «слитым» подразумевается, что компоненты (например, антитело и молекула ИЛ-7) связаны пептидными связями, как напрямую, так и посредством одного или более пептидных линкеров.

В контексте данного документа термины «первый» и «второй» в отношении субъединиц Fc-домена и т. д. используют для того, чтобы облегчить различение в случае наличия более чем одного из каждого типа фрагментов. Использование этих терминов не подразумевает конкретного порядка или ориентации иммуноконъюгата, если явным образом не указано иное.

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

«Терапевтически эффективное количество» агента, например, фармацевтической композиции, относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения необходимого терапевтического или профилактического результата. Терапевтически эффективное количество агента, например, устраняет, снижает, задерживает, сводит к минимуму или предупреждает нежелательные явления заболевания.

«Индивидуум» или «субъект» представляет собой млекопитающее. Млекопитающие включают без ограничения одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и отличных от человека приматов, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В частности, индивидуум или субъект представляет собой человека.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в форме, обеспечивающей эффективность биологической активности содержащегося в нем активного ингредиента, и который не содержит дополнительные компоненты, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет введена композиция.

«Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от активного ингредиента, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает без ограничения буфер, вспомогательное вещество, стабилизатор или консервант.

Как используется в настоящем документе, термин «лечение» (и его грамматические варианты, такие как «лечить» или «осуществление лечения») относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения заболевания у индивидуума, которого лечат, и может проводиться как для профилактики, так и при течении клинической патологии. Необходимые эффекты лечения включают, но не ограничиваются этим, предотвращение появления или повторного появления заболевания, смягчение симптомов, уменьшение каких-либо прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, уменьшение скорости прогрессирования заболевания, уменьшение интенсивности или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгаты по изобретению используют для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания.

Подробное описание вариантов осуществления

Мутантный полипептид ИЛ-7

Варианты ИЛ-7, согласно настоящему изобретению, обладают благоприятными свойствами для иммунотерапии.

Мутантный полипептид интерлейкина-7 (ИЛ-7) по данному изобретению содержит по меньшей мере одну аминокислотную мутацию, которая снижает аффинность мутантного полипептида ИЛ-7 к α-субъединице рецептора ИЛ-7 и/или субъединице ИЛ-2Rγ.

Мутанты ИЛ-7 человека (чИЛ-7) со сниженной аффинностью к ИЛ-7Rα и/или ИЛ-2Rγ могут быть получены, например, аминокислотной заменой в

положениях 81 или 85 или их комбинациях (нумерация относительно последовательности ИЛ-7 человека SEQ ID NO: 28). Иллюстративные аминокислотные замены включают K81E и G85E. В одном варианте осуществления мутантный полипептид интерлейкина-7 (ИЛ-7) согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную замену в положении G85 ИЛ-7 человека согласно SEQ ID NO: 28. В одном варианте осуществления мутантный полипептид интерлейкина-7 (IL-7) содержит аминокислотную замену G85E согласно SEQ ID NO: 28. В дополнительном варианте осуществления мутантный полипептид интерлейкина-7 (ИЛ-7) содержит аминокислотные замены в положениях K81 и G85 ИЛ-7 человека согласно SEQ ID NO: 28. В одном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид интерлейкина-7 (ИЛ-7) содержит аминокислотные замены K81E и G85E согласно SEQ ID NO: 28.

Мутантный полипептид интерлейкина-7 (ИЛ-7) по настоящему изобретению может содержать по меньшей мере одну аминокислотную мутацию, которая улучшает гомогенность полипептида, предпочтительно в одном из положений аминокислот 93 и 118 или их комбинациях. Иллюстративные аминокислотные замены включают T93A и S118A. В одном варианте осуществления мутантный полипептид интерлейкина-7 (ИЛ-7) дополнительно содержит аминокислотные замены T93A и S118A. В одном варианте осуществления мутантный полипептид интерлейкина-7 (ИЛ-7) содержит аминокислотные замены G85E, T93A и S118A. В одном варианте осуществления мутантный полипептид интерлейкина-7 (ИЛ-7) содержит аминокислотные замены K81E, G85E, T93A и S118A.

В некоторых вариантах осуществления по настоящему изобретению мутантный полипептид интерлейкина-7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления по настоящему изобретению мутантный полипептид интерлейкина-7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30. В некоторых вариантах осуществления по настоящему изобретению мутантный полипептид интерлейкина-7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31. В некоторых вариантах осуществления по настоящему изобретению мутантный полипептид интерлейкина-7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. Конкретные мутанты ИЛ-7 по настоящему изобретению содержат

аминокислотную мутацию, выбранную из группы K81E, G85E, T93A и S118A ИЛ-7 человека, в соответствии с SEQ ID NO: 28. Конкретный мутантный ИЛ-7 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. Конкретный мутантный ИЛ-7 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ IN NO: 30. Конкретный мутантный ИЛ-7 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. Конкретный мутантный ИЛ-7 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. Такие мутанты проявляют значительно сниженную аффинность к рецептору интерлейкина 7 по сравнению с формой мутантного ИЛ-7 дикого типа.

Другие характеристики мутантов ИЛ-7, раскрытых в данном документе, включают сниженную аффинность к ИЛ-7Rα, что делает возможной опосредованную PD-1 доставку ИЛ-7 в цис положение (на той же клетке) на CD4 Т-клетках, экспрессирующих PD-1, по сравнению с ИЛ-7 дикого типа, который в основном доставляется в транс положение (в непосредственной близости к клетке), когда он находится в иммуноконъюгате PD1-ИЛ-7.

В определенных вариантах осуществления указанная аминокислотная мутация снижает аффинность мутантного полипептида ИЛ-7 к ИЛ-Rα и/или ИЛ-2Rγ по меньшей мере в 5 раз, в частности по меньшей мере в 10 раз, более конкретно по меньшей мере в 25 раз.

Снижение аффинности ИЛ-7 к ИЛ-7Rα и/или ИЛ-2Rγ в сочетании с устранением N-гликозилирования ИЛ-7 приводит к получению белка ИЛ-7 с улучшенными свойствами. Например, удаление сайта N-гликозилирования приводит к получению более гомогенного продукта, при экспрессии мутантного полипептида ИЛ-7 в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO или HEK. Элиминация сайтов N-гликозилирования ИЛ-7 может быть достигнута путем аминокислотных мутаций в положении, соответствующем остатку 72, 93 или 118 ИЛ-7 человека.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 содержит дополнительную аминокислотную мутацию, которая элиминирует сайт N-гликозилирования ИЛ-7 в положении, соответствующему остатку 93 или 118 ИЛ-7 человека. В одном варианте осуществления указанная дополнительная аминокислотная мутация, которая элиминирует сайт N-гликозилирования ИЛ-7 в положении, соответствующему остатку 93 или 118

ИЛ-7 человека, представляет собой аминокислотную замену. В конкретном варианте осуществления указанная дополнительная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену T93A. В другом конкретном варианте осуществления указанная дополнительная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену S118A. В другом конкретном варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 содержит аминокислотные замены T93A и S118A. В определенных вариантах осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 главным образом представляет собой полноразмерную молекулу ИЛ-7. В определенных вариантах осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 представляет собой молекулу ИЛ-7 человека. В одном варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 содержит последовательность SEQ ID NO: 28 с по меньшей мере одной аминокислотной мутацией, которая снижает аффинность мутантного полипептида ИЛ-7 к ИЛ-7Rα по сравнению с полипептидом ИЛ-7, содержащим SEQ ID NO: 28 без указанной мутации. В одном варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 содержит последовательность SEQ ID NO: 28 с по меньшей мере одной аминокислотной мутацией, которая снижает аффинность мутантного полипептида ИЛ-7 к ИЛ-7Rα или ИЛ-2Rγ по сравнению с полипептидом ИЛ-7, содержащим SEQ ID NO: 28 без указанной мутации. В одном варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 содержит последовательность SEQ ID NO: 28 с по меньшей мере одной аминокислотной мутацией, которая снижает аффинность мутантного полипептида ИЛ-7 к ИЛ-7Rα и ИЛ-2Rγ по сравнению с полипептидом ИЛ-7, содержащим SEQ ID NO: 28 без указанной мутации. В одном варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 содержит последовательность SEQ ID NO: 28 с по меньшей мере одной аминокислотной мутацией, которая снижает аффинность мутантного полипептида ИЛ-7 к ИЛ-7Rα и/или ИЛ-2Rγ по сравнению с полипептидом ИЛ-7, содержащим SEQ ID NO: 28 без указанной мутации.

В конкретном варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 все еще может вызывать один или несколько клеточных ответов, выбранных из группы, состоящей из: пролиферации в клетках Т-лимфоцитов, эффекторных функций в примированных клетках Т-лимфоцитов, активности цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ), пролиферации в активированной В-клетке, дифференцировки в активированной В-клетке, пролиферации в естественной клетке-киллере (NK),

дифференцировки в NK-клетке, секреции цитокинов активированной Т-клеткой или NK-клеткой и противоопухолевой цитотоксичности NK/лимфоцит-активированного киллера (ЛАК).

В одном варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 содержит не более 12, не более 11, не более 10, не более 9, не более 8, не более 7, не более 6 или не более 5 аминокислотных мутаций по сравнению с соответствующей последовательностью ИЛ-2 дикого типа, например, ИЛ-7 человека с последовательностью SEQ ID NO: 28. В конкретном варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 содержит не более 5 аминокислотных мутаций по сравнению с соответствующей последовательностью ИЛ-7 дикого типа, например, ИЛ-7 человека с последовательностью SEQ ID NO: 28.

Иммуноконъюгаты

Иммуноконъюгаты, описанные в данном документе, содержат молекулу ИЛ и антитело. Такие иммуноконъюгаты значительно повышают эффективность терапии ИЛ-7 за счет непосредственного воздействия на ИЛ-7, например, на микроокружение опухоли. В соответствии с изобретением антитело, содержащееся в иммуноконъюгате, может представлять собой целое антитело или иммуноглобулин, или его часть или вариант, который обладает биологической функцией, такой как антигенспецифическая аффинность связывания.

Общие преимущества иммуноконъюгатной терапии очевидны. Например, антитело, содержащееся в иммуноконъюгате, распознает опухолеспецифический эпитоп и приводит к нацеливанию молекулы иммуноконъюгата на участок опухоли. Таким образом, высокие концентрации ИЛ-7 могут быть доставлены в микроокружение опухоли, что приводит к активации и пролиферации различных иммунных эффекторных клеток, упомянутых в данном документе, с использованием гораздо более низкой дозы иммуноконъюгата, чем требуется для неконъюгированного ИЛ-7. Однако такая характеристика иммуноконъюгатов ИЛ-7 может снова усугубить возможные побочные эффекты молекулы ИЛ-7. Из-за значительно более длительного периода полужизни иммуноконъюгата ИЛ-7 в кровотоке по сравнению с неконъюгированным ИЛ-7 увеличивается вероятность того, что ИЛ-7 или другие части молекулы слитого белка активируют компоненты, обычно присутствующие в сосудистой сети. То же самое относится и к другим слитым белкам, которые содержат ИЛ-7, слитый

с другим фрагментом, таким как Fc или альбумин, что приводит к увеличению периода полужизни ИЛ-7 в кровотоке. Таким образом, иммуноконъюгаты, содержащие описанный в данном документе мутантный полипептид ИЛ-7 с пониженной токсичностью по сравнению с формами ИЛ-7 дикого типа, являются особенно предпочтительными.

Как описано выше, нацеливание ИЛ-7 непосредственно на иммунные эффекторные клетки, а не на опухолевые клетки, может быть предпочтительным для иммунотерапии посредством ИЛ-7.

Соответственно, в изобретении предложен мутантный полипептид ИЛ-7, описанный в данном документе выше, и антитело, которое связывается с PD-1. В одном варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 и антитело образуют слитый белок, т. е. мутантный полипептид ИЛ-7 имеет общую пептидную связь с антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц. В конкретном варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 слит на его аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой одной из субъединиц Fc-домена, необязательно с помощью линкерного пептида. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой молекулу иммуноглобулина, в частности, молекулу иммуноглобулина класса IgG, более конкретно, молекулу иммуноглобулина подкласса IgG_1. В одном таком варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 имеет общую аминоконцевую пептидную связь с одной из тяжелых цепей иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления антитело представляет собой фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой молекулу Fab или молекулу scFv. В одном варианте осуществления антитело представляет собой молекулу Fab. В другом варианте осуществления антитело представляет собой молекулу scFv. Иммуноконъюгат также может содержать более одного антитела. Если иммуноконъюгат содержит более одного антитела, например, первое и второе антитело, причем каждое антитело может быть независимо выбрано из различных форм антител и фрагментов антител. Например, первое антитело может быть молекулой Fab, а второе антитело может быть молекулой scFv. В конкретном варианте осуществления каждое указанное первое и указанное

второе антитела представляют собой молекулу scFv или каждое указанное первое и указанное второе антитела представляют собой молекулу Fab. В конкретном варианте осуществления каждое указанное первое и указанное второе антитела представляют собой молекулу Fab. В одном варианте осуществления каждое указанное первое и указанное второе антитела связываются с PD-1.

Форматы иммуноконъюгатов

Иллюстративные форматы иммуноконъюгатов описаны в публикации PCT № WO 2011/020783 A1, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Такие иммуноконъюгаты содержат по меньшей мере два антитела. Таким образом, в одном варианте осуществления иммуноконъюгат в соответствии с настоящим изобретением содержит мутантный полипептид ИЛ-7, описанный в настоящем документе, и по меньшей мере первое и второе антитело. В конкретном варианте осуществления указанное первое и второе антитело независимо выбраны из группы, состоящей из молекулы Fv, в частности, молекулы scFv, и молекулы Fab. В конкретном варианте осуществления указанный мутантный полипептид ИЛ-7 имеет общую амино- или карбоксиконцевую пептидную связь с указанным первым антителом, а указанное второе антитело имеет общую амино- или карбоксиконцевую пептидную связь либо с i) мутантным полипептидом ИЛ-7, либо с ii) первым антителом. В конкретном варианте осуществления иммуноконъюгат состоит главным образом из мутантного полипептида ИЛ-7 и первого и второго антител, в частности молекул Fab, соединенных одной или несколькими линкерными последовательностями. Такие форматы имеют то преимущество, что они связываются с высокой аффинностью с целевым антигеном (PD-1), но обеспечивают только мономерное связывание с рецептором ИЛ-7, что позволяет избежать нацеливания иммуноконъюгата на иммунные клетки, несущие рецептор ИЛ-7, в других местах, чем целевой сайт. В конкретном варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 имеет общую карбоксиконцевую пептидную связь с первым антителом, в частности, с первой молекулой Fab, и дополнительно имеет общую аминоконцевую пептидную связь со вторым антителом, в частности, со второй молекулой Fab. В другом варианте осуществления первое антитело, в частности первая молекулу Fab, имеет общую карбоксиконцевую пептидную связь мутантный полипептид ИЛ-7, и

дополнительно имеет общую аминоконцевую пептидную связь со вторым антителом, в частности со второй молекулой Fab. В другом варианте осуществления первое антитело, в частности первая молекула Fab, имеет общую аминоконцевую пептидную связь с первым мутантным полипептидом ИЛ-7 и дополнительно имеет общую карбоксиконцевую пептидную связь со вторым антителом, в частности со второй молекулой Fab. В конкретном варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 имеет общую карбоксиконцевую пептидную связь с первой вариабельной областью тяжелой цепи и дополнительно имеет общую аминоконцевую пептидную связь со второй вариабельной областью тяжелой цепи. В другом варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 имеет общую карбоксиконцевую пептидную связь с первой вариабельной областью легкой цепи и дополнительно имеет общую аминоконцевую пептидную связь со второй вариабельной областью легкой цепи. В другом варианте осуществления первая вариабельная область тяжелой или легкой цепи соединена карбоксиконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом ИЛ-7, а затем соединена аминоконцевой пептидной связью со второй вариабельной областью тяжелой или легкой цепи. В другом варианте осуществления первая вариабельная область тяжелой или легкой цепи соединена аминоконцевой пептидной связью с мутантным полипептидом ИЛ-7 и дополнительно соединена карбоксиконцевой пептидной связью со второй вариабельной областью тяжелой или легкой цепи. В одном варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 имеет общую карбоксиконцевую пептидную связь с первой тяжелой или легкой цепью Fab и дополнительно имеет общую аминоконцевую пептидную связь со второй тяжелой или легкой цепью Fab. В другом варианте осуществления первая тяжелая или легкая цепь Fab имеет общую карбоксиконцевую пептидную связь с мутантным полипептидом ИЛ-7 и дополнительно имеет общую аминоконцевую пептидную связь со второй тяжелой или легкой цепью Fab. В других вариантах осуществления первая тяжелая или легкая цепь Fab имеет общую аминоконцевую пептидную связь с мутантным полипептидом ИЛ-7 и дополнительно имеет общую карбоксиконцевую пептидную связь со второй тяжелой или легкой цепью Fab. В одном варианте осуществления иммуноконъюгат содержит мутантный полипептид ИЛ-7, имеющий общую аминоконцевую пептидную связь с одной

или несколькими молекулами scFv и дополнительно имеющий общую карбоксиконцевую пептидную связь с одной или несколькими молекулами scFv.

Особенно подходящие форматы для иммуноконъюгатов в соответствии с настоящим изобретением, однако, содержат молекулу иммуноглобулина в качестве антитела. Такие форматы иммуноконъюгатов описаны в WO 2012/146628, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Соответственно, в конкретных вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит мутантный полипептид ИЛ-7, описанный в данном документе, и молекулу иммуноглобулина, которая связывается с PD-1, в частности молекулу IgG, более конкретно молекулу IgG_1. В одном варианте осуществления иммуноконъюгат содержит не более, чем один мутантный полипептид ИЛ-7. В одном варианте осуществления молекула иммуноглобулина является человеческой. В одном варианте осуществления молекула иммуноглобулина содержит константную область человека, например домен CH1, CH2, CH3 и/или CL человека. В одном варианте осуществления иммуноглобулин содержит Fc-домен человека, в частности Fc-домен IgG_1 человека. В одном варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 имеет общую амино- или карбоксиконцевую пептидную связь с молекулой иммуноглобулина. В одном варианте осуществления иммуноконъюгат главным образом состоит из мутантного полипептида ИЛ-7 и молекулы иммуноглобулина, в частности молекулы IgG, более конкретно молекулы IgG_1, соединенных одной или более линкерными последовательностями. В конкретном варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 слит на его аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, необязательно с помощью линкерного пептида.

Мутантный полипептид ИЛ-7 может быть слит с антителом напрямую или посредством линкерного пептида, содержащего одну или более аминокислот, как правило, приблизительно 2-20 аминокислот. Линкерные пептиды известны в данной области техники и описаны в данном документе. Подходящие неиммуногенные линкерные пептиды включают, например, линкерные пептиды $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ или $G_4(SG_4)_n$. «n» в общем случае является целым числом от 1 до 10, как правило, от 2 до 4. В одном варианте осуществления линкерный пептид имеет длину по меньшей мере 5 аминокислот, в одном варианте

осуществления — длину от 5 до 100, в дополнительном варианте осуществления — от 10 до 50 аминокислот. В конкретном варианте осуществления линкерный пептид имеет длину 15 аминокислот. В одном варианте осуществления линкерный пептид представляет собой $(GxS)_n$ или $(GxS)_nG_m$, где G = глицин, S = серин, а (x = 3, n = 3, 4, 5 или 6 и m = 0, 1, 2 или 3) или (x = 4, n = 2, 3, 4 или 5 и m = 0, 1, 2 или 3), в одном варианте осуществления x = 4 и n = 2 или 3, в дополнительном варианте осуществления x = 4 и n = 3, в дополнительном варианте осуществления x=4, n=2 и m=4. В конкретном варианте осуществления линкерный пептид представляет собой $(G_4S)_2G_4$ (SEQ ID NO: 19). В одном варианте осуществления линкерный пептид содержит (или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. Альтернативный линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

В конкретном варианте осуществления иммуноконъюгат содержит мутантную молекулу ИЛ-7 и молекулу иммуноглобулина, в частности, молекулу иммуноглобулина подкласса IgG_1, которая связывается с PD-1, при этом мутантная молекула ИЛ-7 слита на ее аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина через линкерный пептид SEQ ID NO: 19.

В конкретном варианте осуществления иммуноконъюгат содержит мутантную молекулу ИЛ-7 и антитело, которое связывается с PD-1, при этом антитело содержит Fc-домен, в частности, Fc-домен IgG_1 человека, состоящий из первой и второй субъединиц, а мутантная молекула ИЛ-7 слита на ее аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой одной из субъединиц Fc-домена через линкерный пептид SEQ ID NO: 19.

PD-1 антитела

Антитело, содержащееся в иммуноконъюгате по изобретению, связывается с PD-1, в частности с PD-1 человека, и способно направлять мутантный полипептид ИЛ-7 в сайт-мишень, где экспрессируется PD-1, в частности, в Т-клетку, которая экспрессирует PD-1, например, ассоциированный с опухолью.

Подходящие антитела к PD-1, которые можно использовать в иммуноконъюгате по изобретению, описаны в WO 2017/055443 A1, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Иммуноконъюгат по изобретению может содержать два или более антител, которые могут связываться с одним и тем же или с разными антигенами. Однако в конкретных вариантах осуществления каждое из этих антител связывается с PD-1. В одном варианте осуществления антитело, содержащееся в иммуноконъюгате по изобретению, является моноспецифическим. В конкретном варианте осуществления иммуноконъюгат содержит одно моноспецифическое антитело, в частности молекулу моноспецифического иммуноглобулина.

Антитело может быть антителом любого типа или его фрагментом, сохраняющим специфическое связывание с PD-1, в частности с PD-1 человека. Фрагменты антител включают, без ограничения, молекулы Fv, молекулу scFv, молекулу Fab и молекулы $F(ab')_2$. Однако в конкретных вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой иммуноглобулин, в частности класса IgG, более конкретно иммуноглобулин подкласса IgG_1.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, FR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, в положениях 71-73 в соответствии с нумерацией по Кабату, и HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, и FR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, в положениях 71-73 в соответствии с нумерацией по Кабату, и (б) вариабельную область легкой цепи

(VL), содержащую HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой и/или легкой цепи представляет собой гуманизированную вариабельную область. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой и/или легкой цепи содержат человеческие каркасные области (FR).

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8; HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9; HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10; HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11; HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой и/или легкой цепи представляет собой гуманизированную вариабельную область. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой и/или легкой цепи содержат человеческие каркасные области (FR).

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%

идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO:18. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO:18.

Согласно конкретному варианту осуществления антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело. В одном варианте осуществления антитело представляет собой молекулу иммуноглобулина, содержащую человеческую константную область, в частности молекулу иммуноглобулина класса IgG, содержащую человеческий домен CH1, CH2, CH3 и/или CL. Иллюстративные последовательности человеческих константных доменов приведены в SEQ ID NO:24 и 25 (человеческие каппа и лямбда CL-домены, соответственно) и SEQ ID NO: 26 (константные домены CH1-CH2-CH3 тяжелой цепи IgG1 человека). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25, в частности аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26. В частности, константная область тяжелой цепи может содержать аминокислотные мутации в Fc-домене, как описано в данном документе.

Fc-домен

В конкретных вариантах осуществления антитело, содержащееся в иммуноконъюгатах в соответствии с изобретением, содержит Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц. Fc-домен антитела состоит из пары полипептидных цепей, содержащих домены тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина. Например, Fc-домен молекулы иммуноглобулина G (IgG) представляет собой димер, каждая субъединица которого содержит константные домены CH2 и CH3 тяжелой цепи IgG. Две субъединицы Fc-домена способны к стабильной ассоциации друг с другом. В одном варианте осуществления иммуноконъюгат по изобретению содержит не более одного Fc-домена.

В одном варианте осуществления Fc-домен антитела, содержащегося в иммуноконъюгате, представляет собой Fc-домен IgG. В конкретном варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG_1. В другом варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG_4. В более специфическом варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG_4, содержащий аминокислотную замену в положении S228 (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату), в частности аминокислотную замену S228P. Данная аминокислотная замена уменьшает *in vivo* обмен плеч Fab антител IgG_4 (см. Stubenrauch et al., Drug Metabolism и Disposition 38, 84-91 (2010)). В дополнительном конкретном варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен человека. В более конкретном варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG_1 человека. Типовая последовательность Fc-области IgG_1 человека приведена в SEQ ID NO: 23.

Модификации Fc-домена, способствующие гетеродимеризации

Иммуноконъюгаты в соответствии с изобретением содержат мутантный полипептид ИЛ-7, в частности один (не более одного) мутантный полипептид ИЛ-7, слитый с одной или другой из двух субъединиц Fc-домена, таким образом, две субъединицы Fc-домена обычно состоят из двух неидентичных полипептидных цепей. Рекомбинантная коэкспрессия этих полипептидов и последующая димеризация приводит к нескольким возможным комбинациям двух полипептидов. Следовательно, для улучшения выхода и чистоты иммуноконъюгата при рекомбинантном получении будет целесообразно внести в Fc-домен антитела модификацию, способствующую ассоциации необходимых полипептидов.

Соответственно, в конкретных вариантах осуществления Fc-домен антитела, содержащегося в иммуноконъюгате, в соответствии с изобретением содержит модификацию, способствующую ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена. Сайтом наиболее активного белок-белкового взаимодействия между двумя субъединицами Fc-домена IgG человека является CH3-домен Fc-домена. Таким образом, в одном варианте осуществления указанная модификация находится в домене CH3 Fc-домена.

Существует несколько подходов для модификации в домене CH3 Fc-домена с целью стимуляции гетеродимеризации, которые хорошо описаны, например, в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012058768, WO 2013157954, WO 2013096291. Как правило, во всех таких подходах домен CH3 первой субъединицы Fc-домена и домен CH3 второй субъединицы Fc-домена сконструированы комплементарным образом так, чтобы каждый домен CH3 (или содержащая его тяжелая цепь) больше не мог образовывать гомодимер сам с собой, но был бы вынужден образовывать гетеродимер с комплементарно сконструированным другим доменом CH3 (так, чтобы происходила гетеродимеризация первого и второго доменов CH3 и не происходило образование гомодимеров между двумя первыми или двумя вторыми доменами CH3).

В конкретном варианте осуществления указанные модификации, способствующие ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена, представляют собой так называемую модификацию типа «выступ во впадину», включающую модификацию «выступа» в одной из двух субъединиц Fc-домена и модификацию «впадины» в другой из двух субъединиц Fc-домена.

Технология «выступ во впадину» описана, например, в US 5731168; US 7695936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) и Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Как правило, этот способ включает внесение выпуклости («выступа») в контактную поверхность первого полипептида и соответствующей полости («впадины») в контактную поверхность второго полипептида, так чтобы выпуклость могла располагаться в полости так, чтобы стимулировать образование гетеродимера и затруднять образование гомодимера. Выпуклости конструируют путем замены небольших аминокислотных боковых цепей в контактной поверхности первого полипептида на более крупные боковые цепи

(например, тирозин или триптофан). Компенсаторные полости идентичного или сходного размера с выпуклостями создают в контактной поверхности второго полипептида путем замещения крупных аминокислотных боковых цепей меньшими (например, аланином или треонином).

Соответственно, в конкретном варианте осуществления в CH3-домене первой субъединицы Fc-домена антитела, содержащегося в иммуноконъюгате, аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим больший объем боковой цепи, с созданием, таким образом, выпуклости в CH3-домене первой субъединицы, которая может располагаться в полости в CH3-домене второй субъединицы, а в CH3-домене второй субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим меньший объем боковой цепи, с созданием, таким образом, полости в CH3-домене второй субъединицы, в которой может располагаться выпуклость из CH3-домена первой субъединицы.

Предпочтительно указанный аминокислотный остаток, имеющий больший объем боковой цепи, выбран из группы, состоящей из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y) и триптофана (W).

Предпочтительно указанный аминокислотный остаток, имеющий меньший объем боковой цепи, выбран из группы, состоящей из аланина (A), серина (S), треонина (T) и валина (V).

Выпуклость и полость можно создавать путем изменения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды, например, с помощью сайт-специфического мутагенеза или с помощью пептидного синтеза.

В конкретном варианте осуществления в CH3-домене первой субъединицы Fc-домена (субъединице «выступов») остаток треонина в положении 366 замещен остатком триптофана (T366W), а в CH3-домене второй субъединицы Fc-домена (субъединице «впадин») остаток тирозина в положении 407 замещен остатком валина (Y407V). В одном варианте осуществления во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток треонина в позиции 366 замещен остатком серина (T366S), а остаток лейцина в позиции 368 замещен остатком аланина (L368A) (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

В дополнительном варианте осуществления в первой субъединице Fc-домена дополнительно остаток серина в позиции 354 замещен остатком цистеина (S354C) или остаток глутаминовой кислоты в позиции 356 замещен остатком

цистеина (E356C) (в частности остаток серина в позиции 354 замещен остатком цистеина), а во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток тирозина в позиции 349 замещен остатком цистеина (Y349C) (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). Внесение двух остатков цистеина приводит к образованию дисульфидного мостика между двумя субъединицами Fc-домена, дополнительно стабилизируя димер (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

В конкретном варианте осуществления первая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены S354C и T366W, а вторая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены Y349C, T366S, L368A и Y407V (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

В некоторых вариантах осуществления вторая субъединица Fc-домена дополнительно содержит аминокислотные замены H435R и Y436F (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

В конкретном варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 слит (необязательно посредством линкерного пептида) с первой субъединицей Fc-домена (содержащей модификацию «выступ»). Не ограничиваясь теорией, слияние мутантного полипептида ИЛ-7 с содержащей выступ субъединицей Fc-домена будет (в дальнейшем) минимизировать образование иммуноконъюгатов, содержащих два мутантных полипептида ИЛ-7 (вследствие стерического несоответствия двух содержащих выступ полипептидов).

Другие методики модификации CH3 для стимуляции гетеродимеризации предусмотрены как альтернативные варианты в соответствии с изобретением и описаны, например, в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291.

В одном варианте осуществления в качестве альтернативы используют подход гетеродимеризации, описанный в EP 1870459. Этот подход основан на внесении заряженных аминокислот с противоположными зарядами в специфических аминокислотных положениях в поверхности контакта доменов CH3/CH3 между двумя субъединицами Fc-домена. Одним предпочтительным вариантом осуществления для антитела, содержащегося в иммуноконъюгате, по изобретению являются аминокислотные мутации R409D; K370E в одном из двух CH3-доменов (Fc-домена) и аминокислотные мутации D399K; E357K в другом из

двух CH3-доменов Fc-домена (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

В другом варианте осуществления антитело, содержащееся в иммуноконъюгате, по изобретению содержит аминокислотную мутацию T366W в CH3-домене первой субъединицы Fc-домена и аминокислотные мутации T366S, L368A, Y407V в CH3-домене второй субъединицы Fc-домена, и дополнительно аминокислотные мутации R409D; K370E в CH3-домене первой субъединицы Fc-домена и аминокислотные мутации D399K; E357K в CH3-домене второй субъединицы Fc-домена (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

В другом варианте осуществления антитело, содержащееся в иммуноконъюгате, по изобретению содержит аминокислотные мутации S354C, T366W в CH3-домене первой субъединицы Fc-домена и аминокислотные мутации Y349C, T366S, L368A, Y407V в CH3-домене второй субъединицы Fc-домена, или указанное антитело содержит аминокислотные мутации Y349C, T366W в CH3-домене первой субъединицы Fc-домена и аминокислотные мутации S354C, T366S, L368A, Y407V в CH3-доменах второй субъединицы Fc-домена и дополнительно аминокислотные мутации R409D; K370E в CH3-домене первой субъединицы Fc-домена и аминокислотные мутации D399K; E357K в CH3-домене второй субъединицы Fc-домена (вся нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

В одном варианте осуществления в качестве альтернативы используют подход гетеродимеризации, описанный в WO 2013/157953. В одном варианте осуществления первый CH3-домен содержит аминокислотную мутацию T366K, а второй CH3-домен содержит аминокислотную мутацию L351D (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В дополнительном варианте осуществления первый CH3-домен содержит дополнительную аминокислотную мутацию L351K. В дополнительном варианте осуществления второй CH3-домен содержит дополнительную аминокислотную мутацию, выбранную из Y349E, Y349D и L368E (предпочтительно L368E) (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

В одном варианте осуществления в качестве альтернативы используют подход гетеродимеризации, описанный в WO 2012/058768. В одном варианте осуществления первый CH3-домен содержит аминокислотные мутации L351Y, Y407A, а второй CH3-домен содержит аминокислотные мутации T366A, K409F.

В дополнительном аспекте второй CH3-домен содержит дополнительную аминокислотную мутацию в положении T411, D399, S400, F405, N390 или K392, например, выбранную из а) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E или T411W, б) D399R, D399W, D399Y или D399K, в) S400E, S400D, S400R или S400K, г) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V или F405W, д) N390R, N390K или N390D, е) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F или K392E (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В дополнительном варианте осуществления первый CH3-домен содержит аминокислотные мутации L351Y, Y407A, а второй CH3-домен содержит аминокислотные мутации T366V, K409F. В дополнительном варианте осуществления первый домен CH3 содержит аминокислотную мутацию Y407A, а второй домен CH3 содержит аминокислотные мутации T366A, K409F. В дополнительном варианте осуществления второй CH3-домен дополнительно содержит аминокислотные мутации K392E, T411E, D399R и S400R (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

В одном варианте осуществления в качестве альтернативы используют подход гетеродимеризации, описанный в WO 2011/143545, например, с аминокислотной модификацией в позиции, выбранной из группы, состоящей из 368 и 409 (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

В одном варианте осуществления в качестве альтернативы используют подход гетеродимеризации, описанный в WO 2011/090762, в котором также используют описанную выше технологию «выступ во впадину». В одном варианте осуществления первый CH3-домен содержит аминокислотную мутацию T366W, а второй CH3-домен содержит аминокислотную мутацию Y407A. В одном варианте осуществления первый CH3-домен содержит аминокислотную мутацию T366Y, а второй CH3-домен содержит аминокислотную мутацию Y407T (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

В одном варианте осуществления антитело, содержащееся в иммуноконъюгате, или его Fc-домен относится к подклассу IgG_2, и в качестве альтернативы используют подход гетеродимеризации, описанный в WO 2010/129304.

В альтернативном варианте осуществления модификация, способствующая ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена, включает модификацию, которая опосредует эффекты электростатического

взаимодействия, например, как описано в публикации PCT WO 2009/089004. В общем случае этот способ включает замену одного или более аминокислотных остатков на поверхности контакта двух субъединиц Fc-домена заряженными аминокислотными остатками так, чтобы образование гомодимера становилось электростатически невыгодным, но гетеродимеризация была бы электростатический выгодной. В одном таком варианте осуществления первый CH3-домен содержит аминокислотную замену K392 или N392 отрицательно заряженной аминокислотой (например, глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D), предпочтительно K392D или N392D), а второй CH3-домен содержит аминокислотную замену D399, E356, D356 или E357 положительно заряженной аминокислотой (например, лизином (K) или аргинином (R), предпочтительно D399K, E356K, D356K или E357K, и более предпочтительно D399K и E356K). В дополнительном варианте осуществления первый CH3-домен дополнительно содержит аминокислотную замену K409 или R409 отрицательно заряженной аминокислотой (например, глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D), предпочтительно K409D или R409D). В дополнительном аспекте первый CH3-домен дополнительно или в качестве альтернативы содержит аминокислотную замену K439 и/или K370 отрицательно заряженной аминокислотой (например, глутаминовой кислотой (E) или аспарагиновой кислотой (D)) (вся нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

В дополнительном варианте осуществления в качестве альтернативы используют подход гетеродимеризации, описанный в WO 2007/147901. В одном варианте осуществления первый CH3-домен содержит аминокислотные мутации K253E, D282K и K322D, а второй CH3-домен содержит аминокислотные мутации D239K, E240K и K292D (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

В другом варианте осуществления в качестве альтернативы можно использовать подход гетеродимеризации, описанный в WO 2007/110205.

В одном варианте осуществления первая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены K392D и K409D, а вторая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены D356K и D399K (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

Модификации Fc-домена, снижающие связывание Fc-рецептора и/или эффекторную функцию

Fc-домен придает иммуноконъюгату благоприятные фармакокинетические свойства, включая продолжительное сывороточное время полужизни, которое способствует хорошему накоплению в целевой ткани и благоприятному соотношению распределения в тканях и крови. Однако в то же время это может привести к нежелательному нацеливанию иммуноконъюгата на клетки, экспрессирующие рецепторы Fc, а не на предпочтительные несущие антиген клетки. Кроме того, совместная активация путей сигнализации рецепторов Fc может приводить к высвобождению цитокинов, что в комбинации с полипептидом IL-7 и продолжительным временем полужизни иммуноконъюгата приводит к чрезмерной активации цитокиновых рецепторов и тяжелым побочным эффектам после системного введения. Соответственно, в конкретных вариантах осуществления Fc-домен антитела, содержащегося в иммуноконъюгате, в соответствии с изобретением демонстрирует уменьшенную аффинность связывания с Fc-рецептором и/или уменьшенную эффекторную функцию по сравнению с нативным Fc-доменом IgG_1. В одном таком варианте осуществления Fc-домен (или антитело, содержащее указанный Fc-домен) демонстрирует менее 50%, предпочтительно менее 20%, предпочтительнее менее 10% и наиболее предпочтительно менее 5% аффинности связывания с Fc-рецептором по сравнению с нативным Fc-доменом IgG_1 (или антителом, содержащим нативный Fc-домен IgG_1) и/или менее 50%, предпочтительно менее 20%, предпочтительнее менее 10% и наиболее предпочтительно менее 5% эффекторной функции по сравнению с нативным Fc-доменом IgG_1 (или антителом, содержащим нативный Fc-домен IgG_1). В одном варианте осуществления Fc-домен (или антитело, содержащее указанный Fc-домен) практически не связывается с Fc-рецептором и/или не индуцирует эффекторную функцию. В конкретном варианте осуществления Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор. В одном варианте осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc-рецептор человека. В одном варианте осуществления Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления Fc-рецептор представляет собой активирующий Fcγ-рецептор человека, более конкретно FcγRIIIa, FcγRI или FcγRIIa человека, наиболее конкретно FcγRIIIa человека. В одном варианте осуществления эффекторная

функция представляет собой одну или более функций, выбранных из группы КЗЦ, АЗКЦ, АЗКФ и секреции цитокинов. В конкретном варианте осуществления эффекторная функция представляет собой АЗКЦ. В одном варианте осуществления Fc-домен демонстрирует практически аналогичную аффинность связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) по сравнению с нативным Fc-доменом IgG_1. Практически аналогичное связывание с FcRn достигается, когда Fc-домен (или антитело, содержащее указанный Fc-домен) демонстрирует более чем приблизительно 70%, в частности более чем приблизительно 80%, более конкретно более чем приблизительно 90% аффинности связывания нативного Fc-домена IgG_1 (или антитела, содержащего нативный Fc-домен IgG_1) с FcRn.

В определенных вариантах осуществления Fc-домен конструируют так, чтобы он имел сниженную аффинность связывания с Fc-рецептором и/или сниженную эффекторную функцию по сравнению с несконструированным Fc-доменом. В конкретных вариантах осуществления антитело, содержащееся в иммуноконъюгате, содержит одну или более аминокислотных мутаций, которые уменьшают аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию. Как правило, в каждой из двух субъединиц Fc-домена присутствуют одинаковые одна или более аминокислотных мутаций. В одном варианте осуществления аминокислотная мутация снижает аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором. В одном варианте осуществления аминокислотная мутация снижает аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз или по меньшей мере в 10 раз. В вариантах осуществления, в которых присутствует более одной аминокислотной мутации, которая снижает аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором, комбинация этих аминокислотных мутаций может снижать аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз или даже по меньшей мере в 50 раз. В одном варианте осуществления антитело, содержащее сконструированный Fc-домен, демонстрирует менее 20%, в частности менее 10%, более конкретно менее 5% аффинности связывания с Fc-рецептором по сравнению с антителом, содержащим не сконструированный Fc-домен. В конкретном варианте осуществления Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc-рецептор человека.

В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления Fc-рецептор представляет собой активирующий Fcγ-рецептор человека, более конкретно FcγRIIIa, FcγRI или FcγRIIa человека, наиболее конкретно FcγRIIIa человека. Предпочтительно связывание с каждым из этих рецепторов снижено. В некоторых вариантах осуществления также снижена аффинность связывания с компонентом комплемента, в частности, аффинность связывания с C1q. В одном варианте осуществления аффинность связывания с неонатальным рецептором Fc (FcRn) не снижена. Практически аналогичное связывание с FcRn, т. е. сохранение аффинности связывания Fc-домена с указанным рецептором, достигается, когда Fc-домен (или антитело, содержащее указанный Fc-домен) демонстрирует более чем приблизительно 70% аффинности связывания не сконструированной формы Fc-домена (или антитела, содержащего указанную не сконструированную форму Fc-домена) с FcRn. Fc-домен или антитело, содержащееся в иммуноконъюгате, по изобретению, содержащие указанный Fc-домен, могут демонстрировать более чем приблизительно 80% и даже более чем приблизительно 90% такой аффинности. В определенных вариантах осуществления Fc-домен антитела, содержащегося в иммуноконъюгате, сконструирован так, чтобы иметь уменьшенную эффекторную функцию по сравнению с не сконструированным Fc-доменом. Сниженная эффекторная функция может включать, но не ограничивается этим, одно или более из следующего: сниженной комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), сниженной антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ), сниженного антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ), сниженной секреции цитокинов, сниженного опосредованного иммунным комплексом поглощения антигена антигенпрезентирующими клетками, сниженного связывания с NK-клетками, сниженного связывания с макрофагами, сниженного связывания с моноцитами, сниженного связывания с полиморфноядерными клетками, сниженной прямой сигнализации, индуцирующей апоптоз, сниженного перекрестного связывания связанных с мишенью антител, сниженного созревания дендритных клеток или сниженного примирования Т-клеток. В одном варианте осуществления сниженная эффекторная функция представляет собой одну или более функций, выбранных из группы уменьшенной КЗЦ, уменьшенной АЗКЦ, уменьшенного АЗКФ и

уменьшенной секреции цитокинов. В конкретном варианте осуществления сниженная эффекторная функция представляет собой уменьшенную АЗКЦ. В одном варианте осуществления сниженная АЗКЦ составляет менее 20% АЗКЦ, индуцируемой не сконструированным Fc-доменом (или антителом, содержащим не сконструированный Fc-домен).

В одном варианте осуществления аминокислотная мутация, которая снижает аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, представляет собой аминокислотную замену. В одном варианте осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену в позиции, выбранной из группы из E233, L234, L235, N297, P331 и P329 (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В более конкретном варианте осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену в позиции, выбранной из группы из L234, L235 и P329 (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит аминокислотные мутации L234A и L235A (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В одном таком варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG_1, в частности Fc-домен IgG_1 человека. В одном варианте осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену в позиции P329. В более конкретном варианте осуществления аминокислотная замена представляет собой P329A или P329G, в частности, P329G (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В одном варианте осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену в позиции P329 и дополнительную аминокислотную замену в позиции, выбранной из E233, L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В более конкретном варианте осуществления дополнительная аминокислотная замена представляет собой E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D или P331S. В конкретных вариантах осуществления Fc-домен содержит аминокислотные замены в позициях P329, L234 и L235 (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В более конкретных вариантах осуществления Fc-домен содержит аминокислотные мутации L234A, L235A и P329G («P329G LALA», «PGLALA» или «LALAPG»). В частности, в конкретных вариантах осуществления каждая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату), т. е. в каждой из первой и второй субъединиц Fc-домена остаток лейцина в позиции 234 замещен

остатком аланина (L234A), остаток лейцина в позиции 235 замещен остатком аланина (L235A) и остаток пролина в позиции 329 замещен остатком глицина (P329G) (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В одном таком варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG_1, в частности Fc-домен IgG_1 человека. Комбинация аминокислотных замен «P329G LALA» практически полностью устраняет связывание Fcγ-рецептора (а также комплемента) Fc-домена IgG_1 человека, как описано в публикации PCT № WO 2012/130831, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. В WO 2012/130831 также описаны способы получения таких мутантных Fc-доменов и способы определения их свойств, таких как связывание Fc-рецептора или эффекторные функции.

Антитела IgG_4 демонстрируют сниженную аффинность связывания с Fc-рецепторами и сниженные эффекторные функции по сравнению с антителами IgG_1. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления Fc-домен антитела, содержащегося в иммуноконъюгате по изобретению, представляет собой Fc-домен IgG_4, в частности Fc-домен IgG_4 человека. В одном варианте осуществления Fc-домен IgG_4 содержит аминокислотную замену в позиции S228, в частности аминокислотную замену S228P (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). Для дополнительного снижения аффинности связывания с Fc-рецептором и/или эффекторной функции в одном варианте осуществления Fc-домен IgG_4 содержит аминокислотную замену в позиции L235, в частности аминокислотную замену L235E (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В другом варианте осуществления Fc-домен IgG_4 содержит аминокислотную замену в позиции P329, в частности аминокислотную замену P329G (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В конкретном варианте осуществления Fc-домен IgG_4 содержит аминокислотные замены в позициях S228, L235 и P329, в частности аминокислотные замены S228P, L235E и P329G (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). Такие мутантные Fc-домены IgG_4 и их свойства связывания с Fcγ-рецептором описаны в публикации PCT № WO 2012/130831, в полном объеме включенной в данный документ посредством ссылки.

В конкретном варианте осуществления Fc-домен, демонстрирующий уменьшенную аффинность связывания с Fc-рецептором и/или уменьшенную эффекторную функцию по сравнению с нативным Fc-доменом IgG_1,

представляет собой Fc-домен IgG_1 человека, содержащий аминокислотные замены L234A, L235A и, необязательно, P329G, или Fc-домен IgG_4 человека, содержащий аминокислотные замены S228P, L235E и, необязательно, P329G (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

В определенных вариантах осуществления было устранено N-гликозилирование Fc-домена. В одном таком варианте осуществления Fc-домен содержит аминокислотную мутацию в положении N297, в частности аминокислотную замену с замещением аспарагина аланином (N297A) или аспарагиновой кислотой (N297D) (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

Помимо Fc-доменов, описанных выше в данном документе и в публикации PCT № WO 2012/130831, Fc-домены со сниженными связыванием Fc-рецепторов и/или эффекторной функцией также включают домены с заменой одного или более остатков Fc-домена 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (патент США № 6737056) (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). Такие Fc-мутанты включают Fc-мутантов с заменами в двух или более аминокислотных положениях 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый Fc-мутант «DANA» с заменой остатков 265 и 297 аланином (патент США № 7332581).

Мутантные Fc-домены можно получать с помощью делеции, замены, вставки или модификации аминокислот, используя генетические или химические методы, хорошо известные в данной области техники. Генетические методы могут включать сайт-специфический мутагенез кодирующей последовательности ДНК, ПЦР, генный синтез и т. п. Правильные нуклеотидные изменения можно верифицировать, например, с помощью секвенирования.

Связывание с Fc-рецепторами можно легко определить, например, с помощью ИФА или поверхностного плазмонного резонанса (ППР), используя стандартное оборудование, такое как прибор BIAcore (GE Healthcare), и такие Fc-рецепторы можно получить с помощью рекомбинантной экспрессии. В качестве альтернативы аффинность связывания Fc-доменов или антител, содержащих Fc-домен, в отношении Fc-рецепторов, можно оценивать, используя линии клеток, которые, как известно, экспрессируют конкретные Fc-рецепторы, такие как NK-клетки, экспрессирующие FcγIIIa-рецептор.

Эффекторную функцию Fc-домена или антитела, содержащего Fc-домен, можно определить известными в данной области техники способами. Примеры

анализов *in vitro* для оценки активности АЗКЦ представляющей интерес молекулы описаны в патенте США №5500362; Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) и Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); патенте США № 5821337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). В альтернативном варианте можно использовать нерадиоактивные способы анализа (смотрите, например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности для проточной цитометрии ACTI™ (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Эффекторные клетки, подходящие для такого анализа, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные клетки-киллеры (NK). В альтернативном или дополнительном варианте активность АЗКЦ представляющей интерес молекулы можно оценивать *in vivo*, например, в животной модели, такой как описана в Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

В некоторых вариантах осуществления снижено связывание Fc-домена с компонентом комплемента, в частности с C1q. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, в которых Fc-домен сконструирован так, чтобы иметь сниженную эффекторную функцию, указанная сниженная эффекторная функция включает сниженную КЗЦ. Анализы связывания C1q можно проводить, чтобы определить, способен ли Fc-домен или антитело, содержащее Fc-домен, связывать C1q, и, следовательно, обладает ли он активностью КЗЦ. Смотрите, например, ELISA связывания C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента можно проводить анализ КЗЦ (смотрите, например, Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003); и Cragg and Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

Определение связывания с FcRn и *in vivo* клиренса/времени полужизни также может быть осуществлено с применением способов, известных в данной области техники (см., например, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006); WO 2013/120929).

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид ИЛ-7 и антитело, которое связывается с PD-1, причем мутантный полипептид ИЛ-7 представляет собой молекулу ИЛ-7 человека, содержащую аминокислотные замены G85E (нумерация относительно последовательности ИЛ-7 человека SEQ ID NO: 28); и причем антитело

содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид ИЛ-7 и антитело, которое связывается с PD-1, причем мутантный полипептид ИЛ-7 представляет собой молекулу ИЛ-7 человека, содержащую аминокислотные замены K81E и G85E (нумерация относительно последовательности ИЛ-7 человека SEQ ID NO: 28); и причем антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид ИЛ-7 и антитело, которое связывается с PD-1, причем мутантный полипептид ИЛ-7 представляет собой молекулу ИЛ-7 человека, содержащую аминокислотные замены G85E, T93A и S118A (нумерация относительно последовательности ИЛ-7 человека SEQ ID NO: 28); и причем антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид ИЛ-7 и антитело, которое связывается с PD-1, причем мутантный полипептид ИЛ-7 представляет собой молекулу ИЛ-7 человека, содержащую аминокислотные замены K81E, G85E, T93A и S118A (нумерация относительно последовательности ИЛ-7 человека SEQ ID NO: 28); и причем антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид ИЛ-7 и антитело, которое связывается с PD-1, при этом мутантный полипептид ИЛ-7 содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 29, и причем антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид ИЛ-7 и антитело, которое связывается с PD-1, при этом мутантный полипептид ИЛ-7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и причем антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид ИЛ-7 и антитело, которое связывается с PD-1, при этом мутантный полипептид ИЛ-7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и причем антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид ИЛ-7 и антитело, которое связывается с PD-1, при этом мутантный полипептид ИЛ-7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, и причем антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15.

В одном варианте осуществления в соответствии с любым из вышеуказанных аспектов изобретения антитело представляет собой иммуноглобулин класса IgG, содержащий Fc-домен IgG_1 человека, состоящий из первой и второй субъединиц,

при этом в первой субъединице Fc-домена остаток треонина в положении 366 замещен остатком триптофана (T366W), а во второй субъединице Fc-домена остаток тирозина в положении 407 замещен остатком валина (Y407V) и, необязательно, остаток треонина в положении 366 замещен остатком серина (T366S), а остаток лейцина в положении 368 замещен остатком аланина (L368A)

(нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату), и при этом каждая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). В этом варианте осуществления мутантный полипептид ИЛ-7 может быть слит на его аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой первой субъединицы Fc-домена с помощью линкерного пептида SEQ ID NO: 19.

В одном аспекте в изобретении предложен иммуноконъюгат, содержащий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO:33, полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO:34, и полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO:37.

В одном аспекте в изобретении предложен иммуноконъюгат, содержащий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO:33, полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO:34, и полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO:38.

В одном аспекте в изобретении предложен иммуноконъюгат, содержащий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO:33, полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO:34, и полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на

приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO:39.

В одном аспекте в изобретении предложен иммуноконъюгат, содержащий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO:33, полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO:34, и полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO:40.

Полинуклеотиды

В изобретении дополнительно предложены выделенные полинуклеотиды, кодирующие описанный в данном документе иммуноконъюгат или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления указанный фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент.

Полинуклеотиды, кодирующие иммуноконъюгаты по настоящему изобретению, можно экспрессировать в виде одного полинуклеотида, который кодирует весь иммуноконъюгат, или в виде нескольких (например, двух или более) коэкспрессируемых полинуклеотидов. Полипептиды, кодируемые коэкспрессируемыми полинуклеотидами, могут объединяться посредством, например, дисульфидных связей или других способов с образованием функционального иммуноконъюгата. Например, часть легкой цепи антитела может кодироваться отдельным полинуклеотидом от части иммуноконъюгата, содержащей часть тяжелой цепи антитела и мутантный полипептид ИЛ-7. При коэкспрессии полипептиды тяжелой цепи будут объединяться с полипептидами легкой цепи с образованием иммуноконъюгата. В другом примере часть иммуноконъюгата, содержащая одну из двух субъединиц Fc-домена и мутантный полипептид ИЛ-7, может кодироваться отдельным полинуклеотидом от части иммуноконъюгата, содержащей другую из двух субъединиц Fc-домена. При коэкспрессии субъединицы Fc-домена будут объединяться с образованием Fc-домена.

В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует весь иммуноконъюгат в соответствии с изобретением, как описано в данном документе. В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, содержащийся в иммуноконъюгате в соответствии с изобретением, как описано в данном документе.

В одном варианте осуществления выделенный полинуклеотид по изобретению кодирует тяжелую цепь антитела, содержащегося в иммуноконъюгате (например, тяжелую цепь иммуноглобулина), и мутантный полипептид ИЛ-7. В другом варианте осуществления выделенный полинуклеотид по изобретению кодирует легкую цепь антитела, содержащегося в иммуноконъюгате.

В определенных вариантах осуществления полинуклеотид или нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В других вариантах осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению представляет собой РНК, например, в форме матричной РНК (мРНК). РНК по настоящему изобретению может быть одноцепочечной или двухцепочечной.

Рекомбинантные методы

Мутантные полипептиды ИЛ-7, применимые в изобретении, можно получать с помощью делеции, замены, вставки или модификации, используя генетические или химические способы, хорошо известные в данной области техники. Генетические методы могут включать сайт-специфический мутагенез кодирующей последовательности ДНК, ПЦР, генный синтез и т. п. Правильные нуклеотидные изменения можно верифицировать, например, с помощью секвенирования. Последовательность нативного ИЛ-7 человека показана в SEQ ID NO: 28. Замена или вставка могут включать как природные, так и неприродные аминокислотные остатки. Модификация аминокислот включает хорошо известные способы химической модификации, такие как добавление сайтов гликозилирования или присоединения углеводов и т.п.

Иммуноконъюгаты по изобретению можно получать, например, путем твердофазного пептидного синтеза (например, твердофазного синтеза Меррифильда) или рекомбинантного получения. Для рекомбинантного получения один или более полинуклеотидов, кодирующих иммуноконъюгат (фрагмент), например, описанных выше, выделяют и вставляют в один или более

векторов для последующего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такой полинуклеотид можно легко выделять и секвенировать, используя традиционные процедуры. В одном варианте осуществления предложен вектор, предпочтительно вектор экспрессии, содержащий один или более полинуклеотидов по настоящему изобретению. Способы, хорошо известные специалистам в данной области техники, можно использовать для конструирования векторов экспрессии, содержащих кодирующую последовательность иммуноконъюгата (фрагмента) наряду с соответствующими транскрипционными/трансляционными регуляторными сигналами. Эти методы включают *in vitro* технологии рекомбинантных ДНК, технологии синтеза и *in vivo* рекомбинации/генетической рекомбинации. Смотрите, например, методики, описанные в Maniatis *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); и Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989). Вектор экспрессии может быть частью плазмиды, вируса или может быть фрагментом нуклеиновой кислоты. Экспрессионные векторы включают экспрессионную кассету, в которую клонируют полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат (фрагмент) (т. е. кодирующую область) в функциональной связи с промотором и/или другими транскрипционными или трансляционными регуляторными элементами. Используемая в данном документе «кодирующая область» представляет собой участок нуклеиновой кислоты, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя «стоп-кодон» (TAG, TGA или TAA) не транслируется в аминокислоту, он может считаться частью кодирующей области, в случае наличия, но любые фланкирующие последовательности, например промоторы, сайты связывания рибосомы, терминаторы транскрипции, интроны, 5' и 3' нетранслируемые области и т. п., не являются частью кодирующей области. Две или более кодирующих областей могут присутствовать в одной полинуклеотидной конструкции, например, в одном векторе, или в отдельных полинуклеотидных конструкциях, например, в отдельных (разных) векторах. Кроме того, любой вектор может содержать одну кодирующую область или может содержать две или более кодирующих областей, например, вектор по настоящему изобретению может кодировать один или более полипептидов, которые разделяются после или во время трансляции на конечные белки посредством протеолитического расщепления. Кроме того, вектор,

полинуклеотид или нуклеиновая кислота по изобретению могут кодировать гетерологичные кодирующие области, слитые или не слитые с полинуклеотидом, кодирующим иммуноконъюгат по изобретению или его вариант или производное. Гетерологичные кодирующие области включают без ограничения специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен. Функциональная ассоциация имеет место, когда кодирующая область генетического продукта, например, полипептида, связана с одной или более регуляторными последовательностями так, чтобы экспрессия генного продукта находилась под влиянием или управлением регуляторной(регуляторных) последовательности(последовательностей). Два фрагмента ДНК (такие как кодирующая полипептид область и связанный с ней промотор) являются «функционально связанными», если индукция промотора приводит к транскрипции мРНК, кодирующей необходимый генный продукт, и если природа связи между двумя фрагментами ДНК не препятствует способности экспрессионных регуляторных последовательностей управлять экспрессией генного продукта или не препятствует способности транскрибировать ДНК-матрицу. Таким образом, промоторная область является функционально связанной с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если промотор способен влиять на транскрипцию этой нуклеиновой кислоты. Промотор может быть клеточно-специфическим промотором, который обуславливает достаточную транскрипцию ДНК только в определенных клетках. Помимо промотора, другие транскрипционные регуляторные элементы, например, энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, могут быть функционально связаны с полинуклеотидом с целью управления клеточно-специфической транскрипцией. Подходящие промоторы и другие транскрипционные регуляторные области описаны в данном документе. Специалистам в данной области техники известны различные транскрипционные регуляторные области. Они включают без ограничения транскрипционные регуляторные области, которые являются функциональными в клетках позвоночных, таких как без ограничения промоторные и энхансерные сегменты из цитомегаловирусов (например, немедленно ранний промотор в сочетании с интроном-А), вируса обезьян 40 (например, ранний промотор) и ретровирусов (таких как, например, вирус саркомы Рауса). Другие транскрипционные

регуляторные области включают полученные из генов позвоночных, таких как гены актина, белка теплового шока, бычьего гормона роста и кроличьего β-глобина, а также другие последовательности, способные регулировать экспрессию генов в эукариотических клетках. Дополнительные подходящие транскрипционные регуляторные области включают тканеспецифические промоторы и энхансеры, а также индуцибельные промоторы (например, промоторы, индуцируемые тетрациклинами). Аналогично, специалистам в данной области техники известны различные трансляционные регуляторные элементы. Они включают без ограничения сайты связывания рибосомы, кодоны инициации и терминации трансляции и элементы, полученные из вирусных систем (в частности, внутренний сайт посадки рибосомы или IRES, также называемый последовательностью CITE). Кассета экспрессии также может включать другие элементы, такие как точка начала репликации и/или элементы интеграции в хромосому, такие как ретровирусные длинные концевые повторы (LTR) или инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV).

Кодирующие области полинуклеотида и нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут быть связаны с дополнительными кодирующими областями, которые кодируют секреторные или сигнальные пептиды, которые управляют секрецией полипептида, кодируемого полинуклеотидом по настоящему изобретению. В соответствии с сигнальной гипотезой, белки, секретируемые клетками млекопитающих, имеют сигнальный пептид или секреторную лидерную последовательность, которые отщепляются от зрелого белка после инициации экспорта растущей белковой цепи через шероховатый эндоплазматический ретикулум. Специалистам в данной области техники известно, что полипептиды, секретируемые клетками позвоночных в общем случае, имеют сигнальный пептид, слитый с N-концом полипептида, который отщепляется от транслируемого полипептида с образованием секретируемой или «зрелой» формы полипептида. В качестве альтернативы можно использовать гетерологичный сигнальный пептид млекопитающих или его функциональное производное. Например, лидерная последовательность дикого типа может быть замещена лидерной последовательностью человеческого тканевого активатора плазминогена (TPA) или мышиной β-глюкуронидазой.

ДНК, кодирующая короткую белковую последовательность, которую можно использовать для облегчения последующей очистки (например, гистидиновый тег) или мечения иммуноконъюгата, может быть включена внутри или в концах иммуноконъюгата (фрагмента), кодирующего полинуклеотид.

В дополнительном варианте осуществления предложена клетка-хозяин, содержащая один или более полинуклеотидов по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления предложена клетка-хозяин, содержащая один или более векторов по настоящему изобретению. Полинуклеотиды и векторы могут включать любые элементы, по отдельности или в комбинации, описанные в данном документе в связи с полинуклеотидами и векторами соответственно. В одном таком варианте осуществления клетка-хозяин содержит (например, была трансформирована или трансфицирована) один или более векторов, содержащих один или более полинуклеотидов, которые кодируют иммуноконъюгат по изобретению. В контексте данного документа термин «клетка-хозяин» относится к любому типу клеточной системы, которую можно сконструировать для генерации иммуноконъюгата по изобретению или его фрагментов. Клетки-хозяева, подходящие для репликации и для поддержания экспрессии иммуноконъюгатов, хорошо известны в данной области техники. Такие клетки, при необходимости, могут быть трансфицированы или трансдуцированы конкретным экспрессионным вектором, а большие количества содержащих вектор клеток можно выращивать для засевания крупномасштабных ферментеров для получения достаточных количеств иммуноконъюгата для клинических применений. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические микроорганизмы, такие как E. coli, или различные эукариотические клетки, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки насекомых и т.п. Например, полипептиды могут вырабатываться в бактериях, в частности, если отсутствует необходимость гликозилирования. После экспрессии полипептид можно выделять из бактериальной клеточной пасты в растворимую фракцию и дополнительно очищать. Помимо прокариот, эукариотические микробы, такие как нитевидные грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии кодирующих полипептид векторов, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были «гуманизированы», что приводит к получению полипептида с частично или полностью человеческим профилем

гликозилирования. См. Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004), и Li et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006). Подходящие клетки-хозяева для экспрессии (гликозилированных) полипептидов также получают из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые можно использовать в сочетании с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. Культуры клеток растений также можно использовать в качестве хозяев. Смотрите, например, патенты США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (в которых описана технология PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях). Клетки позвоночных также можно использовать в качестве хозяев. Например, можно использовать линии клеток млекопитающих, которые адаптированы для роста в суспензии. Другими примерами применимых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7), линия клеток почки эмбриона человека (клетки 293 или 293T, описанные, например, в Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977)), клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки Сертоли мышей (клетки TM4, описанные, например, в Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), клетки почки обезьяны (CV1), клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76), клетки карциномы шейки матки человека (HELA), клетки почки собаки (MDCK), клетки печени серой крысы (BRL 3A), клетки легких человека (W138), клетки печени человека (Hep G2), клетки опухоли молочной железы мышей (MMT 060562), клетки TRI (описанные, например, в Mather et al., Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), клетки MRC 5 и клетки FS4. Другие применимые линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), включая $dhfr^-$ клетки CHO (Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); и линии клеток миеломы, такие как YO, NS0, P3X63 и Sp2/0. Обзор некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продукции белков, см., например, в Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003). Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых, клетки бактерий и клетки растений, если называть лишь некоторые, но также клетки, находящиеся в организме трансгенного животного,

трансгенного растения или в культивируемой растительной или животной ткани. В одном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, предпочтительно клетку млекопитающего, такую как клетка яичника китайского хомяка (CHO), клетка почки эмбриона человека (HEK) или лимфоидная клетка (например, клетка Y0, NS0, Sp20).

Стандартные технологии для экспрессии чужеродных генов в этих системах известны в данной области техники. Клетки, экспрессирующие мутантный полипептид ИЛ-7, слитый с тяжелой или легкой цепью антитела, можно конструировать так, чтобы они также экспрессировали другую цепь антитела, чтобы экспрессируемый слитый продукт мутантного ИЛ-7 представлял собой антитело, которое имеет как тяжелую, так и легкую цепь.

В одном варианте осуществления предложен способ получения иммуноконъюгата в соответствии с изобретением, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, кодирующий предложенный в данном документе иммуноконъюгат, в условиях, подходящих для экспрессии иммуноконъюгата, и, необязательно, выделение иммуноконъюгата из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

В иммуноконъюгате по изобретению мутантный полипептид ИЛ-7 может быть генетически слит с антителом или может быть химически конъюгирован с антителом. Генетическое слияние полипептида ИЛ-7 с антителом может быть сконструировано таким образом, что последовательность ИЛ-7 слита непосредственно с полипептидом или опосредованно через линкерную последовательность. Композицию и длину линкера можно определять в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники, и можно тестировать в отношении эффективности. Конкретные линкерные пептиды описаны в данном документе. Также при необходимости могут быть включены дополнительные последовательности для включения сайта расщепления для разделения отдельных компонентов слияния, например последовательность распознавания эндопептидазой. Кроме того, слитый белок ИЛ-7 также может быть синтезирован химически с использованием способов полипептидного синтеза, хорошо известных в данной области (например, твердофазный синтез Меррифилда). Мутантные полипептиды ИЛ-7 могут быть химически конъюгированы с другими молекулами, например антителами, используя хорошо известные способы химической конъюгации. С этой целью

можно использовать бифункциональные сшивающие реагенты, такие как гомофункциональные и гетерофункциональные сшивающие реагенты, хорошо известные в данной области техники. Тип используемого сшивающего реагента зависит от природы молекулы, которая должна быть объединена с ИЛ-7, и может быть легко идентифицирован специалистами в данной области техники. В качестве альтернативы или в дополнение, мутантный ИЛ-7 и/или молекула, с которой он предназначен для конъюгации, могут быть химически дериватизированы, так что их можно конъюгировать в отдельной реакции, как это также хорошо известно в данной области техники.

Иммуноконъюгаты по изобретению содержат антитело. Способы получения антител хорошо известны в данной области техники (смотрите, например, Harlow and Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Не встречающиеся в природе антитела можно конструировать, используя твердофазный пептидный синтез, можно получать рекомбинантно (например, как описано в патенте США №4186567) или можно получать, например, посредством скрининга комбинаторных библиотек, содержащих вариабельные тяжелые цепи и вариабельные легкие цепи (см., например, патент США № 5969108 авторства McCafferty). Иммуноконъюгаты, антитела и способы их получения также подробно описаны, например, в публикациях PCT №№ WO 2011/020783, WO 2012/107417 и WO 2012/146628, полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В иммуноконъюгатах по изобретению можно использовать антитела любых видов животных. Неограничивающие примеры антител, применимых в настоящем изобретении, могут быть получены от мышей, приматов или человека. Если слитый иммуноконъюгат предназначен для применения человеком, можно использовать химерную форму антитела, в которой константные области антитела получены от человека. Гуманизированные или полностью человеческие формы антител также можно получать в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники (смотрите, например, патент США № 5565332 авторства Winter). Гуманизацию можно обеспечивать различными способами, включая без ограничения (a) привитие отличных от человеческих (например, донорного антитела) CDR в человеческие (например, реципиентного антитела) каркасные и константные области с сохранением или без сохранения критически важных каркасных остатков (например, тех, которые важны для

сохранения высокой антигенсвязывающей аффинности или функций антитела), (б) привитие только отличных от человеческих определяющих специфичность областей (SDR или a-CDR; остатки, критически важные для взаимодействия антиген – антитело) в человеческие каркасные и константные области, или (в) трансплантацию всех отличных от человеческих вариабельных доменов, но с «маскировкой» их человекоподобным участком путем замещения поверхностных остатков. Гуманизированные антитела и способы их изготовления рассмотрены, например, в Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), и дополнительно описаны, например, в Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); патентах США №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (описание прививания определяющей специфичность области (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (описание «изменения поверхности»); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (описание «перетасовки FR»); и Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005), и Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (описание подхода «направленного отбора» к перетасовке FR). Каркасные области человека, которые можно использовать для гуманизации, включают, помимо прочего: каркасные области, выбранные с использованием способа «наилучшего соответствия» (см., например, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); каркасные области, происходящие из консенсусной последовательности человеческих антител конкретной подгруппы вариабельных областей легкой или тяжелой цепи (см., например, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); и Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); человеческие зрелые (содержащие соматические мутации) каркасные области или человеческие эмбриональные каркасные области (см., например, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); и каркасные области, полученные при скрининге библиотек FR (см., например, Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997), и Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

Человеческие антитела можно получать, используя различные методики, известные в данной области техники. Человеческие антитела в целом описаны в van Dijk and van de Winkel, Curr Opin Pharmacol 5, 368-74 (2001) и Lonberg, Curr Opin Immunol 20, 450-459 (2008). Человеческие антитела можно получать путем введения иммуногена трансгенному животному, модифицированному для выработки интактных человеческих антител или интактных антител с

человеческими вариабельными областями в ответ на антигенную стимуляцию. Такие животные, как правило, содержат все или часть локусов иммуноглобулина человека, которые замещают эндогенные локусы иммуноглобулина или которые находятся вне хромосом или случайным образом интегрированы в хромосомы животного. Как правило, у таких трансгенных мышей инактивированы эндогенные локусы иммуноглобулина. Обзор способов получения антител человека из трансгенных животных см. в Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Также смотрите, например, патенты США №№ 6075181 и 6150584, в которых описана технология XENOMOUSE™; патент США № 5770429, в котором описана технология HuMAb®; патент № 7041870, в котором описана технология K-M MOUSE®, и публикацию заявки на патент США № US 2007/0061900, в которой описана технология VelociMouse®. Человеческие вариабельные области из интактных антител, образованных такими животными, можно дополнительно модифицировать, например, путем объединения с другой человеческой консервативной областью.

Человеческие антитела можно получать с помощью способов на основе гибридом. Описаны линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши и человека для получения человеческих моноклональных антител. (См., например, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); и Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Человеческие антитела, полученные с использованием технологии человеческой В-клеточной гибридомы, описаны в Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Дополнительные способы включают способы, описанные, например, в патенте США № 7189826 (где описано получение моноклональных человеческих антител на основе IgM из линий клеток гибридомы) и Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (где описаны гибридомы типа человек-человек). Способ получения человеческой гибридомы (способ триомы) также описан в Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005), и Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Человеческие антитела также можно создавать путем выделения из библиотек человеческих антител, как описано в данном документе.

Антитела, применимые в изобретении, можно выделять путем скрининга комбинаторных библиотек антител с необходимой активностью или видами активности. Способы скрининга комбинаторных библиотек рассмотрены, например, в Lerner et al., *Nature Reviews* 16:498-508 (2016). Например, в данной области техники известен ряд способов получения библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек в отношении антител, обладающих необходимыми характеристиками связывания. Такие способы рассмотрены, например, в Frenzel et al. *mAbs* 8:1177-1194 (2016); Bazan et al. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 8:1817-1828 (2012) и Zhao et al. *Critical Reviews in Biotechnology* 36:276-289 (2016), а также в Hoogenboom et al. *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) и в Marks and Bradbury *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003).

В некоторых способах на основе фагового дисплея репертуары генов VH и VL по отдельности клонируют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и случайным образом рекомбинируют в фаговых библиотеках, которые затем можно подвергать скринингу в отношении антигенсвязывающего фага, как описано в Winter et al. *Annual Review of Immunology* 12: 433-455 (1994). Как правило, фаг представляет фрагменты антител в виде одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv) или Fab-фрагментов. Библиотеки из иммунизированных источников позволяют получать антитела с высокой аффинностью к иммуногену без необходимости конструирования гибридом. В качестве альтернативы можно клонировать наивный репертуар (например, от человека) для получения единого источника антител к широкому спектру чужеродных антигенов и аутоантигенов без какой-либо иммунизации, как описано в Griffiths et al., *EMBO Journal* 12: 725-734 (1993). И наконец, наивные библиотеки также можно получать синтетически, клонируя неперестроенные V-генные сегменты из стволовых клеток и используя ПЦР-праймеры, содержащие случайную последовательность, для кодирования высоковариабельных областей CDR3 и осуществления перестройки *in vitro*, как описано в Hoogenboom and Winter *Journal of Molecular Biology* 227: 381-388 (1992). Патентные публикации, в которых описаны фаговые библиотеки человеческих антител, включают, например: патенты США №№ 5750373; 7985840; 7785903 и 8679490, а также публикации патентов США №№2005/0079574, 2007/0117126, 2007/0237764 и 2007/0292936. Дополнительные

примеры способов, известных в данной области для скрининга комбинаторных библиотек для антител с необходимой активностью или активностями, включают рибосомный и мРНК дисплей, а также способы для дисплея и выбора антител на бактериях, клетках млекопитающих, клетках насекомых или клетках дрожжей. Способы дрожжевого поверхностного дисплея рассмотрены, например, в Scholler et al. *Methods in Molecular Biology* 503:135-56 (2012) и в Cherf et al. *Methods in Molecular biology* 1319:155-175 (2015), а также в Zhao et al. *Methods in Molecular Biology* 889:73-84 (2012). Способы рибосомного дисплея описаны, например, в He et al. *Nucleic Acids Research* 25:5132-5134 (1997) и в Hanes et al. *PNAS* 94:4937-4942 (1997).

Может быть желательной дальнейшая химическая модификация иммуноконъюгата по изобретению. Например, проблемы иммуногенности и короткого периода полувыведения могут быть решены путем конъюгации с полимерами с практически прямой цепью, такими как полиэтиленгликоль (PEG) или полипропиленгликоль (PPG) (см., например, WO 87/00056).

Иммуноконъюгаты, полученные как описано в данном документе, можно очищать известными в данной области техники способами, такими как высокоэффективная жидкостная хроматография, ионообменная хроматография, гель-электрофорез, аффинная хроматография, эксклюзионная хроматография и т. п. Фактические условия, используемые для очистки конкретного белка, будут зависеть частично от факторов, таких как суммарный заряд, гидрофобность, гидрофильность и т.д., и будут очевидны для специалистов в данной области техники. В случае очистки методом аффинной хроматографии можно использовать антитело, лиганд, рецептор или антиген, с которыми связывается иммуноконъюгат. Например, может использоваться антитело, которое специфически связывается с мутантным полипептидом ИЛ-7. Для очистки способом аффинной хроматографии иммуноконъюгата по изобретению можно использовать матрицу с белком A или белком G. Например, последовательные этапы аффинной хроматографии с белком A или G и эксклюзионной хроматографии можно использовать для выделения иммуноконъюгата, главным образом так, как это описано в примерах. Чистоту иммуноконъюгата можно определять любым из ряда хорошо известных аналитических способов, включая гель-электрофорез, жидкостную хроматографию высокого давления и т. п.

Композиции, составы и пути введения

В дополнительном аспекте в изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие иммуноконъюгат, описанный в данном документе, например, для применения в любом из нижеописанных терапевтических способов. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит любой из иммуноконъюгатов, предложенных в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит любой из предложенных в данном документе иммуноконъюгатов и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент, например, описанный ниже.

Дополнительно предложен способ получения иммуноконъюгата по изобретению в форме, подходящей для введения in vivo, включающий (а) получение иммуноконъюгата в соответствии с изобретением и (б) составление иммуноконъюгата с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем, в котором препарат иммуноконъюгата составляют для введения in vivo.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат терапевтически эффективное количество иммуноконъюгата, растворенного или диспергированного в фармацевтически приемлемом носителе. Фразы «фармацевтически или фармакологически приемлемый» относятся к молекулярным объектам и композициям, которые в общем случае являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях, т.е. не вызывают нежелательную, аллергическую или другую неблагоприятную реакцию при введении животному, такому как, например, человек, в зависимости от ситуации. Получение фармацевтической композиции, которая содержит иммуноконъюгат и, необязательно, дополнительный активный ингредиент, будет известно специалисту в данной области техники в свете настоящего изобретения и как проиллюстрировано в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, включенной в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, в случае введения животному (например, человеку) следует понимать, что препараты должны соответствовать стандартам стерильности, апирогенности, общей безопасности и чистоты, согласно требованиям Отдела по биологическим стандартам FDA или соответствующих органов в других странах. Предпочтительными композициями являются лиофилизированные составы или водные растворы. Как используется в

настоящем документе, «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, буферы, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты), изотонические агенты, агенты, замедляющие всасывание, соли, консерванты, антиоксиданты, белки, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственных средств, полимеры, гели, связующие вещества, вспомогательные вещества, разрыхлители, лубриканты, подсластители, ароматизаторы, красители, подобные материалы и их комбинации, как должно быть известно специалисту в данной области техники (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, включенную в настоящий документ посредством ссылки). За исключением случаев, когда какой-либо традиционный носитель несовместим с активным ингредиентом, предусмотрено его применение в терапевтических или фармацевтических композициях.

Иммуноконъюгат по изобретению (и любой дополнительный терапевтический агент) можно вводить любым подходящим способом, включая парентеральное, внутрилегочное и интраназальное, и, если необходимо для местного лечения, внутриочаговое введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Введение дозы можно проводить любым подходящим способом, например, путем введения, таких как внутривенные или подкожные введения, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или постоянным.

Парентеральные композиции включают разработанные для введения путем инъекции, например, подкожной, интрадермальной, внутриочаговой, внутривенной, внутриартериальной, внутримышечной, интратекальной или внутрибрюшинной инъекции. Для инъекции иммуноконъюгаты по изобретению можно составлять в водных растворах, предпочтительно физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Раствор может содержать вспомогательные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. В альтернативном варианте иммуноконъюгаты могут находиться в форме порошка для смешивания с подходящим носителем, например, стерильной апирогенной водой, перед использованием. Стерильные

инъекционные растворы готовят путем внесения иммуноконъюгатов по изобретению в необходимом количестве в подходящий растворитель с различными перечисленными ниже другими ингредиентами, при необходимости. Стерильность можно легко обеспечить, например, посредством фильтрации через стерильные фильтровальные мембраны. В общем случае дисперсии готовят путем внесения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и/или другие ингредиенты. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, суспензий или эмульсий предпочтительными способами приготовления являются технологии вакуумной сушки или сублимационной сушки, которые позволяют получать порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный необходимый ингредиент из предварительно стерильно-профильтрованной жидкой среды. При необходимости жидкую среду следует должным образом забуферить, а жидкому растворителю перед инъекцией сначала придать изотоничность с помощью достаточного количества солевого раствора или глюкозы. Композиция должна быть стабильной в условиях производства и хранения и защищенной от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Следует понимать, что контаминацию эндотоксинами необходимо свести к минимуму и поддерживать на безопасном уровне, например, менее 0,5 нг/мг белка. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол; бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (содержащие менее 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлсодержащие комплексы

(например, комплексы Zn-белок) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG). Водные инъекционные суспензии могут содержать соединения, которые увеличивают вязкость суспензии, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, сорбит, декстран и т.п. Необязательно суспензия может также содержать подходящие стабилизаторы или вещества, которые повышают растворимость соединений, для возможности получения высококонцентрированных растворов. Кроме того, суспензии активных соединений можно готовить в виде подходящих масляных инъекционных суспензий. Подходящие липофильные растворители или носители включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеаты или триглицериды, или липосомы.

Активные ингредиенты также могут быть заключены в микрокапсулах, полученных, например, с помощью методик коацервации или путем межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах для доставки лекарственных средств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и нанокапсулах) или в макроэмульсиях. Такие методики описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990). Можно получать препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие полипептид, причем матрицы находятся в виде формованных изделий, например пленок или микрокапсул. В конкретных вариантах осуществления длительное всасывание инъекционных композиций может быть достигнуто путем использования в композициях агентов, замедляющих всасывание, таких как, например, моностеарат алюминия, желатин или их комбинации.

Помимо описанных ранее композиций, иммуноконъюгаты также можно составлять в виде депо-препаратов. Такие составы пролонгированного действия можно вводить путем имплантации (например, подкожной или внутримышечной) или путем внутримышечной инъекции. Таким образом, например, иммуноконъюгаты можно составлять с подходящими полимерными или гидрофобными материалами (например, в виде эмульсии в приемлемом масле)

или ионообменными смолами, или в виде слаборастворимых производных, например, в виде слаборастворимой соли.

Фармацевтические композиции, содержащие иммуноконъюгаты по изобретению, можно получать посредством традиционных процессов смешивания, растворения, эмульгации, инкапсуляции, заключения или лиофилизации. Фармацевтические композиции можно составлять традиционным образом, используя один или более физиологически приемлемых носителей, разбавителей, вспомогательных веществ или наполнителей, которые облегчают обработку белков в препараты, которые можно использовать в фармацевтических целях. Надлежащий состав зависит от выбранного пути введения.

Иммуноконъюгаты можно составлять в виде композиции в форме свободных кислоты или основания, нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемыми солями являются соли, которые по сути сохраняют биологическую активность свободных кислоты или основания. Они включают соли присоединения кислот, например, образуемые со свободными аминогруппами белковой композиции или образуемые с неорганическими кислотами, такими как, например, хлористоводородная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная или миндальная кислота. Соли, образуемые со свободными карбоксильными группами, также можно получать из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа; или таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин или прокаин. Фармацевтические соли, как правило, более растворимы в водных и других протонных растворителях, чем соответствующие формы свободных оснований.

Терапевтические способы и композиции

Любые из предложенных в данном документе мутантных полипептидов ИЛ-7 и иммуноконъюгатов можно использовать в терапевтических способах. Мутантные полипептиды ИЛ-7 и иммуноконъюгаты по изобретению можно использовать в качестве иммунотерапевтических агентов, например, при лечении раковых заболеваний.

Для применения в терапевтических способах мутантные полипептиды ИЛ-7 и иммуноконъюгаты по изобретению следует составлять, дозировать и вводить

способом, соответствующим надлежащей медицинской практике. Факторы, которые необходимо учитывать в этом контексте, включают конкретное нарушение, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину нарушения, место доставки агента, способ введения, график введения и другие факторы, известные практикующим врачам.

Мутантные полипептиды ИЛ-7 и иммуноконъюгаты по изобретению могут быть особенно полезны при лечении болезненных состояний, при которых полезна стимуляция иммунной системы хозяина, в частности при состояниях, при которых желателен усиленный клеточный иммунный ответ. Они могут включать болезненные состояния, при которых иммунный ответ хозяина является неудовлетворительным или недостаточным. Болезненные состояния, при которых можно вводить мутантные полипептиды ИЛ-7 и иммуноконъюгаты по изобретению, включают, например, опухоль или инфекцию, при которых клеточный иммунный ответ был бы критическим механизмом для специфического иммунитета. Мутантные полипептиды ИЛ-7 и иммуноконъюгаты по изобретению можно вводить сами по себе или в любой подходящей фармацевтической композиции.

В одном аспекте предложены мутантные полипептиды ИЛ-7 и иммуноконъюгаты по изобретению для применения в качестве лекарственного средства. В дополнительных аспектах предложены мутантные полипептиды ИЛ-7 и иммуноконъюгаты по изобретению для применения в лечении заболевания. В определенных вариантах осуществления предложены мутантные полипептиды ИЛ-7 и иммуноконъюгаты по изобретению для применения в способе лечения. В одном варианте осуществления в изобретении предложен иммуноконъюгат, описанный в данном изобретении, для применения в лечении заболевания у нуждающегося в этом индивидуума. В одном варианте осуществления в изобретении предложен мутантный полипептид ИЛ-7, описанный в данном документе, для применения в лечении заболевания у нуждающегося в этом индивидуума. В определенных вариантах осуществления в изобретении предложен мутантный ИЛ-7 и иммуноконъюгат для применения в способе лечения индивидуума, имеющего заболевание, включающем введение индивидууму терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата. В определенных вариантах осуществления подлежащее лечению заболевание

представляет собой пролиферативное нарушение. В конкретном варианте осуществления заболевание представляет собой рак. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, например, противоракового агента, если подлежащее лечению заболевание представляет собой рак. В дополнительных вариантах осуществления в изобретении предложен иммуноконъюгат для применения в стимуляции иммунной системы. В определенных вариантах осуществления в изобретении предложен мутантный ИЛ-7 и/или иммуноконъюгат для применения в способе стимуляции иммунной системы у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества иммуноконъюгата для стимуляции иммунной системы. «Индивидуум» в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека. «Стимуляция иммунной системы» в соответствии с любым из вышеприведенных вариантов осуществления может включать любое одно или более из общего усиления иммунной функции, усиления функции Т-клеток, усиления функции В-клеток, восстановления функции лимфоцитов, повышения экспрессии рецепторов IL-2, повышения реактивности Т-клеток, повышения активности естественных клеток-киллеров или активности лимфокин-активированных клеток-киллеров (LAK) и т.п.

В дополнительном аспекте в изобретении предложено применение мутантного полипептида ИЛ-7 и иммуноконъюгата по изобретению в производстве или получении лекарственного средства. В одном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для лечения заболевания у нуждающегося в этом индивидуума. В одном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения заболевания, включающего введение индивидууму, имеющему заболевание, терапевтически эффективного количества лекарственного средства. В определенных вариантах осуществления подлежащее лечению заболевание представляет собой пролиферативное нарушение. В конкретном варианте осуществления заболевание представляет собой рак. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного

дополнительного терапевтического агента, например, противоракового агента, если подлежащее лечению заболевание представляет собой рак. В дополнительном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для стимуляции иммунной системы. В дополнительном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для применения в способе стимуляции иммунной системы у индивидуума, включающем введение индивидууму эффективного количества лекарственного средства для стимуляции иммунной системы. «Индивидуум» в соответствии с любым из вышеприведенных вариантов осуществления может представлять собой млекопитающее, предпочтительно человека. «Стимуляция иммунной системы» в соответствии с любым из вышеприведенных вариантов осуществления может включать любое одно или более из общего усиления иммунной функции, усиления функции Т-клеток, усиления функции В-клеток, восстановления функции лимфоцитов, повышения экспрессии рецепторов IL-2, повышения реактивности Т-клеток, повышения активности естественных клеток-киллеров или активности лимфокин-активированных клеток-киллеров (LAK) и т.п.

В дополнительном аспекте в изобретении предложен способ лечения заболевания у индивидуума. В одном варианте осуществления способ включает введение индивидууму, имеющему такое заболевание, терапевтически эффективного количества мутантного ИЛ-7 и/или иммуноконъюгата по изобретению. В одном варианте осуществления указанному индивидууму вводят композицию, содержащую мутантный ИЛ-7 и/или иммуноконъюгат по изобретению в фармацевтически приемлемой форме. В определенных вариантах осуществления подлежащее лечению заболевание представляет собой пролиферативное нарушение. В конкретном варианте осуществления заболевание представляет собой рак. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, например, противоракового агента, если подлежащее лечению заболевание представляет собой рак. В дополнительном аспекте в изобретении предложен способ стимуляции иммунной системы индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества мутантного ИЛ-7 и/или иммуноконъюгата для стимуляции иммунной системы. «Индивидуум» в соответствии с любым из вышеприведенных вариантов осуществления может

представлять собой млекопитающее, предпочтительно человека. «Стимуляция иммунной системы» в соответствии с любым из вышеприведенных вариантов осуществления может включать любое одно или более из общего усиления иммунной функции, усиления функции Т-клеток, усиления функции В-клеток, восстановления функции лимфоцитов, повышения экспрессии рецепторов IL-2, повышения реактивности Т-клеток, повышения активности естественных клеток-киллеров или активности лимфокин-активированных клеток-киллеров (LAK) и т.п.

В определенных вариантах осуществления подлежащее лечению заболевание представляет собой пролиферативное нарушение, в частности рак. Неограничивающие примеры различных видов рака включают рак мочевого пузыря, рак головного мозга, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак легких, рак молочной железы, рак яичника, рак матки, рак шейки матки, рак эндометрия, рак пищевода, рак толстой кишки, колоректальный рак, ректальный рак, рак желудка, рак предстательной железы, рак крови, рак кожи, плоскоклеточную карциному, рак кости и рак почек. Другие клеточно-пролиферативные нарушения, которые можно лечить с помощью иммуноконъюгата по настоящему изобретению, включают, без ограничения, новообразования, расположенные в: брюшной полости, кости, молочной железе, пищеварительной системе, печени, поджелудочной железе, брюшине, эндокринных железах (надпочечнике, паращитовидной железе, гипофизе, семенниках, яичниках, вилочковой железе, щитовидной железе), глазе, голове и шее, нервной системе (центральной и периферической), лимфатической системе, органах таза, коже, мягкой ткани, селезенке, области грудной клетки и мочеполовой системе. Также включены предраковые состояния или поражения и раковые метастазы. В определенных вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из рака почки, рака кожи, рака легкого, колоректального рака, рака молочной железы, рака головного мозга, рака головы и шеи, рака предстательной железы и рака мочевого пузыря. Специалисту в данной области техники понятно, что во многих случаях иммуноконъюгаты могут не обеспечивать излечение, но могут только обеспечивать частичный благоприятный эффект. В некоторых вариантах осуществления физиологическое изменение, имеющее некоторый благоприятный эффект, также считается терапевтически благоприятным. Таким образом, в некоторых вариантах

осуществления количество иммуноконъюгата, которое обеспечивает физиологическое изменение, считается «эффективным количеством» или «терапевтически эффективным количеством». Субъект, пациент, или индивидуум, нуждающийся в лечении, как правило, представляет собой млекопитающее, более конкретно человека.

В некоторых вариантах осуществления в клетку вводят эффективное количество иммуноконъюгата по изобретению. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество иммуноконъюгатов по изобретению вводят индивидууму для лечения заболевания.

Для профилактики или лечения заболевания соответствующая доза иммуноконъюгата по изобретению (используемого отдельно или в комбинации с одним или более другими дополнительными терапевтическими агентами) будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, пути введения, массы тела пациента, типа молекулы (например, содержащей Fc-домен или без него), тяжести и течения заболевания, того, вводится ли иммуноконъюгат с профилактической или терапевтической целью, предыдущих или одновременных терапевтических вмешательств, анамнеза пациента и его ответа на иммуноконъюгат, а также решения лечащего врача. Практикующий врач, ответственный за введение, в любом случае определит концентрацию активного(ых) ингредиента(ов) в композиции и соответствующую(ие) дозу(ы) для каждого отдельного субъекта. В данном документе представлены различные схемы введения доз, включая без ограничения однократное или многократное введение в различные временные точки, болюсное введение и импульсную инфузию.

Иммуноконъюгат предпочтительно вводить пациенту за один раз или в течение серии курсов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания, начальная кандидатная дозировка для введения пациенту может составлять от приблизительно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1 мг/кг - 10 мг/кг) иммуноконъюгата, например, за одно или более отдельных введений или в виде непрерывной инфузии. Одна типичная суточная доза может составлять в диапазоне от приблизительно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. В случае повторных введений в течение нескольких дней или более, в зависимости от состояния, лечение в общем случае проводят до достижения необходимой степени подавления симптомов

заболевания. Одна иллюстративная дозировка иммуноконъюгата находится в диапазоне от приблизительно 0,005 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. В других неограничивающих примерах доза также может составлять от приблизительно 1 микрограмм/кг массы тела, приблизительно 5 микрограмм/кг массы тела, приблизительно 10 микрограмм/кг массы тела, приблизительно 50 микрограмм/кг массы тела, приблизительно 100 микрограмм/кг массы тела, приблизительно 200 микрограмм/кг массы тела, приблизительно 350 микрограмм/кг массы тела, приблизительно 500 микрограмм/кг массы тела, приблизительно 1 миллиграмм/кг массы тела, приблизительно 5 миллиграмм/кг массы тела, приблизительно 10 миллиграмм/кг массы тела, приблизительно 50 миллиграмм/кг массы тела, приблизительно 100 миллиграмм/кг массы тела, приблизительно 200 миллиграмм/кг массы тела, приблизительно 350 миллиграмм/кг массы тела, приблизительно 500 миллиграмм/кг массы тела до приблизительно 1000 мг/кг массы тела или более на введение, а также любой получаемый из этих значений диапазон. В неограничивающих примерах получаемого из перечисленных в данном документе значений диапазона можно вводить дозу в диапазоне от приблизительно 5 мг/кг массы тела до приблизительно 100 мг/кг массы тела, от приблизительно 5 микрограмм/кг массы тела до приблизительно 500 миллиграмм/кг массы тела и т. д. с учетом вышеприведенных числовых значений. Таким образом, пациенту можно вводить одну или более доз, составляющих приблизительно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 5,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Такие дозы можно вводить с интервалами, например, раз в неделю или раз в три недели (например, чтобы пациент получал от приблизительно двух до приблизительно двадцати или, например, приблизительно шести доз иммуноконъюгата). Можно вводить начальную более высокую нагрузочную дозу, за которой следует одна или больше меньших доз. При этом можно применять другие схемы введения доз. Эффективность такой терапии легко контролировать с помощью традиционных методик и анализов.

Иммуноконъюгаты по изобретению в общем случае используют в количестве, эффективном для достижения предполагаемой цели. В случае применения для лечения или предотвращения болезненного состояния иммуноконъюгаты по изобретению или их фармацевтические композиции вводят или применяют в терапевтически эффективном количестве. Определение

терапевтически эффективного количества вполне соответствует возможностям специалистов в данной области техники, особенно в свете подробного описания изобретения, приведенного в данном документе.

В случае системного введения терапевтически эффективную дозу можно оценить изначально из *in vitro* анализов, таких как анализ клеточной культуры. После этого можно составить дозу для применения в животных моделях для достижения диапазона циркулирующей концентрации, который включает IC_{50}, определенную в клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для более точного определения доз, применимых для людей.

Начальные дозировки также можно оценить из *in vivo* данных, например, животных моделей, используя методики, которые хорошо известны в данной области техники. Специалист в данной области техники легко может оптимизировать введение для людей на основании данных по животным.

Количество и интервал дозировки можно индивидуально корректировать, чтобы обеспечить плазменные уровни иммуноконъюгатов, достаточные для поддержания терапевтического эффекта. Обычные дозировки для пациентов в случае введения путем инъекции находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 до 50 мг/кг/сутки, как правило, от приблизительно 0,5 до 1 мг/кг/сутки. Терапевтически эффективные уровни в плазме крови можно обеспечить путем введения нескольких доз каждый день. Уровни в плазме крови можно измерять, например, с помощью ВЭЖХ.

В случаях местного введения или избирательного поглощения эффективная локальная концентрация иммуноконъюгатов может не быть связана с концентрацией в плазме крови. Специалист в данной области техники сможет оптимизировать терапевтически эффективные местные дозировки без проведения необязательных экспериментов.

Терапевтически эффективная доза иммуноконъюгатов, описанных в данном изобретении, в общем случае обеспечит терапевтический благоприятный эффект без существенной токсичности. Токсичность и терапевтическую эффективность иммуноконъюгата можно определить посредством стандартных фармацевтических процедур на культуре клеток или экспериментальных животных. Анализы клеточных культур и исследования на животных можно использовать для определения LD_{50} (дозы, летальной для 50% популяции) и ED_{50} (дозы, терапевтически эффективной в 50% популяции). Соотношение доз между

токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс, который можно выразить как соотношение LD_{50}/ED_{50}. Иммуноконъюгаты, которые демонстрируют высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными. В одном варианте осуществления иммуноконъюгат в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует высокий терапевтический индекс. Данные, полученные из анализов клеточных культур и исследований на животных, можно использовать при составлении диапазона дозировок, подходящего для применения человеком. Дозировка предпочтительно находится в пределах диапазона циркулирующих концентраций, которые включают ED_{50} с небольшой или отсутствующей токсичностью. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от ряда факторов, например, применяемой лекарственной формы, используемого пути введения, состояния субъекта и т.п. Точный состав, путь введения и дозировку может выбирать личный лечащий врач с учетом состояния пациента. (См., например, Fingl et al., 1975, в: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p. 1, включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Лечащий врач пациентов, которых лечат иммуноконъюгатами по изобретению, должен знать, как и когда прекращать, прерывать или корректировать введение вследствие токсичности, органной дисфункции и т. п. И наоборот, лечащий врач также должен знать, как скорректировать лечение до более высоких уровней, если клинический ответ был недостаточным (не допуская токсичности). Величина вводимой дозы при лечении представляющего интерес нарушения будет варьироваться в зависимости от тяжести состояния, подлежащего лечению, пути введения и т. п. Тяжесть состояния можно, например, оценить частично с помощью стандартных методов оценки. Кроме того, доза и, возможно, частота введения дозы также будут варьироваться в соответствии с возрастом, массой тела и ответом каждого отдельного пациента.

Максимальная терапевтическая доза иммуноконъюгата, содержащего мутантный полипептид ИЛ-7, как описано в данном документе, может быть увеличена по сравнению с дозой, используемой для иммуноконъюгата, содержащего ИЛ-7 дикого типа.

Другие агенты и варианты лечения

Иммуноконъюгаты в соответствии с изобретением можно вводить в комбинации с одним или более другими агентами в терапии. Например, иммуноконъюгат по изобретению можно вводить совместно с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим агентом. Термин «терапевтический агент» включает любой агент, вводимый для лечения симптома заболевания у индивида, нуждающегося в таком лечении. Такой дополнительный терапевтический агент может содержать любые активные ингредиенты, подходящие для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно те, которые обладают дополняющими видами активности и не оказывают отрицательного влияния друг на друга. В определенных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой иммуномодулирующий агент, цитостатический агент, ингибитор клеточной адгезии, цитотоксический агент, активатор апоптоза клеток или агент, который повышает чувствительность клеток к индукторам апоптоза. В конкретном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой противораковый агент, например разрушитель микротрубочек, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы, интеркалятор ДНК, алкилирующий агент, гормональную терапию, ингибитор киназы, антагонист рецептора, активатор апоптоза опухолевых клеток или антиангиогенный агент.

Такие другие агенты приемлемо присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемой цели. Эффективное количество таких других агентов зависит от используемого количества иммуноконъюгата, типа нарушения или лечения и других факторов, обсуждаемых выше. Иммуноконъюгаты в общем случае используют в таких же дозировках и вводят путями, которые описаны в данном документе, или в дозировках, составляющих от приблизительно 1 до 99% дозировок, описанных в данном документе, или в любой дозировке и любым путем, которые эмпирически/клинически определены как подходящие.

Такие комбинированные виды терапии, отмеченные выше, включают комбинированное введение (когда два или более терапевтических агента включены в одну или в отдельные композиции), а также раздельное введение, в случае чего введение иммуноконъюгата по изобретению может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента

и/или адъюванта. Иммуноконъюгаты по изобретению также можно использовать в комбинации с лучевой терапией.

Готовые изделия

В другом аспекте в изобретении представлено готовое изделие, содержащее материалы, применимые для лечения, предотвращения и/или диагностики вышеописанных нарушений. Готовое изделие содержит контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку, находящиеся на нем или связанные с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты для IV введения раствора и т.д. Контейнеры могут быть выполнены из ряда материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в комбинации с другой композицией эффективна для лечения, предупреждения и/или диагностики патологического состояния, и может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного введения раствора или флакон с пробкой, прокалываемой гиподермической иглой для инъекции). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой иммуноконъюгат по изобретению. На этикетке или на вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения выбранного патологического состояния. Кроме того, готовое изделие может содержать (а) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, причем указанная композиция содержит иммуноконъюгат по изобретению; и (б) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, причем указанная композиция содержит дополнительный цитотоксический или иной терапевтический агент. Готовое изделие в этом варианте осуществления может дополнительно содержать вкладыш в упаковку, на котором указано, что композиции можно применять для лечения конкретного состояния. В качестве альтернативы или в качестве дополнения готовое изделие может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буферный раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он также может содержать другие материалы, необходимые с коммерческой и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Аминокислотные последовательности

	Аминокислотная последовательность	**SEQ ID NO**
минимальная HVR-H1 PD-1	SSYT	1
минимальная HVR-H2 PD-1	SGGGRDIY	2
минимальная HVR-H3 PD-1	GRVYF	3
минимальная HVR-L1 PD-1	TSDNSF	4
минимальная HVR-L2 PD-1	RSSTLES	5
минимальная HVR-L3 PD-1	NYDVPW	6
фрагмент FR-H3 (RDN по Кабату полож. 71-73)	RDN	7
HVR-H1 PD-1	GFSFSSY	8
HVR-H2 PD-1	GGR	9
HVR-H3 PD-1	TGRVYFALD	10
HVR-L1 PD-1	SESVDTSDNSF	11
HVR-L2 PD-1	RSS	12
HVR-L3 PD-1	NYDVPW	13
VH PD-1 (1, 2, 3, 4)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWV RQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWG QGTLVTVSS	14
VL PD-1 (1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIH WYQQKPGQSPKLLIYRSSTLESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	15
VL PD-1 (2)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASESVDTSDNSFIH WYQQRPGQSPRLLIYRSSTLESGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	16

	Аминокислотная последовательность	**SEQ ID NO**
VL PD-1 (3)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDNSFIHW YQQKPGQSPRLLIYRSSTLESGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	17
VL PD-1 (4)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDNSFIHW YQQKPGQSPRLLIYRSSTLESGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	18
Линкер	GGGGS GGGGS GGGG	19
Альтернативный линкер	GGGGS GGGGS GGGGS	20
hPD-1 (без сигнальной последовательности)	PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSN TSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRF RVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKA QIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQ PLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQ TEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGH CSWPL	21
hPD-1 (с сигнальной последовательностью)	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPT FSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSN QTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVV RARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRA EVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVW VLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYG ELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSP ARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL	22
Fc-домен IgG1 человека	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SP	23
Домен CL каппа человека	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	24
Домен CL лямбда человека	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTP EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	25
Константная область тяжелой цепи IgG1 человека (CH1-CH2-CH3)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	26

	Аминокислотная последовательность	**SEQ ID NO**
Внеклеточный домен hPD-1 (ECD)	PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSN TSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRF RVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKA QIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV	27

Аминокислотные последовательности ИЛ-7

	Модификация	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
человеческий ИЛ7 дикого типа	-	DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMK EIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLF RAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEG TTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLE ENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWN KILMGTKEH	28
ИЛ7-VAR21, полностью гликозилированное	G85E	DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMK EIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLF RAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEE TTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLE ENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWN KILMGTKEH	29
ИЛ7-VAR21 частично гликозилированное	G85E, T93A, S118A	DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMK EIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLF RAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEE TTILLNCAGQVKGRKPAALGEAQPTKSLE ENKALKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCW NKILMGTKEH	30
ИЛ7-VAR18/VAR21, полностью гликозилированное	K81E, G85E	DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMK EIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLF RAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLEVSEET TILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEE NKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWN KILMGTKEH	31
ИЛ-7-VAR18/VAR21 частично гликозилированное	K81E, G85E, T93A, S118A	DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMK EIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLF RAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLEVSEET TILLNCAGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEE NKALKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWN KILMGTKEH	32
Цепь A		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESV DTSDNSFIHWYQQKPGQSPKLLIYRSSTLE SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	33
Цепь H		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF	34

	Модификация	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
(VAR21 полностью гликозилированный, VAR21 частично гликозилированный, VAR18/VAR21 частично гликозилированные, эталонная молекула 9-10) C2184230856		SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	
Цепь H (PD1-ИЛ7 дт, PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21 полностью гликозилированные, эталонная молекула 5-8) C01483382		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	35
Цепь K PD1-ИЛ7-дт	-	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD	36

	Модификация	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
		SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGG SGGGGSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQL LDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKE GMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL KVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQP TKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEI KTCWNKILMGTKEH	
Цепь K PD1-ИЛ7-VAR21 полностью гликозилированная	G85E	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGG SGGGGDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQL LDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKE GMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL KVSEETTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQP TKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEI KTCWNKILMGTKEH	37
Цепь K PD1-ИЛ7-VAR21 частично гликозилированная	G85E, T93A, S118A	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGG SGGGGDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQL LDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKE	38

	Модификация	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
		GMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL KVSEETTILLNCAGQVKGRKPAALGEAQP TKSLEENKALKEQKKLNDLCFLKRLLQEI KTCWNKILMGTKEH	
Цепь K PD1-ИЛ7-VAR18/VAR21 полностью гликозилированная	K81E, G85E	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGG SGGGGDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQL LDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKE GMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL EVSEETTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQP TKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEI KTCWNKILMGTKEH	39
Цепь K PD1-ИЛ7-VAR18/VAR21 частично гликозилированная	K81E, G85E, T93A, S118A	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGG SGGGGDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQL LDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKE GMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL EVSEETTILLNCAGQVKGRKPAALGEAQP TKSLEENKALKEQKKLNDLCFLKRLLQEI KTCWNKILMGTKEH	40

	Модификация	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Цепь K эталон. молек. 5	D74E	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGG SGGGGSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQL LDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKE GMFLFRAARKLRQFLKMNSTGEFDLHLL KVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQP TKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEI KTCWNKILMGTKEH	41
Цепь K эталон. молек. 6	SS2 (C2S/C141S, C47S/C92S)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGG SGGGGSDSDIEGKDGKQYESVLMVSIDQL LDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHISDANKE GMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL KVSEGTTILLNSTGQVKGRKPAALGEAQP TKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEI KTSWNKILMGTKEH	42
Цепь K эталон. молек. 7	SS3 (C47S/C92S, C34S/C129	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT	43

	Модификация	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
	S)	LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGG SGGGGSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQL LDSMKEIGSNSLNNEFNFFKRHISDANKE GMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL KVSEGTTILLNSTGQVKGRKPAALGEAQP TKSLEENKSLKEQKKLNDLSFLKRLLQEI KTCWNKILMGTKEH	
Цепь K эталон. молек. 8	W142H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGG SGGGGSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQL LDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKE GMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL KVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQP TKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEI KTCHNKILMGTKEH	44
Цепь K эталон. молек. 9	D74N	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP	45

	Модификация	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
		CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGS GGGGDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLL DSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEG MFLFRAARKLRQFLKMNSTGNFDLHLLK VSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPT KSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIK TCWNKILMGTKEH	
Цепь K эталон. молек. 10	D74N, K81E	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGS GGGGDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLL DSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEG MFLFRAARKLRQFLKMNSTGNFDLHLLE VSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPT KSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIK TCWNKILMGTKEH	46
Цепь K PD1-ИЛ7-VAR18/VAR21 полностью гликозилированная (линкер SEQ ID NO: 20)	K81E, G85E	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ	47

	Модификация	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
		PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGG SGGGGSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQL LDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKE GMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL EVSEETTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQP TKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEI KTCWNKILMGTKEH	
Цепь А – Фиг.1А		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESV DTSDNSFIHWYQQKPGQSPKLLIYRSSTLE SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	48
Цепь Н – Фиг.1А		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	49
Цепь К PD1-ИЛ7-дт – Фиг.1А		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRD IYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD	50

	Модификация	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
		SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGG SGGGGDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQL LDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKE GMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL KVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQP TKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEI KTCWNKILMGTKEH	

Примеры

Ниже приведены примеры способов и композиций по настоящему изобретению. Следует понимать, что на практике можно реализовать ряд других вариантов осуществления с учетом общего описания, приведенного выше.

Примерный формат иммуноконъюгатов согласно изобретению показан в виде схематического представления на фиг. 1. Иммуноконъюгат IgG-ИЛ7 содержит два Fab-домена (вариабельный домен, константный домен), гетеродимерный Fc-домен и мутантный полипептид ИЛ-7, слитый с С-концом Fc-домена. Иммуноконъюгат IgG-ИЛ7 состоит из полипептидов аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 50.

Последовательности, предоставленные для иллюстративных форматов, относятся к иммуноконъюгатам с последовательностями ИЛ-7 дикого типа. Однако любой мутантный полпипептид ИЛ-7, раскрытый в данном документе, может быть включен в указанные форматы вместо ИЛ-7 дикого типа.

Пример 1

Пример 1.1 Получение и анализ слитых белков PD1-ИЛ7v

Слитые конструкции варианта антитела ИЛ7 (IL7v), как показано в таблице 1, получали в клетках CHO. Белки очищали с помощью аффинной хроматографии на основе белкаА и эксклюзионной хроматографии. Анализ конечного продукта состоит из определения содержания мономера (с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии) и процентного содержания основного пика (определенного с помощью невосстанавливающего капиллярного электрофореза с ДСН: КЭ-ДСН).

Таблица 1: Полипептидные аминокислотные последовательности протестированных слитых белков PD1-ИЛ7

Описание	**Вариант ИЛ7**	**ID**	**SEQ ID NO**
PD1-ИЛ7 VAR21, полностью гликозилированный	G85E	P1AG3724	33, 34, 37
PD1-ИЛ7 VAR21, частично гликозилированный	G85E, T93A, S118A	P1AG3725	33, 34, 38
PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21, частично гликозилированные	K81E, G85E, T93A, S118A	P1AG3727	33, 34, 40

Получение IgG-подобных белков в клетках CHO. Некоторые слитые конструкции антитела ИЛ7, описанные в настоящем документе, получали с использованием культур встряхиваемых колб или с использованием процесса периодической ферментации с подпиткой. Получение рекомбинантной культуры встряхиваемой колбы осуществляли путем временной трансфекции клеток ExpiCHO-S™ в определенной бессывороточной среде. Для получения слитых конструкций варианта антитела ИЛ7 клетки котрансфицировали плазмидами, содержащими соответствующую тяжелую и легкую цепи иммуноглобулина. Для трансфекции использовали набор ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit (gibco). Клеточные культуральные супернатанты собирали через 10–12 дней после трансфекции. Для периодической ферментации с подпиткой использовали запатентованную векторную систему для стабильной экспрессии белка в клетках CHO K1, адаптированных к суспензии. Белки экспрессировали пулами трансфицированных клеток в процессе периодической ферментации в автоматизированных мини-биореакторах с использованием запатентованных Roche химически определенных питательных сред для культивирования клеток и подпиток. Супернатанты собирали путем центрифугирования и последующей фильтрации (0,2 мкм фильтр).

Очистка IgG-подобных белков. Белки очищали из профильтрованных клеточных культуральных супернатантов согласно стандартным протоколам. Вкратце, содержащие Fc белки очищали из клеточных культуральных

супернатантов с помощью аффинной хроматографии с белком А (уравновешивающий буфер: PBS pH 7,4; элюирующий буфер: 100 мМ ацетат натрия, pH 3,0). Элюирование проводили при pH 3,0 с последующей немедленной нейтрализацией pH образца. Белок концентрировали путем центрифугирования (Millipore Amicon® ULTRA-15; изд. №: UFC903096) и отделяли агрегированный белок от мономерного белка с помощью эксклюзионной хроматографии в 20 мМ гистидина, 140 мМ хлорида натрия, при pH 6,0.

Аналитические методы в отношении IgG-подобных белков. Концентрации очищенных белков определяли путем измерения поглощения на 280 нм, используя массовый коэффициент экстинкции, рассчитанный на основании аминокислотной последовательности, в соответствии с Pace, et al., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423. Чистоту и молекулярную массу белков анализировали с помощью КЭ-ДСН в присутствии или отсутствии восстанавливающего агенты, используя LabChipGXII (Perkin Elmer). Определение содержания агрегатов проводили ВЭЖХ-хроматографией, используя аналитическую эксклюзионную колонку (BioSuite High Resolution), уравновешенную в подвижном буфере 25 (200 мМ KH_2PO_4, 250 мМ KCl, pH 6,2).

Таблица 2: Пик мономерного продукта, определяемый аналитической эксклюзионной хроматографией (гель-хроматографией), и пик основного продукта, определяемый невосстановленным КЭ-ДСН.

Вариант PD1-ИЛ7	**ID партии**	**Пик мономера (%)**	**Основной пик (%)**
PD1-ИЛ7_VAR21 (полностью гликозилированный)	P1AG3724-183	85,8	79,1
	P1AG3724-083	97,7	99,1
PD1-ИЛ7_VAR21 (частично гликозилированный)	P1AG3725-153	90,7	81,6
	P1AG3725-083	98,7	99,2
PD1-ИЛ7_VAR18/VAR21 (частично гликозилированные)	P1AG3727-155	94,9	71,9
	P1AG3727-083	97,2	99,1

Результаты. Конструкции вариантов PD1-ИЛ7 очищали с помощью белкаА и эксклюзионной хроматографии. Анализ качества очищенного материала показал, что содержание мономера превышало 85%, измеренное с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии (таблица 2). Пик

основного продукта составлял >70% согласно невосстановительному капиллярному электрофорезу (таблица 2). В заключение, все варианты PD1-ИЛ7 получали в хорошем качестве.

Пример 1.2. Получение и анализ дополнительных слитых белков PD1-ИЛ7v (эталонные молекулы 5, 7 и 8)

Слитые конструкции вариантов антитела ИЛ7, как описано в таблице 3, получали в клетках CHO. Белки очищали с помощью аффинной хроматографии на основе белкаА и эксклюзионной хроматографии. Анализ конечного продукта состоит из определения содержания мономера (с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии) и процентного содержания основного пика (определенного с помощью невосстанавливающего капиллярного электрофореза с ДСН: КЭ-ДСН). Эталонные молекулы 5, 7 и 8 содержат фрагменты ИЛ7, как описано в WO 2020/127377 A1. Они имеют тот же формат, что и другие слитые конструкции, описанные в настоящем документе, содержащие один фрагмент ИЛ7, слитый с N-концом антитела PD-1 (фиг. 1).

Таблица 3: Полипептидные аминокислотные последовательности протестированных слитых белков PD1-ИЛ7

Описание	**Вариант ИЛ7**	**ID**	**SEQ ID NO**
Эталонная молекула 5	D74E	P1AF9647-027	33, 35, 41
Эталонная молекула 7	SS3 (C47S/C92S, C34S/C129S)	P1AF9649-012	33, 35, 43
Эталонная молекула 8	W124H	P1AF9650-004	33, 35, 44

Клонирование. Соответствующие cDNA клонировали в векторную систему Evitria с использованием обычных (не основанных на ПЦР) методик клонирования. Синтезировали гены векторных плазмид Evitria. Плазмидную ДНК получали в условиях низкого содержания эндотоксинов на основе анионообменной хроматографии. Концентрацию ДНК определяли путем измерения поглощения при длине волны 260 нм. Правильность последовательностей проверяли с помощью секвенирования по Сэнгеру (с двумя реакциями секвенирования на плазмиду).

Получение IgG-подобных белков в клетках CHO. Описанные в настоящем документе слитые конструкции антитела ИЛ7 были изготовлены

Evitria с использованием их собственной векторной системы с помощью стандартных (не на основе ПЦР) методик клонирования и с использованием адаптированных к суспензии клеток CHO K1 (изначально полученных от ATCC и адаптированных для бессывороточного роста в суспензионной культуре в Evitria). Для получения в Evitria использовали запатентованные среды, не содержащие животные компоненты и сыворотки (eviGrow и eviMake2), а также запатентованный реагент для трансфекции (eviFect). Супернатанты собирали путем центрифугирования и последующей фильтрации (0,2 мкм фильтр).

Очистка IgG-подобных белков. Белки очищали из профильтрованных клеточных культуральных супернатантов согласно стандартным протоколам. Вкратце, содержащие Fc белки очищали из клеточных культуральных супернатантов с помощью аффинной хроматографии с белком A (уравновешивающий буфер: 20 мМ цитрата натрия, 20 мМ фосфата натрия, pH 7,5; элюирующий буфер: 20 мМ цитрат натрия, pH 3,0). Элюирование проводили при pH 3,0 с последующей немедленной нейтрализацией pH образца. Белок концентрировали путем центрифугирования (Millipore Amicon® ULTRA-15; изд. №: UFC903096) и отделяли агрегированный белок от мономерного белка с помощью эксклюзионной хроматографии в 20 мМ гистидине, 140 мМ хлориде натрия, при pH 6,0.

Аналитические методы в отношении IgG-подобных белков. Концентрации очищенных белков определяли путем измерения поглощения на 280 нм, используя массовый коэффициент экстинкции, рассчитанный на основании аминокислотной последовательности, в соответствии с Pace, et al., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423. Чистоту и молекулярную массу белков анализировали с помощью КЭ-ДСН в присутствии или отсутствие восстанавливающего агента, используя LabChipGXII или LabChip GX Touch (Perkin Elmer). Определение содержания агрегатов проводили методом ВЭЖХ-хроматографии при 25 °C, используя аналитическую эксклюзионную колонку (TSKgel G3000 SW XL или UP-SW3000), уравновешенную в подвижном буфере (200 мМ KH_2PO_4, 250 мМ KCl, pH 6,2, 0,02 % NaN_3).

Таблица 4: Пик мономерного продукта, побочные продукты с высокой молекулярной массой (HMW) и низкой молекулярной массой (LMW), определенные с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии (гель-хроматографии).

Вариант PD1-ИЛ7	**ID**	**Пик мономера (%)**	**Пик HMW (%)**	**Пик LMW (%)**
Эталонная молекула 5	P1AF9647-027	97	1,9	1
Эталонная молекула 7	P1AF9649-012	94,1	1,9	4
Эталонная молекула 8	P1AF9650-004	99,1	0,9	0

Таблица 5: Пик основного продукта определяется невосстанавливающим КЭ-ДСН.

Вариант PD1-ИЛ7	**ID**	**Основной пик (%)**
Эталонная молекула 5	P1AF9647-027	99,11
Эталонная молекула 7	P1AF9649-012	91,7
Эталонная молекула 8	P1AF9650-004	94,54

Результаты. Очищенные конструкции вариантов PD1-ИЛ7 очищали с помощью белкаА и эксклюзионной хроматографии. Эталонную молекулу 7 дегликозилировали с помощью PNGaseF перед анализом КЭ-ДСН для получения гомогенного пика. Анализ качества очищенного материала показал, что содержание мономера превышало 94% по данным аналитической эксклюзионной хроматографии (таблица 4) и что пик основного продукта составлял от 91 до 99% по данным невосстанавливающего капиллярного электрофореза (Таблица 5). В заключение, все варианты PD1-ИЛ7 получали в хорошем качестве.

Пример 1.3. Получение и анализ дополнительных слитых белков PD1-ИЛ7v (PD1-ИЛ7дт, эталонные молекулы 6, 9 и 10)

Слитые конструкции вариантов антитела ИЛ7, как показано в таблице 6, получали в клетках CHO. Белки очищали с помощью аффинной хроматографии на основе белкаА и эксклюзионной хроматографии. Анализ конечного продукта состоит из определения содержания мономера (с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии) и процентного содержания основного пика (определенного с помощью невосстанавливающего капиллярного электрофореза с ДСН: КЭ-ДСН). Эталонная молекула 6 содержит фрагмент ИЛ-7, как описано в WO 2020/127377 A1. Эталонные молекулы 9 и 10 содержат фрагменты ИЛ7, как

описано в WO 2020/236655 A1. Они имеют тот же формат, что и другие слитые конструкции, описанные в настоящем документе, содержащие один фрагмент ИЛ7, слитый с антителом к PD-1 (фиг. 1).

Таблица 6: Полипептидные аминокислотные последовательности протестированных слитых белков PD1-ИЛ7

Описание	**Вариант ИЛ7**	**ID**	**SEQ ID NO**
PD1-ИЛ7дт	-	P1AF5572-018	33, 35, 36
PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21, полностью гликозилированные	K81E, G85E	P1AG0950-001	33, 35, 47
Эталонная молекула 6	SS2 (C2S/C141S, C47S/C92S)	P1AF9648-033	33, 35, 42
Эталонная молекула 9	D74N	P1AG8273-001	33, 35, 45
Эталонная молекула 10	D74N/K81E	P1AG8275-001	33, 35, 46

Клонирование. Экспрессия всех генов находится под контролем промотора ЦМВ человека.

Получение IgG-подобных белков в клетках CHO K1 Антитела, описанные в настоящем документе, были получены WuXi Biologics с использованием их запатентованной векторной системы с использованием обычных (не основанных на ПЦР) методов клонирования и с использованием клеток CHO K1, адаптированных к суспензии. Для производства WuXi Biologics использовали коммерчески доступные химически определенные среды и культивировали клетки после трансфекции в следующих условиях: 36,5 C + 6% диоксида углерода.

Супернатанты собирали путем центрифугирования и последующей фильтрации (0,2 мкм фильтр) и очищали белки из собранного супернатанта стандартными способами.

Определение титра (БА-ВЭЖХ). Количественную оценку конструкций, содержащих Fc, в супернатантах проводили с помощью ВЭЖХ с белком A на системе ВЭЖХ Agilent с УФ-детектором. Супернатанты вводят в POROS 20 A (Applied Biosystems). Площадь элюированного пика при 280 нм интегрировали и

преобразовывали в концентрацию с использованием калибровочной кривой, полученной с использованием стандартов, проанализированных в том же цикле.

Очистка IgG-подобных белков. Белки очищали из профильтрованных клеточных культуральных супернатантов согласно стандартным протоколам. Вкратце, содержащие Fc белки очищали из клеточных культуральных супернатантов с помощью аффинной хроматографии с белком А. За элюированием сразу же проводили нейтрализацию pH образца. Белок концентрировали путем центрифугирования (Millipore Amicon® ULTRA-15; изд. №: UFC903096), и агрегированный белок отделяли от мономерного белка с помощью эксклюзионной хроматографии (Äkta Pure & HiLoad 26/600 Superdex 200; оба от Cytiva, официально известного как GE Healthcare) в 20 мМ гистидине, 140 мМ хлориде натрия, pH 6,0.

Аналитические методы в отношении IgG-подобных белков. Концентрации очищенных белков определяли путем измерения поглощения на 280 нм (Little Lunatic, официально известного как Dropsense 16; Unchained labs), используя массовый коэффициент экстинкции, рассчитанный на основании аминокислотной последовательности, в соответствии с Pace, et al., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423. Чистоту и молекулярную массу белков анализировали с помощью КЭ-ДСН в присутствии или отсутствии восстанавливающего агенты, используя LabChipGXII (Perkin Elmer). Определение содержания агрегата проводили с помощью ВЭЖХ-хроматографии при 25°C с использованием аналитической эксклюзионной колонки (TSKgel G3000 SW XL).

Таблица 7: Пик мономерного продукта, побочные продукты с высокой молекулярной массой (HMW) и низкой молекулярной массой (LMW), определенные с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии (гель-хроматографии).

Вариант PD1-ИЛ7	**ID**	**Пик мономера (%)**	**Пик HMW (%)**	**Пик LMW (%)**
PD1-ИЛ7дт	P1AF5572-018	99,6	0,4	0
PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21, полностью гликозилированные	P1AG0950-001	99	1	0
Эталонная молекула 6	P1AF9648-033	99,1	0,9	0

Вариант PD1-ИЛ7	ID	Пик мономера (%)	Пик HMW (%)	Пик LMW (%)
Эталонная молекула 9	P1AG8273-001	96,1	0,5	3,4
Эталонная молекула 10	P1AG8275-001	93,3	0,7	6

Таблица 8: Пик основного продукта определяется невосстанавливающим КЭ-ДСН.

Вариант PD1-ИЛ7	ID	Основной пик (%)
PD1-ИЛ7дт	P1AF5572-018	100
PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21, полностью гликозилированные	P1AG0950-001	99
Эталонная молекула 6	P1AF9648-033	100
Эталонная молекула 9	P1AG8273-001	95,6
Эталонная молекула 10	P1AG8275-001	93,6

Результаты. Очищенные конструкции вариантов PD1-ИЛ7 очищали с помощью белкаА и эксклюзионной хроматографии. Эталонную молекулу 9 дегликозилировали с помощью PNGaseF перед анализом с КЭ-ДСН для получения гомогенного пика. Анализ качества очищенного материала показал, что содержание мономера превышало 93% по данным аналитической эксклюзионной хроматографии (таблица 7), и что пик основного продукта составлял от 95 до 99% по данным невосстанавливающего капиллярного электрофореза (Таблица 8). В заключение, все варианты PD1-ИЛ7 получали в хорошем качестве.

Пример 1.4. Анализ структуры N-гликана с помощью 2-AB-мечения высвобожденных олигосахаридов и хроматографии HILIC

Таблица 9: Настройка анализа

Оборудование	Dionex Ultimate 3000 оснащен флуоресцентным детектором (FLD), нагревателем колонки и автоматическим пробоотборником с возможностью охлаждения
Температура	Колонка Waters Acquity BEH Glycan, 2,1 x 150 мм, 1,7 мкм)
Дополнительные устройства	Центробежные устройства NanoSep® 10 K Omega (Pall Life Science) Картридж HyperSep-96 с диолом (60300-635, Thermo Scientific) или картриджи GlycoClean TM S-plus, № Glyko: GC210 (365) Станция очистки, код продукта: Glyko GC100 (подключен к источнику вакуума) (уплотнительные пробки включены)
Реактивы	N-гликозидаза F (PNGaза F) (Roche)(без глицерина, № 11 365

	185 001) Буфер для расщепления (10 мМ формиата аммония, pH 8,6) Набор для маркировки Signal 2-AB-plus, Prozyme GKK-804 Трипсин (модифицированный класс секвенирования), прозим V511B Ресуспензионный буфер (трипсин), поставляемый с V511B

Таблица 10: Образцы, проанализированные в отношении их N-гликанов, присоединенных к Fc-части антитела к PD1 и фрагменту ИЛ7

Вариант PD1-ИЛ7	**ID**	**Конц. [г/л]**
PD1-ИЛ7-VAR21 (G85E) (полностью гликозилированный)	P1AG3724-183	1,25
PD1-ИЛ7-VAR21 (G85E) (полностью гликозилированный)	P1AG3724-083	1,38
PD1-ИЛ7-VAR21 (G85E) (частично гликозилированный)	P1AG3725-153	2,14
PD1-ИЛ7-VAR21 (G85E) (частично гликозилированный)	P1AG3725-083	1,54
PD1-ИЛ7-VAR18/VAR21 (K81E, G85E) (частично гликозилированные)	P1AG3727-155	1,82
PD1-ИЛ7-VAR18/VAR21 (K81E, G85E) (частично гликозилированные)	P1AG3727-083	1,14

200 мкг каждого образца заливали в центрифужные устройства NanoSep® 10 K. Замену буфера на буфер для расщепления (10 мМ формиата аммония, pH 8,6) проводили путем центрифугирования 3 раза до почти сухого состояния и повторного наполнения каждого 350 мкл. После последнего шага центрифугирования добавляли 48 мкл буфера для расщепления, 2 мкл N-гликозидазы F (PNGаза F, без глицерина, Roche, кат. № 11 365 185 001) и 20 мкл раствора трипсина (1,0 мг/мл в буфере для ресуспендирования, Prozyme V511B) и инкубировали в установке NanoSep при 37°C в течение 16-18 часов (в течение ночи). N-связанные олигосахариды, высвобождаемые из Fc-части и фрагмента ИЛ7, собирали из установки NanoSep в 1,5 мл пробирки с завинчивающейся крышкой Eppendorf с помощью проточного центрифугирования. 2-AB-мечение высвобожденных N-гликанов проводили с помощью набора для мечения Signal 2-AB-plus (Prozyme GKK-804) в соответствии с инструкциями поставщика (примечание: реакция должна происходить в темноте). Для очистки 2-Ab-меченых N-гликанов картриджи с диолом HyperSep-96 готовили путем уравновешивания 1 мл воды, а затем 1 мл 96% (об./об.) ацетонитрила на станции

очистки Glyko с помощью вакуума (неиспользованные лунки блокировали полосками герметизирующих пробок). 2-AB-меченные образцы N-гликана смешивали с 1 мл 96% (об./об.) ацетонитрила и загружали в уравновешенные картриджи HyperSep-96 с диолом и применяли очень низкий вакуум. Картридж промывали 3 x 0,75 мл 96% (об./об.) ацетонитрила и образцы переносили из картриджей HyperSep-96 с диолом в 2 мл центрифужные устройства. Добавляли 100 мкл 20% (об./об.) ацетонитрила/воды и обеспечивали проникновение в течение ~ 2-3 минут. Гликаны элюировали потоком посредством центрифугирования (~ 2 мин при 5000 rcf) (или вакуумом на станции очистки Glyko) и разбавляли 1:1 96% ацетонитрилом (об./об.) для хроматографического анализа. 10 мкл каждого образца олигосахарида загружали в колонку HILIC-BEH с гликаном для разделения с применением хроматографических параметров следующим образом:

Температура колонки:	60°C
Система элюентов:	Элюент A: 100 мМ формиата аммония, pH 4,5
Элюент Б:	100% ацетонитрил Буфер A
Температура автоматического пробоотборника:	10°C
Обнаружение (Dionex-UPLC):	Флуоресценция (λex=330 нм; λem=420 нм)
	Чувствительность: 6
	Скорость сбора данных: 5,00 Гц
	Время отклика: 2

Градиент:

Время [мин.]	**Расход [мл/мин.]**	**Элюент A [%]**	**Элюент Б [%]**
0	0,5	25	75
50	0,5	46	54
51	0,25	100	0
55	0,25	100	0
56	0,25	25	75
56,1	0,5	25	75
65	0,5	25	75

Результаты. Варианты PD1-ИЛ7 получали в виде полностью гликозилированного варианта (PD1-ИЛ7-VAR21 полностью гликозилированного [P1AG3724]), содержащего все нативные секвоны N-гликозилирования (N70, N91 и N116), и в виде частично гликозилированного варианта (PD1-ИЛ7-VAR21 частично гликозилированного [P1AG3725] и PD1-ИЛ7-VAR18/VAR21 частично гликозилированного [P1AG3727]), содержащего только один нативный секвон N-гликозилирования N70 и имеющего мутированные секвоны N91 и N116. Обе версии PD1-ИЛ7-VAR21 демонстрируют одну и ту же мутацию G85E в аминокислотной последовательности ИЛ7, но отличаются количеством сайтов N-гликозилирования в аминокислотной последовательности, потенциально занятой N-связанными гликолевыми структурами. Другая потенциальная переменная была идентифицирована в системе экспрессии с использованием клеток CHO, временно трансфицированных эписомальными векторами или трансформированных стабильными интегрированными векторами экспрессии. Обе переменные могут оказывать влияние на характер гликозилирования (фиг. 2). Общая степень гликозилирования зависит от количества сайтов N-гликозилирования, доступных в части ИЛ-7. PD1-ИЛ7 VAR21, полностью гликозилированный со всеми сайтами N-гликозилирования, продемонстрировал более интенсивные сложные сиалидированные гликановые сигналы, чем варианты с мутированными сайтами N-гликозилирования (частично гликозилированными; фиг. 2, A-B). Режим экспрессии может влиять на типы N-гликоструктур. Партии PD1-ИЛ7, экспрессируемые в стабильных трансфицированных клетках CHO, демонстрировали значительное количество сложных, сиалидированных би-, три-, тетра- и пентаантеннарных N-гликанов в части ИЛ7, тогда как партии от переходной экспрессии могут иметь лишь незначительные сложные сиалидированные структуры, но в основном нейтральные гликаны или даже отсутствие гликанов, присоединенных к ИЛ7 (фиг. 2 A-B по сравнению с Д-Е). Таким образом, обозначение «полностью гликозилированный» или «частично гликозилированный» не обязательно отражает эффективный статус гликозилирования молекулы, но используется для описания присутствия секвонов N-гликозилирования. Степень и/или тип гликозилирования, по-видимому, не влияют на свойства связывания ИЛ7 с рецептором ИЛ7, как показано в примерах 2 и 3.

Пример 2

Пример 2.1 Определение аффинности вариантов PD1-ИЛ7 к рецептору ИЛ7 человека

Таблица 11: Рабочие параметры SPR

Оборудование	Biacore 8K (Cytiva)
Чип	C1 (№ 903 и 908)
Fc1-8	Fc-специфическое антитело IgG к P329G (Roche internal)
Захват	5 нМ вариантов PD1-ИЛ7 в течение 140 с, при 10 мкл/мин.
Аналит	Двукратное серийное разведение от 2,34 до 300 нМ ИЛ7Rα-ИЛ2Rγ-Fc-альфа биотина человека (гетеродимер ECD цепей ИЛ7Ra и ИЛ2Rγ, слитых с Fc)
Подвижный буфер	HBS-EP (0,01 M HEPES при pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,005% поверхностно-активного вещества P20 (BR-1006-69, Cytiva) + 1 мг/мл BSA
T°	25°C
Проточная	30 мкл/мин.
Ассоциация	240 с
Диссоциация	800 с
Регенерация	10 мМ глицина при pH 2 в течение 2 x 60 с

Эксперименты (ППР) проводили на Biacore 8K с HBS-EP + 1 мг/мл BSA в качестве подвижного буфера. Fc-специфическое антитело к P329G человека (Roche internal) напрямую иммобилизовали посредством аминного сопряжения на чипе C1 (Cytiva). Захват конструкций PD1-ИЛ7 проводили в течение 140 с при 5 нМ. Трипликаты (дубликаты для P1AG3727- 083) серии 2-кратных серийных разведений от 2,34 до 300 нМ гетеродимера ИЛ7Ra-ИЛ2Rg-Fc человека пропускали над лигандом со скоростью 30 мкл/мин. в течение 240 с для регистрации фазы ассоциации. Фазу диссоциации отслеживали в течение 800 с и инициировали путем переключения с раствора для образца на подвижный буфер. Поверхность чипа восстанавливали после каждого цикла, используя два введения 10 мМ глицина при pH 2 в течение 60 с. Разницу объемного показателя преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного на эталонной проточной ячейке (содержащий только Fc-специфический IgG иммобилизованного антитела к P329G). Константы аффинности получали из кинетических констант скорости путем аппроксимации 1:1 моделью связывания Ленгмюра, используя пробное программное обеспечение Biacore (Cytiva).

Следующие варианты PD1-ИЛ7 анализировали на связывание с рецептором ИЛ7 (Таблица 12).

Таблица 12: Описание образцов, проанализированных на связывание с рецептором ИЛ7

Варианты PD1-ИЛ7	**ID**	**Конц. [г/л]**
PD1-ИЛ7дт	P1AF5572-018	4,4
PD1-ИЛ7-VAR21 (полностью гликозилированный)	P1AG3724-183	1,25
PD1-ИЛ7-VAR21 (частично гликозилированный)	P1AG3725-153	2,14
PD1-ИЛ7-VAR18/VAR21 (частично гликозилированные)	P1AG3727-083	1,14
Эталонная молекула 5	P1AF9647-027	0,76
Эталонная молекула 6	P1AF9648-033	2,5
Эталонная молекула 7	P1AF9649-012	1,35
Эталонная молекула 8	P1AF9650-004	3,81
Эталонная молекула 9	P1AG8273-001	2,5
Эталонная молекула 10	P1AG8275-001	2,3

Название образца аналитических соединений	**ID TAPIR**	**Конц. [г/л]**
ИЛ7Rα-ИЛ2Rγ-Fc биотин человека	P1AF4984-007	1,43

Результаты. Варианты PD1-ИЛ7 и эталонные молекулы сравнивали на предмет связывания с рецептором ИЛ7 человека (таблица 13). Аффинность вариантов PD1-ИЛ7 к рецептору ИЛ7 определяли с использованием рекомбинантного гетеродимера внеклеточных доменов альфа-цепи рецептора ИЛ-7 и общей гамма-цепи рецептора ИЛ-2, слитой с Fc человека.

Таблица 13: Связывание вариантов PD1-ИЛ7 с рецептором ИЛ7 человека: константы аффинности, определяемые с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C. Среднее значение трех повторностей (дубликаты для P1AG3727- 083), стандартное отклонение в скобках.

Вариант PD1-ИЛ7	**ID**	**ka [1/Мс]**	**kд [1/с]**	**КД [М]**
PD1-ИЛ7дт	P1AF5572-018	7,27E+05 (2,21E+04)	2,47E-04 (1,03E-05)	3,4E-10 (1,4E-11)
PD1-ИЛ7-VAR21 (полностью гликозилированный)	P1AG3724-183	2,40E+05 (3,15E+04)	2,90E-03 (2,48E-04)	1,22E-08 (1,68E-09)
PD1-ИЛ7-VAR21 (частично гликозилированный)	P1AG3725-153	2,62E+05 (3,48E+04)	5,62E-03 (2,87E-04)	2,17E-08 (2,4E-09)
PD1-ИЛ7-VAR18/VAR21 (частично гликозилированные)	P1AG3727-083	1,08E+05 (2,83E+03)	1,27E-02 (0)	1,18E-07 (2,12E-09)
Эталонная молекула 5	P1AF9647-027	3,52E+05 (6,51E+03)	2,37E-04 (1,98E-05)	6,71E-10 (4,38E-11)

Вариант PD1-ИЛ7	ID	ka [1/Мс]	кд [1/с]	КД [М]
Эталонная молекула 6	P1AF9648-033	1,09E+05 (4,04E+03)	1,08E-03	9,94E-09 (9,24E-11)
Эталонная молекула 7	P1AF9649-012	очень слабое связывание		
Эталонная молекула 8	P1AF9650-004	3,86E+05 (2,51E+04)	3,27E-04 (3,30E-05)	8,47E-10 (6,66E-11)
Эталонная молекула 9	P1AG8273-001	4,56E+05 (1,96E+04)	3,16E-04 (3,08E-05)	6,96E-10 (9,33E-11)
Эталонная молекула 10	P1AG8275-001	2,26E+05 (1,59E+04)	1,10E-03 (2,25E-04)	4,94E-09 (1,29E-09)

PD1-ИЛ7-VAR21, полностью гликозилированный и частично гликозилированный, связывается с рецептором ИЛ7 человека с аффинностью между 10-20 нМ и PD1-ИЛ7-VAR18/VAR21, частично гликозилированным с аффинностью около 120 нМ, что в 6-12 раз ниже. Эталонные молекулы 5, 8 и 9 имеют более высокую аффинность к рецептору ИЛ7 человека (около 0,6-0,9 нМ), а эталонные молекулы 6 и 10 близки к PD1-ИЛ7-VAR21, полностью и частично гликозилированному с аффинностями 10 и 5 нМ, соответственно. Эталонная молекула 7 практически не связывается в этих условиях и считается неактивной.

Заключение. Мутации, введенные в ИЛ7 в PD1-ИЛ7-VAR21, полностью и частично гликозилированном, и PD1-ИЛ7-VAR18/VAR21, частично гликозилированном, приводят к снижению аффинности к рецептору ИЛ7 человека, причем PD1-ИЛ7-VAR18/VAR21, частично гликозилированный, имеет аффинность в диапазоне от 6 до 12 раз ниже, чем конструкции PD1-ИЛ7-VAR21.

Пример 2.2 Определение аффинности вариантов PD1-ИЛ7 к рецептору ИЛ7 человека

Измерения аффинности с помощью SPR повторяли несколько раз в разные даты, и измеренные значения КД варьировались в определенном диапазоне от одного измерения к другому. В Таблице 14 представлен обзор различных измеренных значений. Все измерения выполнялись с той же настройкой, что и описанная выше в разделе настроек, только микросхема является переменной (всегда микросхема типа C1).

Таблица 14: Связывание вариантов PD1-ИЛ7 из различных систем экспрессии с рецептором ИЛ7 человека. Анализ: дата, повторы и идентификатор чипа. Если n>1: Среднее и стандартное отклонение в скобках. Гликозилирование ИЛ7: содержание сложных, сиалидированных N-гликозилирований в фрагменте Fc- и/или ИЛ-7: ++ высокое содержание, + среднее содержание, o низкое содержание.

Конструкция (Названия образцов захваченных молекул)	**ID**	**Анализ**	**ka [1/Mc]**	**kд [1/c]**	**КД [M]**	**Гликосилирование ИЛ7**	**Система выражений**
PD1-ИЛ7дт	P1AF5572-018	210307 дубликаты C1 854	4,44E+05 (7,07E+04)	3,13E-04 (5,59E-05)	7,68E-10 (3,03E-10)	+	переходный CHO
	P1AF5572-018	210310 дубликаты C1 854	3,74E+05 (2,26E+04)	1,81E-04 (2,19E-05)	4,82E-10 (2,9E-11)	+	переходный CHO
	P1AF5572-018	210318 дубликатов C1 854	3,89E+05 (2,97E+04)	2,18E-04 (4,67E-05)	5,67E-10 (1,63E-10)	+	переходный CHO
	P1AF5572-018	210909 один C1 908	5,64E+05	2,59E-04	4,59E-10	+	переходный CHO
	P1AF5572-018	210922 трижды C1 908	7,27E+05 (2,21E+04)	2,47E-04 (1,03E-05)	3,4E-10 (1,4E-11)	+	переходный CHO
PD1-IL7-VAR21, полностью гликозилированное	P1AG3724-183	210817 трипликаты C1 903	2,40E+05 (3,15E+04)	2,90E-03 (2,48E-04)	1,22E-08 (1,68E-09)	++	стабильный CHO
	P1AG3724-183	210909 один C1 908	1,52E+05	3,61E-03	2,37E-08	++	стабильный CHO
	P1AG3724-083	210909 один C1 908	4,49+E05	2,12E-03	4,72E-09	o	переходный CHO
PD1-IL7-VAR21 частично гликозилированное	P1AG3725-153	210817 трипликаты C1 903	2,62E+05 (3,48E+04)	5,62E-03 (2,87E-04)	2,17E-08 (2,4E-09)	+	стабильный CHO

Конструкция (Названия образцов захваченных молекул)	ID	Анализ	ka [1/Mc]	kд [1/c]	КД [M]	Гликосилирование ИЛ7	Система выражений
	P1AG3725-153	210909 один C1 908	5,31E+05	5,53E-03	1,04E-08	+	стабильный CHO
	P1AG3725-083	210909 один C1 908	2,72E+05	4,81E-03	1,77E-08	o	переходный CHO
PD1-IL7-VAR18/VAR21 частично гликозилированное	P1AG3727-083	210922 дубликаты C1 908	1,08E+05 (2,83E+03)	1,27E-02 (0)	1,18E-07 (2,12E-09)	o	переходный CHO
	P1AG3727-083	210909 один C1 908	8,94E+05	1,87E-02	2,09E-07	o	переходный CHO

Результаты. Как описано выше в Примере 1.4, на общую степень гликозилирования влияет количество сайтов N-гликозилирования, доступных в фрагменте ИЛ-7, и типы гликоструктур в режиме экспрессии.

Несмотря на различия в гликозилировании, как PD1-ИЛ7-VAR21, полностью гликозилированный, так и PD1-ИЛ7-VAR21, частично гликозилированный, демонстрируют стабильно сопоставимую аффинность с ИЛ7R величины того же порядка (таблица 14). Значения КД варьируют от 4,7 до 23,7 нМ со средним значением 15 нМ и демонстрируют снижение аффинности по сравнению с ИЛ7 дикого типа (в среднем КД 0,5 нМ). Степень и/или тип гликозилирования не влияют на свойства связывания ИЛ7 с рецептором ИЛ7.

Пример 3

Пример 3.1 Передача сигналов ИЛ-7R (STAT5-P) на активированных PD-1$^+$ и PD-1$^-$ CD4 Т-клетках при обработке возрастающими дозами вариантов PD1-ИЛ7

В следующем эксперименте полностью и частично гликозилированные молекулы PD1-ИЛ7 сравнивали в цис-таргетированном анализе и анализе передачи сигналов активности STAT5-P, чтобы оценить, влияет ли характер гликозилирования на силу передачи сигналов мутированного ИЛ-7 через рецептор ИЛ-7 на PD-1$^+$ и PD-1$^-$ Т-клетках. Для этого передачу сигналов ИЛ7R измеряли на PD1$^+$ и PD1$^-$ (предварительно обработанных антителом к PD1) CD4

Т-клетках, выделяли, активировали и совместно культивировали, как описано ранее, после воздействия на них повышенной концентрации гликозилированного и частично гликозилированного PD1-ИЛ7 VAR21 или частично гликозилированного PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21. С этой целью CD4 Т-клетки отделяли от МКПК здоровых доноров с помощью гранул CD4 (130-045-101, Miltenyi) и активировали в течение 3 дней в присутствии 1 мкг/мл антитела к CD3, связанного с планшетом (предварительно нанесенного в течение ночи, клон OKT3, № 317315, BioLegend) и 1 мкг/мл растворимых антител к CD28 (клон CD28.2, № 302923, BioLegend) для индукции экспрессии PD-1. Через три дня клетки собирали и несколько раз промывали для удаления эндогенного IL-2. Затем клетки разделяли на две группы, одну из которых инкубировали с насыщающей концентрацией антитела к PD1 (молекула собственного производства, 10 мкг/мл) в течение 30 мин. при к.т. После нескольких шагов промывки для удаления избытка несвязавшегося антитела к PD-1 предварительно обработанные антителом к PD1 и необработанные клетки (50 мкл, $4*10^6$ клеток/мл) высевали в планшет с V-образным дном перед обработкой в течение 12 мин. при 37°C с возрастающими концентрациями вариантов PD1-ИЛ7 (50 мкл, шаги разведения 1:10 с максимальной концентрацией 66 нМ). Для сохранения состояния фосфорилирования, непосредственно после инкубации в течение 12 минут с различными конструкциями добавляли равное количество буфера Phosphoflow Fix Buffer I (100 мкл, 557870, BD). Затем клетки инкубировали в течение дополнительных 30 мин. при 37°C, и затем пермеабилизировали в течение ночи при 80°C с помощью Phosphoflow PermBuffer III (558050, BD). На следующий день STAT-5 в его фосфорилированной форме окрашивали в течение 30 мин. при 4°C с использованием антитела к STAT-5P (клон 47/Stat5(pY694), 562076, BD). Клетки приобретали в FACS BD-LSR Fortessa (BD Bioscience). Частоту STAT-5P определяли с помощью FlowJo (V10) и наносили на график с помощью GraphPad Prism.

Данные на фиг. 3А и 3Б и в таблице 15 демонстрируют разницу в активности PD1-ИЛ7дт, PD1-ИЛ7 VAR21, полностью и частично гликозилированного, и PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21, частично гликозилированного, на предварительно блокированных PD-1^+ и PD-1 CD4 Т-клетках. Активность, измеренная на $PD1^+$ CD4 Т-клетках, отражает комбинацию PD1-зависимой и

независимой доставки ИЛ-7. Напротив, измерение активности на предварительно блокированных PD1 CD4 Т-клетках представляет собой PD1-независимую доставку ИЛ-7, поскольку все сайты связывания PD1 заняты для предотвращения связывания PD-1.

Таблица 15: EC50, цис-активность и кратное снижение эффективности дозозависимого фосфорилирования STAT-5 для выбранных мутантов на PD-1$^+$ и предварительно заблокированных PD-1 CD4 Т-клетках от здоровых доноров.

Вариант PD1-ИЛ7	**EC50 PD1$^+$**	**EC50 PD1$^-$ (предварительно заблокированные)**	**цис-активность как EC50 [PD1$^-$ предварительно заблокированные]/ EC50 [PD1$^+$]**	**Кратное снижение активности как EC50 [PD1$^+$] / EC50 [PD1$^+$ PD1-ИЛ7дт]**
PD1-ИЛ7дт (P1AF5572-005)	274	765,5	2,79	1,00
PD1-ИЛ7 VAR21, полностью гликозилированный (P1AG3724-183/ P1AG3724-083)	135	10423	77,21	0,49
PD1-ИЛ7 VAR21, частично гликозилированный (P1AG3725-153, P1AG3725-083)	152,7	15892	104,07	0,56
PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21, полностью гликозилированные (P1AG0950-001)	900	н/о	н/о	3,28
PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21, частично гликозилированные (P1AG3727-083)	595,2	н/о	н/о	2,17

Цис-активность, отношение между PD1-зависимой и независимой доставкой ИЛ-7 каждого варианта PD1-ИЛ7, рассчитывали в Таблице 15 путем деления EC50 предварительно заблокированных клеток PD-1 на EC50 PD1$^+$ Т-клеток. Это обеспечивает измерение силы PD1-зависимой доставки ИЛ-7 для каждой из конструкций PD1-ИЛ7, когда клетки экспрессируют один и тот же уровень ИЛ-7Ra/общей гамма-цепи.

PD1-ИЛ7дт служил контролем для демонстрации эффективности природной для ИЛ-7 и независимой от PD-1 доставки ИЛ-7 в PD-1$^-$ Т-клетки. Кроме того, в таблице 15 кратное снижение EC50 между вариантами PD1-ИЛ7 и

PD1-ИЛ7дт рассчитывали путем деления EC50 варианта PD1-ИЛ7 на EC50 PD1-ИЛ7дт. Это указывало на потерю активности PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21 из-за сниженной аффинности к ИЛ-7Ra.

Характер гликозилирования PD1-ИЛ7 VAR21 не влиял на его активность в отношении PD-1$^+$ Т-клеток, причем частично гликозилированный вариант оставался таким же эффективным, как и полностью гликозилированный вариант, при этом демонстрируя высокую цис-активность как 77-100-кратное снижение активности в отношении PD-1$^-$ Т-клеток по сравнению с 2,79-кратным снижением активности в отношении PD1-ИЛ7дт (фиг. 3А и таблица 15). Для данных полностью и частично гликозилированных конструкций PD1-ИЛ7 VAR21 объединяли данные двух разных партий образцов. Одну партию получали с использованием стабильной системы экспрессии (P1AG3724-183 и P1AG3725-153), а другую - с использованием переходной системы экспрессии (P1AG3724-083 и P1AG3725-083). Как описано выше в Примере 1.4, различные партии демонстрируют различные уровни гликозилирования. Низкое стандартное отклонение между партиями дополнительно демонстрирует, что характер гликозилирования не влияет на активность ИЛ7.

PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21, частично гликозилированный, который, хотя и менее активен и обладает сниженной максимальной активностью, чем PD1-ИЛ7дт и PD1-ИЛ7 VAR21, практически неактивен на PD-1$^-$ Т-клетках, демонстрирующих сильную цис-опосредованную доставку с помощью PD-1 (фиг. 3Б и таблица 15). Это полезно с точки зрения уменьшенного компонента ИЛ-7 и, следовательно, уменьшенного периферического поглощения для PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21, как продемонстрировано в исследовании *in vivo*. Гуманизированных мышей, не несущих опухоль, дважды подкожно обрабатывали либо PD1-ИЛ7дт, либо PD1-ИЛ7 VAR21, полностью гликозилированными, либо PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21, полностью гликозилированными, и пускали кровь через 4 и 72 часа, как после первой, так и после второй обработки, чтобы измерить воздействие лекарственного средства в сыворотке крови мышей. PD1-ИЛ7дт и полностью гликозилированный PD1-ИЛ7 VAR21 быстро выводятся из сыворотки крови в течение первых часов после обработки, в то время как полностью гликозилированные PD1-ИЛ7 VAR18/VAR21 все еще обнаруживаются в сыворотке крови через 72 часа и накапливаются после второй дозы (фиг. 4). Потенциально дополнительные

преимущества заключаются в дополнительном снижении аффинности ИЛ-7 к ИЛ-7R, например, в более широком терапевтическом окне и способности дозировать дозу для преодоления потери воздействия из-за антител к лекарственному средству.

Пример 3.2 Передача сигналов ИЛ-7R (STAT5-P) на активированных PD-1$^+$ и PD-1$^-$ CD4 Т-клетках при обработке возрастающими дозами эталонных молекул по сравнению с PD1-ИЛ7VAR21

В этом эксперименте цис-нацеливание и эффективность передачи сигналов STAT-5P эталонных молекул PD1-ИЛ7 5-10, полученных путем слияния вариантов ИЛ-7 с тем же блокирующим PD1-связывающим веществом, которое использовалось для PD1-ИЛ7 VAR21, сравнивали с PD1-ИЛ7 VAR21, полностью гликозилированным. Для этого передачу сигналов ИЛ7R измеряли на PD1$^+$ и PD1$^-$ (предварительно обработанных антителом к PD1) CD4 Т-клетках, выделяли, активировали и совместно культивировали, как описано ранее, после воздействия на клетки увеличивающихся концентраций иммуноцелевых цитокинов.

Хотя эталонная молекула 5 и эталонная молекула 9 в 9,4 и 7,3 раза более эффективны, чем полностью гликозилированный PD1-ИЛ7 VAR21, обе эталонные молекулы проявляют активность также на PD-1$^-$ Т-клетках, которая всего в 2 и 2,5 раза ниже, чем на PD-1$^+$ Т-клетках, что указывает на независимую от PD-1 доставку вариантов ИЛ-7, аналогичную той, что наблюдалась для PD1-ИЛ7дт в примере 3.2. Только эталонная молекула 6 и эталонная молекула 10 продемонстрировали 32-кратное и 20-кратное снижение активности на PD-1$^-$ Т-клетках, соответственно, по сравнению с PD-1$^+$ Т-клетками, поддерживающими опосредованную PD-1 цис-доставку агонизма ИЛ-7R, в то время как PD1-ИЛ7 VAR21, полностью гликозилированный, продемонстрировал 39-кратное снижение активности (таблица 16, фигура 5). Кроме того, эталонная молекула 10 в 2,2 раза менее эффективна, чем PD1-ИЛ7 VAR21, полностью гликозилированный.

Таблица 16: EC50, цис-активность и кратное снижение эффективности дозозависимого фосфорилирования STAT-5 для выбранных мутантов на PD-1^{+} и предварительно заблокированных PD-1 CD4 Т-клетках от здоровых доноров.

Вариант PD1-ИЛ7	**EC50 PD1^{+}**	**EC50 PD1^{-} (предварительно заблокированные)**	**цис-активность как EC50 [PD1^{-} предварительно заблокированные]/ EC50 [PD1^{+}]**	**Кратное снижение активности как EC50 [PD1^{+}] / EC50 [PD1^{+} PD1-ИЛ7 VAR21]**
PD1-ИЛ7 VAR21, полностью гликозилированный	273,6	10676	39,0	1,0
Эталонная молекула 5	29,04	58,74	2,0	0,1
Эталонная молекула 6	329,3	10570	32,1	1,2
Эталонная молекула 7	3518	461,1	0,1	12,6
Эталонная молекула 8	79,32	355	4,5	0,2
Эталонная молекула 9	37,64	94,45	2,5	0,1
Эталонная молекула 10	621	12845	20,7	2,2

* * *

Хотя вышеизложенное изобретение было подробно описано посредством иллюстрации и примеров в целях ясности понимания, описания и примеры не следует воспринимать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Раскрытие всех патентов и научной литературы, цитируемых в данном документе, в полном объеме и явным образом включено посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мутантный полипептид интерлейкина-7 (ИЛ-7), содержащий аминокислотную замену в положении G85 ИЛ-7 человека согласно SEQ ID NO: 28, причем аминокислотная замена снижает аффинность связывания мутантного полипептида интерлейкина-7 с ИЛ-7Rα по сравнению с полипептидом интерлейкина-7, содержащим SEQ ID NO: 28.

2. Мутантный полипептид интерлейкина-7 по п. 1, в котором указанная аминокислотная замена представляет собой G85E.

3. Мутантный полипептид интерлекина-7 по пп. 1 и 2, причем мутантный полипептид интерлейкина-7 дополнительно содержит аминокислотную замену в положении K81.

4. Мутантный полипептид интерлекина-7 по любому из пп. 1-3, причем мутантный полипептид интерлекина-7 содержит аминокислотную замену K81E.

5. Мутантный полипептид интерлейкина-7 по любому из пп. 1-4, причем мутантный полипептид интерлейкина-7 дополнительно содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении, выбранном из группы T93 и S118, при этом указанная аминокислотная замена снижает гликозилирование мутантного полипептида интерлейкина-7 по сравнению с мутантным полипептидом интерлейкина-7 без указанных аминокислотных замен.

6. Мутантный полипептид интерлейкина-7 по п. 5, в котором указанная(ые) аминокислотная(ые) замена(ы) выбрана(ы) из группы, состоящей из T93A и S118A.

7. Мутантный полипептид интерлейкина-7 по любому из пп. 1-6, причем мутантный полипептид интерлейкина-7 содержит аминокислотные замены T93A и S118A.

8. Иммуноконъюгат, содержащий (i) мутантный полипептид ИЛ-7 по любому из пп. 1-7 и (ii) антитело.

9. Иммуноконъюгат по п. 8, в котором антитело связывается с PD-1.

10. Иммуноконъюгат по п. 8 или п. 9, в котором антитело содержит (a) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, HVR-H2,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, и FR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, в положениях 71-73 в соответствии с нумерацией по Кабату и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

11. Иммуноконъюгат по любому из пп. 8-10, в котором антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13.

12. Иммуноконъюгат по любому из пп. 8-11, в котором антитело содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14, и (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO:18.

13. Иммуноконъюгат по любому из пп. 8-12, причем иммуноконъюгат содержит не более одного мутантного полипептида ИЛ-7.

14. Иммуноконъюгат по любому из пп. 8-13, в котором антитело содержит Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц.

15. Иммуноконъюгат по п. 14, в котором Fc-домен представляет собой Fc-домен класса IgG, в частности подкласса IgG_1.

16. Иммуноконъюгат по п. 14 или п. 15, в котором Fc-домен представляет собой Fc-домен человека.

17. Иммуноконъюгат по любому из пп. 8-16, в котором антитело представляет собой иммуноглобулин класса IgG, в частности подкласса IgG_1.

18. Иммуноконъюгат по любому из пп. 14-17, в котором Fc-домен содержит модификацию, способствующую ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена.

19. Иммуноконъюгат по любому из пп. 14-18, в котором в CH3-домене первой субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим больший объем боковой цепи, с созданием таким образом выпуклости в CH3-домене первой субъединицы, которая может располагаться в полости в CH3-домене второй субъединицы, а в CH3-домене второй субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим меньший объем боковой цепи, с созданием таким образом полости в CH3-домене второй субъединицы, в которой может располагаться выпуклость из CH3-домена первой субъединицы.

20. Иммуноконъюгат по любому из пп. 14-19, в котором в первой субъединице Fc-домена остаток треонина в положении 366 замещен остатком триптофана (T366W), а во второй субъединице Fc-домена остаток тирозина в положении 407 замещен остатком валина (Y407V), и необязательно остаток треонина в положении 366 замещен остатком серина (T366S), а остаток лейцина в положении 368 замещен остатком аланина (L368A) (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

21. Иммуноконъюгат по п. 20, в котором в первой субъединице Fc-домена дополнительно остаток серина в положении 354 замещен остатком цистеина (S354C), или остаток глутаминовой кислоты в положении 356 замещен остатком цистеина (E356C), а во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток тирозина в положении 349 замещен остатком цистеина (Y349C) (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

22. Иммуноконъюгат по любому из пп. 14-21, в котором мутантный полипептид ИЛ-7 слит на его аминоконцевой аминокислоте с карбоксиконцевой аминокислотой одной из субъединиц Fc-домена, в частности, первой субъединицы Fc-домена, необязательно с помощью линкерного пептида.

23. Иммуноконъюгат по п. 22, в котором линкерный пептид имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

24. Иммуноконъюгат по любому из пп. 14-23, в котором Fc-домен содержит одну или более аминокислотных замен, которые уменьшают связывание с Fc-рецептором, в частности, Fcγ-рецептором, и/или эффекторную функцию, в частности, антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ).

25. Иммуноконъюгат по п. 24, в котором указанная одна или более аминокислотных замен происходят в одном или более положениях, выбранных из группы L234, L235 и P329 (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

26. Иммуноконъюгат по любому из пп. 14-25, в котором каждая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G (нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату).

27. Иммуноконъюгат по любому из пп. 8-26, содержащий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 33, полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 34, и полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40.

28. Иммуноконъюгат по любому из пп. 8-27, состоящий главным образом из мутантного полипептида ИЛ-7 и молекулы иммуноглобулина IgG_1, соединенных посредством линкерной последовательности.

29. Иммуноконъюгат по любому из пп. 8-28, состоящий главным образом из мутантного полипептида ИЛ-7 и молекулы иммуноглобулина IgG_1, соединенных посредством линкера SEQ ID NO: 19.

30. Один или более выделенных полинуклеотидов, кодирующих мутантный полипептид ИЛ-7 по любому из пп. 1-7 или иммуноконъюгат по любому из пп. 8-29.

31. Один или более векторов, в частности векторов экспрессии, содержащих полинуклеотид(ы) по п. 30.

32. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид(ы) по п. 30 или вектор(ы) по п. 31.

33. Способ получения мутантного полипептида ИЛ-7 или иммуноконъюгата, содержащего мутантный полипептид ИЛ-7 и антитело, которое связывается с PD-1, включающий (а) культивирование клетки-хозяина по п. 32 в условиях, подходящих для экспрессии мутантного полипептида ИЛ-7 или иммуноконъюгата, и необязательно (б) восстановление мутантного полипептида ИЛ-7 или иммуноконъюгата.

34. Мутантный полипептид ИЛ-7 или иммуноконъюгат, содержащий мутантный полипептид ИЛ-7 и антитело, которое связывается с PD-1, полученное с помощью способа по п. 33.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая мутантный полипептид ИЛ-7 по любому из пп. 1-7 или п. 34 или иммуноконъюгат по любому из пп. 8-29 или п. 34 и фармацевтически приемлемый носитель.

36. Мутантный полипептид ИЛ-7 по любому из пп. 1-7 или п. 34 или иммуноконъюгат по любому из пп. 8-29 или п. 34 для применения в качестве лекарственного средства.

37. Мутантный полипептид ИЛ-7 по любому из пп. 1-7 или п. 34 или иммуноконъюгат по любому из пп. 8-29 или п. 34 для применения в лечении заболевания.

38. Мутантный полипептид ИЛ-7 или иммуноконъюгат для применения в лечении заболевания по п. 37, причем указанное заболевание представляет собой рак.

39. Применение мутантного полипептида ИЛ-7 по любому из пп. 1-7 или п. 34 или иммуноконъюгата по любому из пп. 8-29 или п. 34 в производстве лекарственного средства для лечения заболевания.

40. Применение по п. 39, в котором указанное заболевание представляет собой рак.

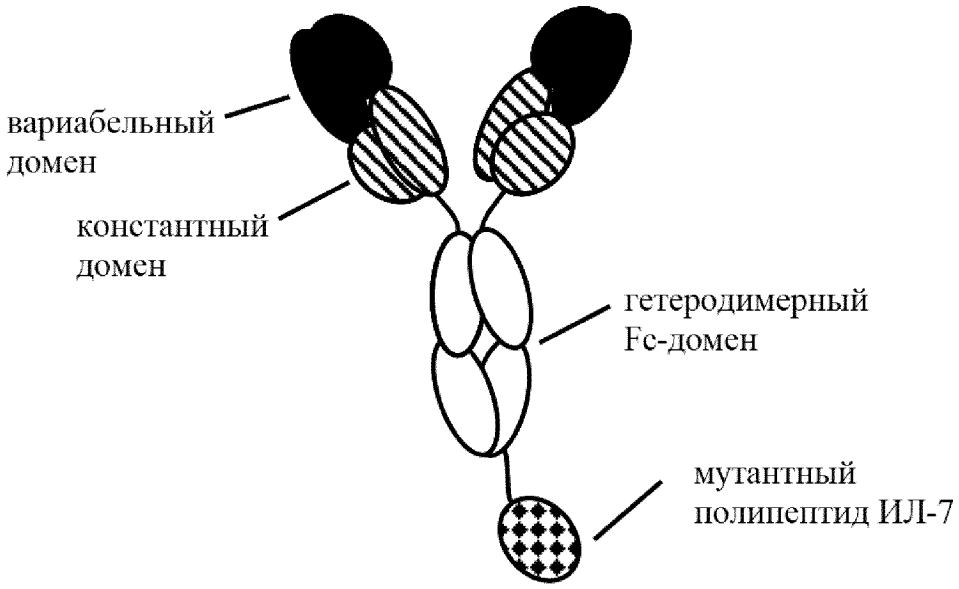
41. Способ лечения заболевания у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму терапевтически эффективного количества композиции, содержащей мутантный полипептид ИЛ-7 по любому из пп. 1-7 или п. 34 или иммуноконъюгат по любому из пп. 8-29 или п. 34 в фармацевтически приемлемой форме.

42. Способ по п. 41, в котором указанное заболевание представляет собой рак.

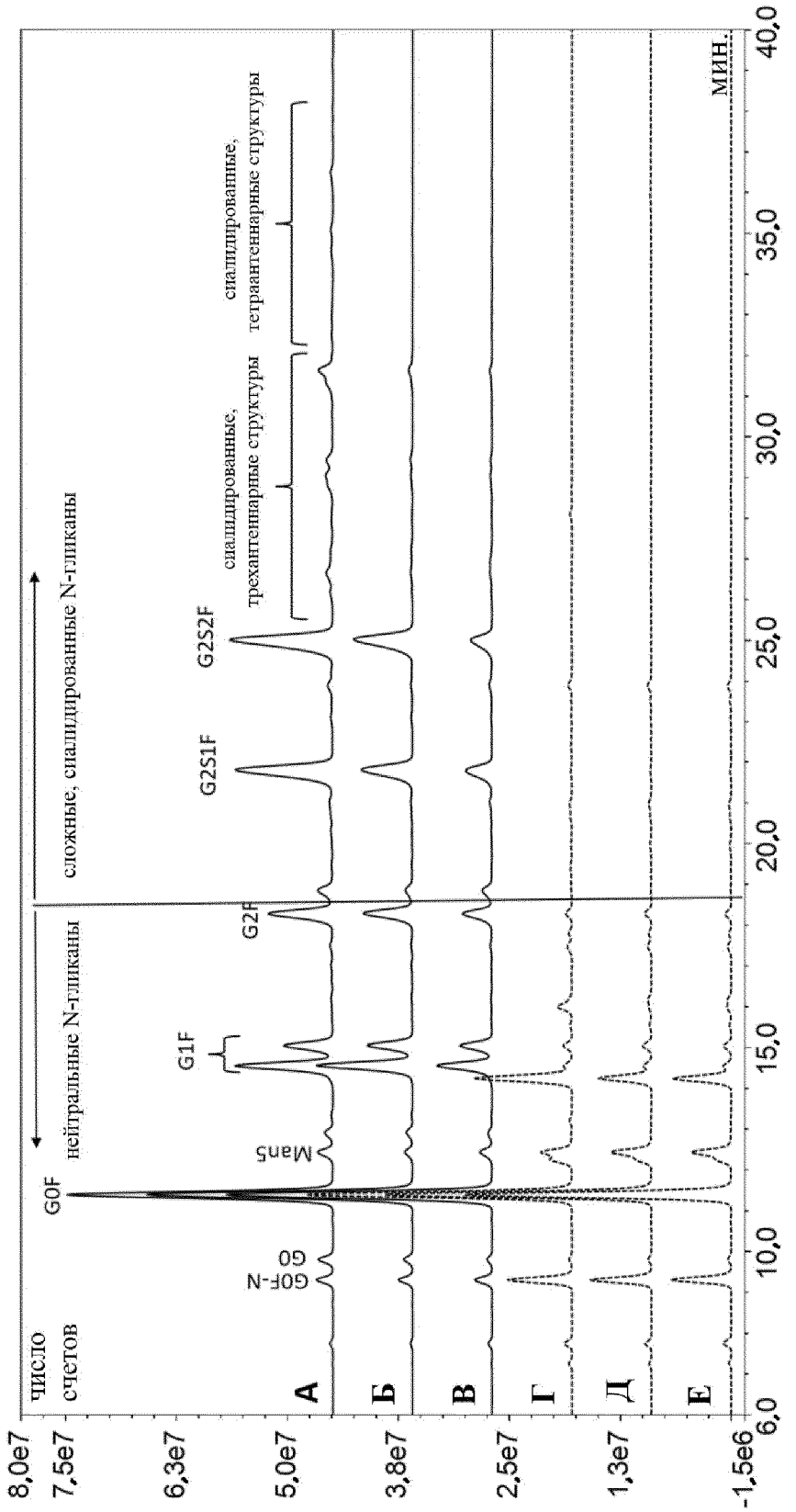
43. Способ стимуляции иммунной системы индивидуума, включающий введение указанному индивидууму эффективного количества композиции, содержащей мутантный полипептид ИЛ-7 по любому из пп. 1-7 и п. 34 или иммуноконъюгат по любому из пп. 8-29 или п. 34 в фармацевтически приемлемой форме.

44. Изобретение, как описано выше в настоящем документе.

Фиг. 1

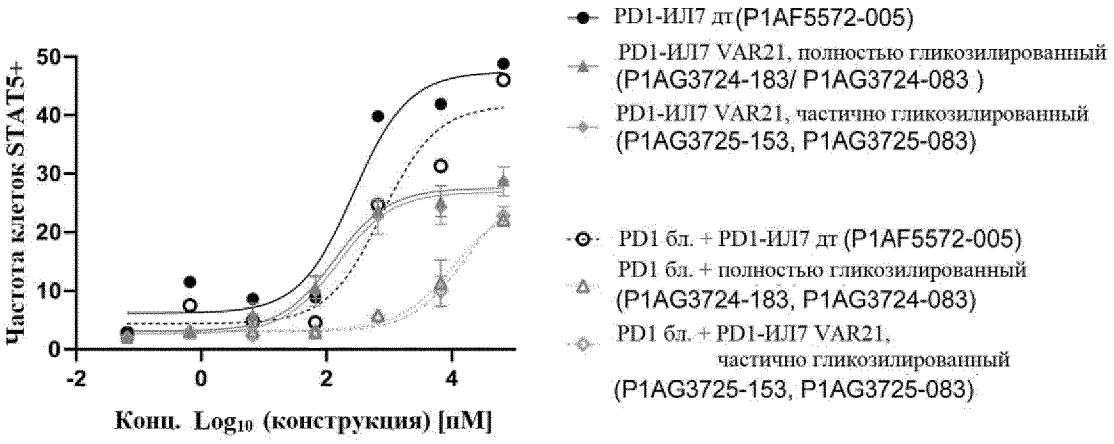

вариабельный домен
константный домен
гетеродимерный Fc-домен
мутантный полипептид ИЛ-7

Фиг. 2

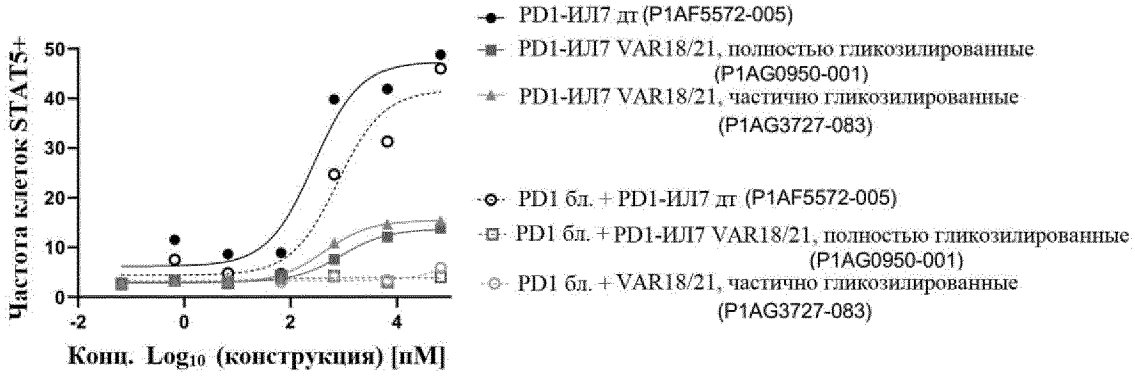

число счетов
8,0e7
7,5e7
6,3e7
5,0e7
3,8e7
2,5e7
1,3e7
-1,5e6
6,0
10,0
15,0
20,0
25,0
30,0
35,0
40,0
мин.
А
Б
В
Г
Д
Е
G0F-N
G0
G0F
Man5
G1F
G2F
нейтральные N-гликаны
G2S1F
G2S2F
сиалидированные, трехантеннарные структуры
сиалидированные, тетраантеннарные структуры
сложные, сиалидированные N-гликаны

Фиг. 3

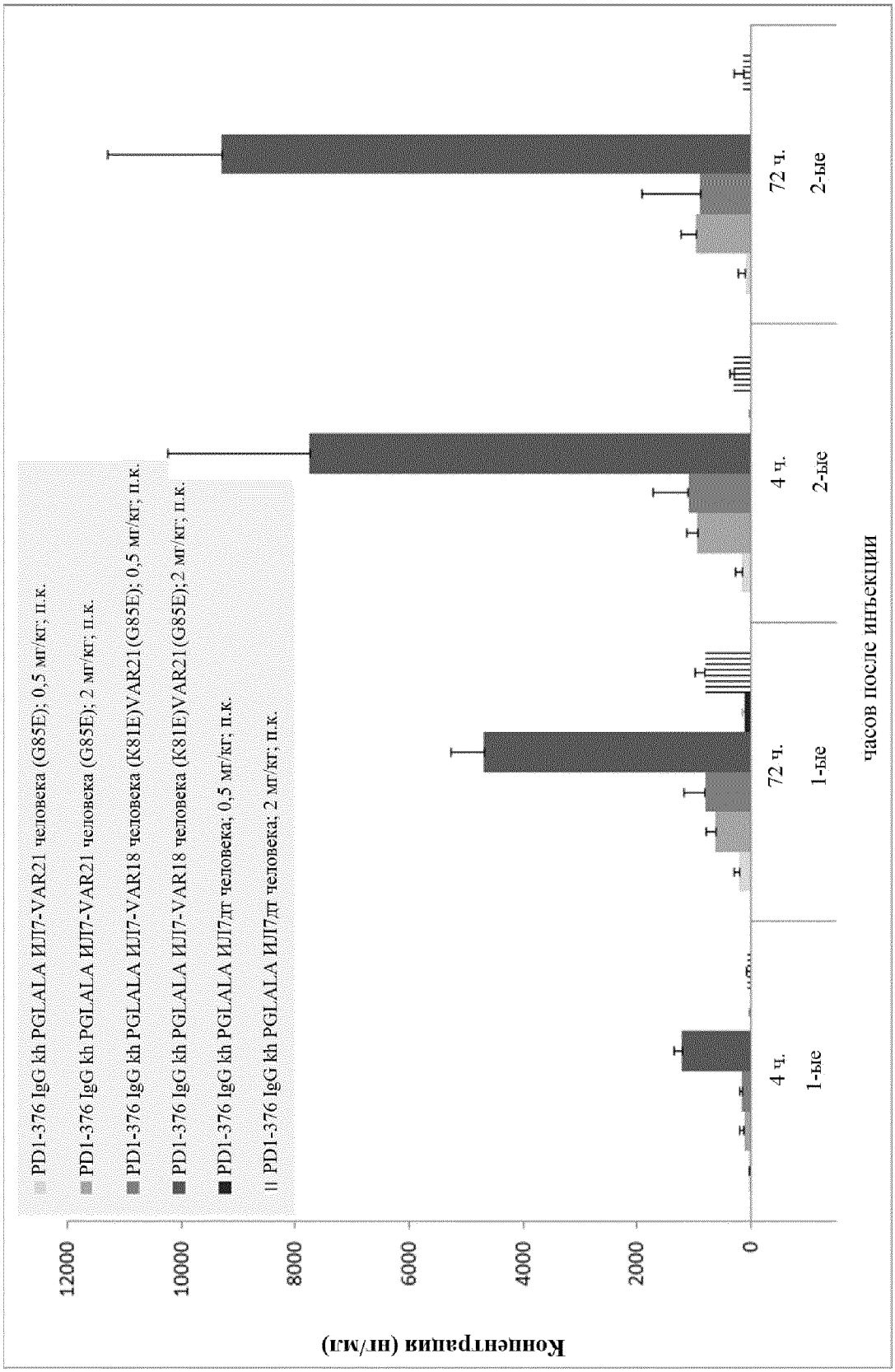
А


Частота клеток STAT5+
50
40
30
20
10
0
-2
0
2
4
Конц. Log10 (конструкция) [нМ]
PD1-ИЛ7 дт (P1AF5572-005)
PD1-ИЛ7 VAR21, полностью гликозилированный
(P1AG3724-183/ P1AG3724-083)
PD1-ИЛ7 VAR21, частично гликозилированный
(P1AG3725-153, P1AG3725-083)
PD1 бл. + PD1-ИЛ7 дт (P1AF5572-005)
PD1 бл. + полностью гликозилированный
(P1AG3724-183, P1AG3724-083)
PD1 бл. + PD1-ИЛ7 VAR21,
частично гликозилированный
(P1AG3725-153, P1AG3725-083)

Б

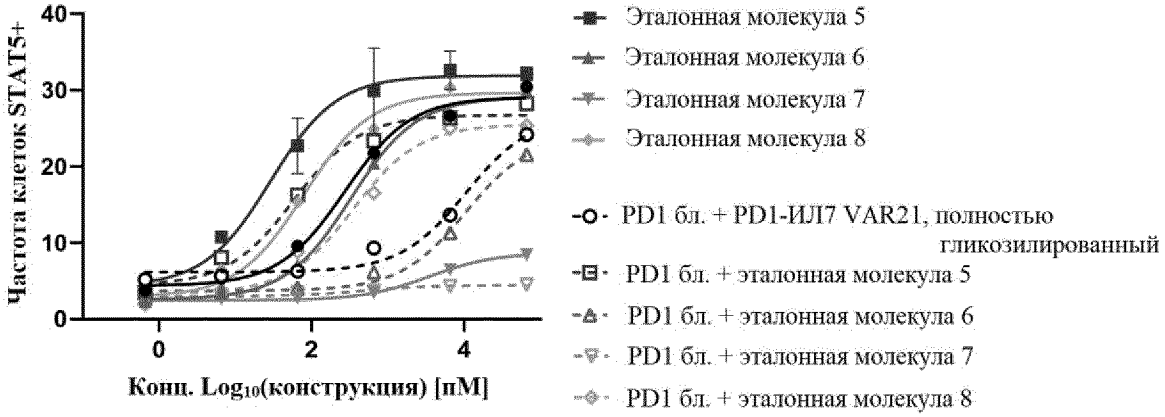

Частота клеток STAT5+
50
40
30
20
10
0
-2
0
2
4
Конц. Log10 (конструкция) [нМ]
PD1-ИЛ7 дт (P1AF5572-005)
PD1-ИЛ7 VAR18/21, полностью гликозилированные
(P1AG0950-001)
PD1-ИЛ7 VAR18/21, частично гликозилированные
(P1AG3727-083)
PD1 бл. + PD1-ИЛ7 дт (P1AF5572-005)
PD1 бл. + PD1-ИЛ7 VAR18/21, полностью гликозилированные
(P1AG0950-001)
PD1 бл. + VAR18/21, частично гликозилированные
(P1AG3727-083)

Фиг. 4

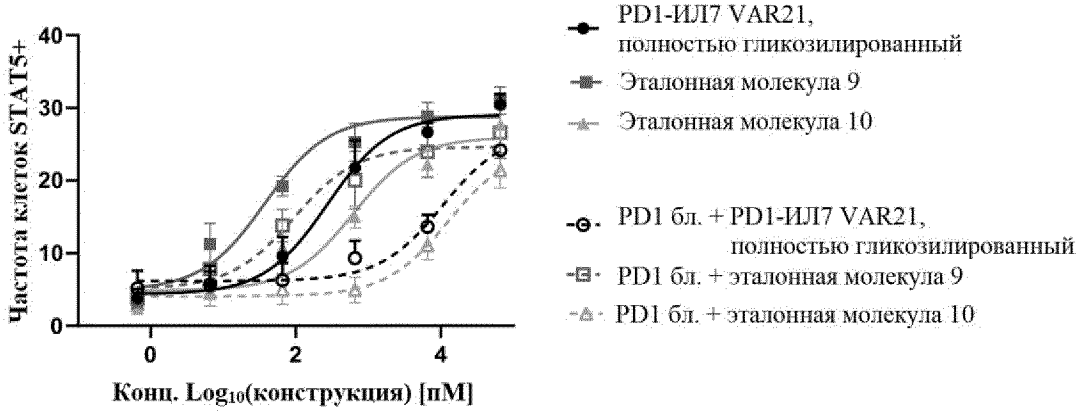

PD1-376 IgG kh PGLALA ИЛ7-VAR21 человека (G85E); 0,5 мг/кг; п.к.
PD1-376 IgG kh PGLALA ИЛ7-VAR21 человека (G85E); 2 мг/кг; п.к.
PD1-376 IgG kh PGLALA ИЛ7-VAR18 человека (K81E)VAR21(G85E); 0,5 мг/кг; п.к.
PD1-376 IgG kh PGLALA ИЛ7-VAR18 человека (K81E)VAR21(G85E);2 мг/кг; п.к.
PD1-376 IgG kh PGLALA ИЛ7дт человека; 0,5 мг/кг; п.к.
PD1-376 IgG kh PGLALA ИЛ7дт человека; 2 мг/кг; п.к.
Концентрация (нг/мл)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
4 ч.
72 ч.
4 ч.
72 ч.
1-ые
1-ые
2-ые
2-ые
часов после инъекции

Фиг. 5

А


Частота клеток STAT5+
40
30
20
10
0
0
2
4
Конц. Log10(конструкция) [пМ]
PD1-ИЛ7 VAR21, полностью гликозилированный
Эталонная молекула 5
Эталонная молекула 6
Эталонная молекула 7
Эталонная молекула 8
PD1 бл. + PD1-ИЛ7 VAR21, полностью гликозилированный
PD1 бл. + эталонная молекула 5
PD1 бл. + эталонная молекула 6
PD1 бл. + эталонная молекула 7
PD1 бл. + эталонная молекула 8

Б


Частота клеток STAT5+
40
30
20
10
0
0
2
4
Конц. Log10(конструкция) [пМ]
PD1-ИЛ7 VAR21, полностью гликозилированный
Эталонная молекула 9
Эталонная молекула 10
PD1 бл. + PD1-ИЛ7 VAR21, полностью гликозилированный
PD1 бл. + эталонная молекула 9
PD1 бл. + эталонная молекула 10