

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392999 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.12.18

(51) Int. Cl. A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.06.13

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ IL-2 И АНТИ-PD-1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/210,111; 63/365,375

(32) 2021.06.14; 2022.05.26

(33) US

(86) PCT/US2022/072895

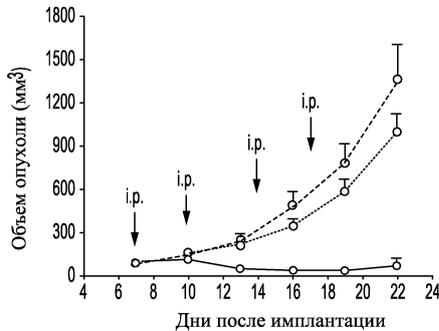
(87) WO 2022/266598 2022.12.22

(71) Заявитель:
РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Линь Чиа-Ян, У Цзяси, Блоч
Николин, Чжан Тун, Дэвис Самьюэл,
Смит Эрик, Уллман Эрика (US)

(74) Представитель:
Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-1 человека, и фрагмент IL2, и способам его применения.



--○-- Антитело изотипического контроля
○.....Изотипический контроль-hIL2Ra-IL2+анти-PD-1
 —○— REGN10486 + антитело изотипического контроля

A1

202392999

202392999

A1

БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ИЛ-2 И АНТИ-PD-1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОПИСАНИЕ

Область техники настоящего изобретения

[0001] Настоящее изобретение в целом относится к терапевтическим средствам на основе ИЛ2 и способам их применения и, более конкретно, к слитому белку, содержащему фрагмент ИЛ2 и антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-1 человека, а также к способам его применения.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0002] Интерлейкин 2 (ИЛ-2 или ИЛ2) представляет собой плюрипотентный цитокин, продуцируемый преимущественно активированными Т-клетками. Он стимулирует пролиферацию и дифференцировку Т-клеток, индуцирует образование цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) и дифференцировку лимфоцитов периферической крови в цитотоксические клетки и лимфокинактивированные клетки-киллеры (ЛАК), способствует экспрессии цитокинов и цитолитических молекул Т-клетками, способствует пролиферации и дифференцировке В-клеток и синтезу иммуноглобулина В-клетками, а также стимулирует образование, пролиферацию и активацию естественных клеток-киллеров (NK) (см. Waldmann, 2006, Nat Rev Immunol 6:595-601 и Malek, 2008, Annu Rev Immunol 26:453-79). ИЛ2 участвует в поддержании периферических CD4⁺CD25⁺ регуляторных Т-клеток (Treg) (см., например, Fontenot *et al.*, 2005, Nature Immunol 6:1142-51), которые также известны как супрессорные Т-клетки. Они подавляют эффекторные Т-клетки от разрушения их (собственных) мишеней либо посредством межклеточного контакта путем ингибирования хелпера и активации Т-клеток, либо посредством высвобождения иммуносупрессивных цитокинов, таких как ИЛ-10 или TGFβ. Было показано, что истощение Treg-клеток усиливает ИЛ2-индуцированный противоопухолевый иммунитет (Imai *et al.*, 2007, Cancer Sci 98:416-23).

[0003] Однако ИЛ2 не является оптимальным для ингибирования роста опухоли из-за его плейотропных эффектов. Применение ИЛ2 в качестве противоопухолевого агента было ограничено тяжелой токсичностью, которая сопровождает дозы, необходимые для ответа опухоли. Proleukin® (представлен компанией Prometheus Laboratories, San Diego, Calif.) представляет собой рекомбинантную форму ИЛ-2, одобренную для лечения метастатической

меланомы и метастатического рака почки, но ее побочные эффекты являются настолько тяжелыми, что ее применение рекомендовано только в госпитале с доступом к интенсивной терапии. Основным побочным эффектом терапии IL2 является синдром пропотевания жидкости из сосудов (VLS), который приводит к накоплению интерстициальной жидкости в легких и печени, что приводит к отеку легких и повреждению печени. Для VLS не существует другого лечения, кроме отмены IL2. Было показано, что IL2-индуцированный отек легких возникает в результате прямого связывания IL2 с эндотелиальными клетками легких, которые экспрессируют функциональные высокоаффинные рецепторы IL2 на уровне от низкого до среднего (Krieg *et al.*, 2010, Proc Nat Acad Sci USA 107:11906-11). Несмотря на общее одобрение в области терапии IL2, направленной на CD122, разрабатываемой для терапии рака, неожиданно было обнаружено, что такие молекулы имеют плохие терапевтические показатели для терапии рака, при этом для обеспечения умеренного противоракового эффекта требуются высокие токсичные дозы.

[0004] Таким образом, в области техники существует острая потребность в новых терапиях на основе IL2 с улучшенными профилями терапевтической эффективности и безопасности.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

[0005] Настоящее изобретение удовлетворяет одну или несколько потребностей, упомянутых выше. Слитые белки согласно настоящему изобретению содержат антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-1 человека, который нацелен на опухоль-реактивные Т-клетки. Антигенсвязывающий фрагмент полезен для селективного восстановления активности опухоль-реактивных Т-клеток. Слитые белки дополнительно содержат фрагмент IL2, где фрагмент IL2 содержит IL2, связанный с IL2R α . Согласно определенным вариантам осуществления слитые белки содержат немодифицированную последовательность IL2. Согласно определенным вариантам осуществления слитые белки сохраняют способность связываться с эндогенным IL2R α . Слитый белок содержит фрагмент IL2 в транс-секвестрированной конформации. Это поддерживает взаимодействие с активированными Т-клетками CD8⁺, однако, связанная конфигурация фрагмента IL2 помогает маскировать IL2 и ослаблять его активность, что приводит к снижению системной токсичности. Например, слитые белки согласно настоящему изобретению не вызывают острый отек легких (пропотевание жидкости через сосуды) у мышей

по сравнению с IL2 дикого типа. Слитые белки согласно настоящему изобретению обеспечивают повышенную противоопухолевую эффективность и улучшенный терапевтический индекс по сравнению с IL2 отдельно или в комбинации с ингибитором PD-1 (например, анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент).

[0006] Согласно одному аспекту раскрытая технология относится к слитому белку, включающему: (i) антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с человеческим белком запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1), и (ii) фрагмент интерлейкина 2 (IL2). Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-1 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-1 человека, представляют собой человеческое моноклональное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент включает три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где: HCDR1 включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 43, 4 или 24, HCDR2 включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 45, 6 или 26, HCDR3 включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 47, 8 или 28, LCDR1 включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12 или 32, LCDR2 включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, и LCDR3 включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 16 или 35.

[0007] Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент включает HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, включающие соответствующие аминокислотные последовательности согласно (i) SEQ ID NO: 43, 45, 47, 12, 14 и 16, (ii) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 и 16 или (iii) SEQ ID NO: 24, 26, 28, 32, 14 и 35. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент включает HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, включающие соответствующие аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 43, 45, 47, 12, 14 и 16. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи (HCVR), включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41, 2 или 22, и переменную область легкой цепи (LCVR), включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10 или 30. Согласно некоторым вариантам

осуществления HCVR включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, и LCVR включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10. Согласно некоторым вариантам осуществления HCVR включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 22, и LCVR включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам осуществления HCVR включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41, и LCVR включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент включает константную область тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 55 и константную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 56. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент включает тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 61, 57 или 59, и легкая цепь включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 62, 58 или 60. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент включает пару последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи согласно SEQ ID NO: 61/62, 57/58 или 59/60.

[0008] Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент включает пару последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи согласно SEQ ID NO: 61/62. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 включает (i) IL2 или его фрагмент и (ii) рецептор IL2 альфа (IL2R α) или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления IL2 или его фрагмент представляет собой человеческий IL2 (hIL2) или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления IL2R α или его фрагмент представляет собой человеческий IL2R α (hIL2R α) или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления IL2 или его фрагмент включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53. Согласно некоторым вариантам осуществления IL2R α или его фрагмент включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым вариантам осуществления IL2 или его фрагмент соединен с C-концом IL2R α или его фрагмента через линкер. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 соединен с C-концом константной области тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента через линкер. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер включает аминокислотную последовательность одного или нескольких повторов GGGGS (SEQ ID NO: 67). Согласно некоторым вариантам осуществления линкер включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 50 или 52. Согласно некоторым вариантам

осуществления фрагмент IL2 включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54.

[0009] Согласно другому аспекту раскрытая технология относится к слитому белку, включающему: (i) первый полипептид, включающий переменную область легкой цепи (LCVR) человеческого антитела, которое специфически связывается с PD-1 человека, и (ii) второй полипептид, который включает (a) переменную область тяжелой цепи (HCVR) антитела, которое специфически связывается с PD-1 человека, и (b) фрагмент IL2. Согласно некоторым вариантам осуществления HCVR включает три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и LCVR включает три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где: HCDR1 включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 43, 4 или 24, HCDR2 включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 45, 6 или 26, HCDR3 включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 47, 8 или 28, LCDR1 включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12 или 32, LCDR2 включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, и LCDR3 включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 16 или 35. Согласно некоторым вариантам осуществления HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, включающие аминокислотные последовательности согласно (i) SEQ ID NO: 43, 45, 47, 12, 14 и 16, (ii) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 и 16 или (iii) SEQ ID NO: 24, 26, 28, 32, 14 и 35. Согласно некоторым вариантам осуществления HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 включают аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 43, 45, 47, 12, 14 и 16, соответственно.

[0010] Согласно некоторым вариантам осуществления HCVR и LCVR включают аминокислотные последовательности согласно (i) SEQ ID NO: 41 и 10, (ii) SEQ ID NO: 2 и 10 или (iii) SEQ ID NO: 22 и 30. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид включает константную область легкой цепи, связанную с LCVR. Согласно некоторым вариантам осуществления константная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 56. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид включает константную область тяжелой цепи, связанную с HCVR, и где фрагмент IL2 связан с С-концом константной области тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления константная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид включает последовательность легкой цепи

согласно SEQ ID NO: 62, 58 или 60. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид включает последовательность тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 61, 57 или 59.

[0011] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок включает пару последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи согласно SEQ ID NO: 61/62, 57/58 или 59/60. Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок включает пару последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи согласно SEQ ID NO: 61/62. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 включает (i) IL2 или его фрагмент и (ii) IL2R α или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 соединен с С-концом константной области тяжелой цепи через линкер. Согласно некоторым вариантам осуществления IL2 или его фрагмент соединен с С-концом IL2R α или его фрагмента через линкер. Согласно некоторым вариантам осуществления IL2 или его фрагмент представляет собой человеческий IL2 (hIL2) или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления IL2R α или его фрагмент представляет собой человеческий IL2R α (hIL2R α) или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления IL2 или его фрагмент включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53. Согласно некоторым вариантам осуществления IL2R α или его фрагмент включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер включает аминокислотную последовательность одного или нескольких повторов GGGGS (SEQ ID NO: 67). Согласно некоторым вариантам осуществления линкер включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 50 или 52. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 62, 58 или 60.

[0012] Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 63, 64 или 65. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 58, и второй полипептид включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 64. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 60, и второй полипептид включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 63. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 62, и второй полипептид включает аминокислотную последовательность

согласно SEQ ID NO: 65. Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок образует димерный слитый белок. Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок димеризуется через его соответствующие константные области тяжелой цепи.

[0013] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок не конкурирует с REGN2810, пембролизумабом или ниволумабом за связывание с PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок проявляет сниженную активность в активации комплексов IL2R α / β / γ и IL2R β / γ человека по сравнению с IL2. Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок проявляет повышенную активность в активации IL2R α человека по сравнению с ненацеленным IL2R α -IL2. Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок проявляет повышенную активность в стимуляции Т-клеток, как измерено по уровню высвобождения IFN- γ , по сравнению с человеческим IL2 дикого типа. Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок проявляет ослабленное связывание с IL2R α , IL2R β и IL2R γ .

[0014] Согласно другому аспекту раскрытая технология относится к нуклеиновой кислоте или множеству нуклеиновых кислот, включающим полинуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок, раскрытый в настоящем документе. Согласно другому аспекту раскрытая технология относится к вектору, включающему нуклеиновую кислоту или множество нуклеиновых кислот, раскрытых в настоящем документе. Согласно другому аспекту раскрытая технология относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту, или множество нуклеиновых кислот, или вектор, раскрытые в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка-хозяин экспрессирует первый вектор, включающий полинуклеотидную последовательность, которая кодирует первый полипептид слитого белка, раскрытого в настоящем документе, и второй вектор, включающий полинуклеотидную последовательность, которая кодирует второй полипептид слитого белка, раскрытого в настоящем документе.

[0015] Согласно другому аспекту раскрытая технология относится к способу получения слитого белка, раскрытого в настоящем документе, предусматривающему культивирование клетки-хозяина, раскрытой в настоящем документе, в условиях, позволяющих продукцию слитого белка или его фрагмента, и выделение полученного таким образом слитого белка или его фрагмента.

[0016] Согласно другому аспекту раскрытая технология относится к фармацевтической композиции, включающей слитый белок, раскрытый в настоящем

документе. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция дополнительно включает анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не конкурируют перекрестно со слитым белком за связывание с PD-1.

[0017] Согласно другому аспекту раскрытая технология относится к способу лечения рака, предусматривающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества слитого белка или фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает введение субъекту слитого белка в количестве от 0,005 мг/кг до 10 мг/кг массы тела субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает введение субъекту второго терапевтического агента или терапии.

Краткое описание чертежей

[0018] На фиг. 1A, 1B, 1C и 1D приведены графики, показывающие результаты исследования *in vivo*, как описано в примере 6. На фиг. 1A и 1B показаны объем опухоли (мм³) (фиг. 1A) и процент выживаемости (фиг. 1B) мышей, обработанных антителом изотипического контроля, изотипический контроль-hIL2R α -IL2 + анти-PD-1, REGN10486 + антитело изотипического контроля. На фиг. 1C и 1D показаны объем опухоли (мм³) (фиг. 1C) и процент выживаемости (фиг. 1D) мышей, обработанных изотипическим контролем, REGN10486, REGN10595 и REGN10597.

[0019] На фиг. 2A и 2B приведен набор графиков, демонстрирующих результаты анализа связывания FACS, который сравнивает связывание родительских антител анти-альфа-hPD1 антитело (« α hPD1» или «ahPD1») с клетками PD1+ (фиг. 2A) со связыванием слитых конструкций анти- α hPD1 антитело-IL2R α -IL2 с клетками PD1+ (фиг. 2B), как описано в примере 8.

[0020] На фиг. 3A и 3B показана экспериментальная модель (фиг. 3A) и полученные нативные масс-спектры (фиг. 3B) смеси анти-PD-1-IL2R α -IL2 + hIgG4 антитело по сравнению со специфическими смесями антител, как описано в примере 9.

[0021] На фиг. 4A и 4B приведен набор графиков, демонстрирующих высвобождение IFN γ и пролиферацию Т-клеток в ответ на титрование антитела или цитокинов, как описано в примере 10. Аллогенные PBMC, смешанные с Т-клетками, обрабатывали титрованием дозы

рекомбинантного IL2, анти-PD-1-IL2R α -IL2 (REGN10597, REGN10595 и REGN10486) или изотипический контроль-IL2R α -IL2 (REGN9903), и оценивали высвобождение IFN γ (фиг. 4А) и пролиферацию (фиг. 4В).

[0022] На фиг. 5А и 5В приведен набор графиков, демонстрирующих высвобождение IFN γ Т-клетками в ответ на титрование антител или цитокинов в отсутствие (фиг. 5А) или присутствии (фиг. 5В) REGN2810, как описано в примере 11. Клетки RAJI/CD80 KO/CD86 KO/PDL1 инкубировали с Т-клетками и обрабатывали фиксированной дозой анти-CD3хCD20 (REGN1979) и титрованием дозы изотипического контроля (REGN7540), изотип-IL2R α -IL2 антителом (REGN9903), анти-PD1 антитела с переменными областями mAb9048 (REGN15187), анти-PD1-IL2R α -IL2 (REGN10597) или комбинации REGN9903 + REGN15187 в отсутствие (фиг. 5А) или присутствии (фиг. 5В) REGN2810. Измеряли высвобождение IFN γ .

[0023] На фиг. 6А, 6В, 6С, 6D, 6Е, 6F, 6G и 6H приведены графики, показывающие оценку активности *in vivo* слитой конструкции анти-PD1-IL2R α -IL2 REGN10597 у гуманизированных мышей PD1хLAG3, главным образом, по сравнению с: комбинацией ненацеленного контроля REGN10597 и PD-1 блокирующего антитела REGN2810 (фиг. 6А и 6В), анти-PD1-нацеленной «неальфа» (3m) молекулой сравнения REGN13233 (фиг. 6С, 6D, 6Е и 6F) и конструкцией, содержащей все те же компоненты, что и REGN10597, но с IL2 и IL2R α , слитыми друг с другом в обратном порядке (фиг. 6G и 6H), как описано в примере 12.

[0024] На фиг. 7А и 7В показаны графики анализа связывания IL2, описанного в примере 13. YT/STAT5-Luc/IL2Ra KO (фиг. 7А) или YT/STAT5-Luc/IL2Ra OE (фиг. 7В) инкубировали с титрованием антитела, последовательного слитого с IL2 (REGN8512, серый незакрашенный круг с пунктирной линией), или антитела, последовательно слитого с IL2Ra и IL2 (REGN9904, черный покрашенный круг со сплошной линией). Клетки промывали, окрашивали анти-IgG человека AF647, промывали, фиксировали и регистрировали на проточном цитометре iQue Plus.

[0025] На фиг. 8А и 8В приведены графики, показывающие сравнение репортерного анализа IL2 Ab-IL2Ra-IL2 и Ab-IL2-IL2Ra, как описано в примере 14. YT/STAT5-Luc/IL2Ra KO/hPD1 (фиг. 8А) или YT/STAT5-Luc/hIL2Ra/hPD1 (фиг. 8В) инкубировали с титрованием ненацеленного IL2Ra-IL2 (черный открытый круглый символ с черной пунктирной линией, REGN9903), ненацеленного IL2-IL2Ra (серый квадратный открытый символ с серой пунктирной линией), анти-PD1-IL2Ra-IL2 (черный покрашенный круглый символ с черной сплошной линией, REGN10597) или анти-PD1-IL2-IL2Ra (серый квадратный покрашенный

символ с серой сплошной линией). Через 4 часа и 30 минут активность STAT5 оценивали по люминесцентному считыванию.

[0026] На фиг. 9А и 9В приведены графики, показывающие сравнение репортерного анализа IL2 Ab-IL2Ra-IL2 и Ab-IL2(3m), как описано в примере 14. YT/STAT5-Luc/IL2Ra KO/hPD1 (фиг. 9А) или YT/STAT5-Luc/hIL2Ra/hPD1 (фиг. 9В) инкубировали с титрованием нацеленного IL2Ra-IL2 (черный открытый круглый символ с черной пунктирной линией, REGN9904), ненацеленного IL2(3m) (серый ромбовидный открытый символ с серой пунктирной линией), анти-PD1-IL2Ra-IL2 (черный закрашенный круглый символ с черной сплошной линией, REGN10597) или анти-PD1-IL2(3m) (серый ромбовидный символ с серой сплошной линией). Через 4 часа активность STAT5 оценивали по люминесцентному считыванию.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

[0027] Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и условиями эксперимента, поскольку такие способы и условия могут различаться. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, и что объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, далее описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте, если не указано иное.

Слитые белки

[0028] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему: (i) антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-1 человека, и (ii) фрагмент IL2. Раскрытый слитый белок неожиданно эффективен в стимуляции Т-клеток и ингибировании роста опухоли по сравнению с анти-hPD1 антителом (таким как

REGN2810). Согласно определенным вариантам осуществления слитый белок демонстрирует лучший профиль безопасности по сравнению с молекулой IL2, нацеленной против PD-1 (такой как REGN13233).

[0029] Раскрытый слитый белок может представлять собой мономеры или мультимеры, например, димеры (гомодимеры или гетеродимеры) или комплексы высокого порядка. С целью упрощения, слитые белки, которые являются гомодимерами (или мультимерами более высокого порядка одного и того же полипептида), описываются посредством составляющих их мономеров, однако, при рекомбинантной экспрессии мономеров компонентов в подходящей клеточной линии можно получить гомодимерную молекулу (или мультимер более высокого порядка).

[0030] Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-1 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с PD-1 человека, представляет собой человеческое моноклональное антитело.

[0031] В контексте настоящего изобретения термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (т.е. «полные молекулы антитела»), а также его мультимеру (например, IgM) или его антигенсвязывающим фрагментам. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи («HCVR» или «VH») и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи («LCVR» или «VL») и константной области легкой цепи (CL). Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), с вкраплениями более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоят из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно некоторым вариантам осуществления FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе

параллельного анализа двух или более CDR. Термин «антитело» в контексте настоящего изобретения также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител.

[0032] В контексте настоящего изобретения термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, «антигенсвязывающая часть» антитела и тому подобное включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антитела с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной генной инженерии, включающие манипуляции с и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговых библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и подвергать манипуляциям химическим путем или с использованием методов молекулярной биологии, например, чтобы расположить один или несколько переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или ввести кодоны, создать остатки цистеина, модифицировать, добавить или удалить аминокислоты и т.д.

[0033] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты, (ii) фрагменты F(ab')₂, (iii) фрагменты F_d, (iv) F_v-фрагменты, (v) одноцепочечные молекулы F_v (scFv), (vi) фрагменты dAb и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические средства (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы также охватываются выражением «антигенсвязывающий фрагмент», применяемым в настоящем документе.

[0034] Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и обычно содержит по меньшей мере одну CDR, расположенную

рядом или в рамке с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , связанный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

[0035] Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые можно обнаружить в антигенсвязывающем фрагменте антитела согласно настоящему изобретению, включают: (i) V_H - C_{H1} , (ii) V_H - C_{H2} , (iii) V_H - C_{H3} , (iv) V_H - C_{H1} - C_{H2} , (v) V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} , (vi) V_H - C_{H2} - C_{H3} , (vii) V_H - C_L , (viii) V_L - C_{H1} , (ix) V_L - C_{H2} , (x) V_L - C_{H3} , (xi) V_L - C_{H1} - C_{H2} , (xii) V_L - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} , (xiii) V_L - C_{H2} - C_{H3} и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и константного домена, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, посредством дисульфидной связи (связей)).

[0036] Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащиеся в слитых белках, раскрытых в настоящем документе, могут представлять собой человеческие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. В контексте настоящего изобретения термин «человеческое антитело» относится к антителам, имеющим переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержатся в слитых белках согласно настоящему изобретению, тем не менее, могут включать

аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro*, или соматические мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако термин «человеческое антитело» в контексте настоящего изобретения не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, таких как мышь, были привиты на человеческие каркасные последовательности.

[0037] Антитела, содержащиеся в слитых белках, раскрытых в настоящем документе, могут быть рекомбинантными человеческими антителами. В контексте настоящего изобретения термин «рекомбинантное человеческое антитело» включает все человеческие антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, такие как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяин (подробнее описано ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител (описанной дополнительно ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулина человека (см., например, Taylor *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Согласно некоторым вариантам осуществления, однако, такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают мутагенезу *in vitro* (или, когда используют животное, трансгенное для последовательностей Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и происходят из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и родственны ей, в природе не могут существовать в репертуаре зародышевой линии антител человека *in vivo*.

[0038] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты специфически связываются с PD-1 человека. В контексте настоящего изобретения термин «специфически связывается» и т.п. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который относительно

стабилен в физиологических условиях. Способы определения того, специфически ли антитела связываются с антигеном, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Например, антитело, которое «специфически связывается» с PD-1 человека, как используется в контексте настоящего изобретения, включает антитела, которые связываются с PD-1 человека или его частью с K_D менее приблизительно 500 нМ, менее приблизительно 300 нМ, менее приблизительно 200 нМ, менее приблизительно 100 нМ, менее приблизительно 90 нМ, менее приблизительно 80 нМ, менее приблизительно 70 нМ, менее приблизительно 60 нМ, менее приблизительно 50 нМ, менее приблизительно 40 нМ, менее приблизительно 30 нМ, менее приблизительно 20 нМ, менее приблизительно 10 нМ, менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 4 нМ, менее приблизительно 3 нМ, менее приблизительно 2 нМ, менее приблизительно 1 нМ или менее приблизительно 0,5 нМ, как измерено методом поверхностного плазмонного резонанса. Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1 человека, может иметь перекрестную реактивность в отношении других антигенов, таких как молекулы PD-1 других (не относящихся к человеку) видов.

[0039] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарности области тяжелой цепи (HCDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где: HCDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, 24 или 43, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, 26 или 45, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, 28 или 47, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12 или 32, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 16 или 35.

[0040] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие соответствующие аминокислотные последовательности согласно (i) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 и 16, (ii) SEQ ID NO: 24, 26, 28, 32, 14 и 35 или (iii) SEQ ID NO: 43, 45, 47, 12, 14 и 16.

[0041] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3,

содержащие аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 43, 45, 47, 12, 14 и 16, соответственно.

[0042] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, 22 или 41 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 22 или 41, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10 или 30 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10 или 30.

[0043] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10.

[0044] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 30 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 30.

[0045] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 41, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10.

[0046] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок дополнительно содержит константную область тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 55 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 55, и константную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 56 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 56.

[0047] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 57, 59 или 61 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 57, 59 или 61, и легкая цепь имеет аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 58, 60 или 62 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 58, 60 или 62.

[0048] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 57 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 57, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 58 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 58.

[0049] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 59 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 59, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 61 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 61.

[0050] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 61 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 61, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 62 или аминокислотную

последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 62.

[0051] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок содержит пару последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи согласно SEQ ID NO: 57/58, 59/60 или 61/62. Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок содержит пару аминокислотных последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи согласно SEQ ID NO: 61 / 62.

[0052] Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 содержит (i) IL2 или его фрагмент и (ii) рецептор IL2 альфа (IL2R α) или его фрагмент.

[0053] Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 может включать домен IL2 дикого типа или вариант, который слит с IL2-связывающим доменом IL-2R α , необязательно через линкер. IL2-связывающий домен IL-2R α может быть N-концевым или C-концевым по отношению к домену IL2 дикого типа или варианту. Согласно некоторым вариантам осуществления IL2-связывающий домен IL-2R α является N-концевым по отношению к домену IL2 дикого типа или варианту.

[0054] Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 54.

[0055] В эукариотических клетках человеческий IL2 синтезируется в виде полипептида-предшественника, состоящего из 153 аминокислот, из которых 20 аминокислот удаляются для образования зрелого секретируемого IL2 (Taniguchi et al., 1983, *Nature* 302(5906):305-10). Зрелый человеческий IL2 имеет следующую аминокислотную последовательность:

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
WITFCQSIISTLT (SEQ ID NO: 75)

[0056] Согласно некоторым вариантам осуществления фрагменты IL2 могут быть направлены на IL2R α , например, они имеют одну или несколько аминокислотных замен в домене IL2, которые позволяют им предпочтительно связываться с IL-2R α по сравнению с IL-2R β . Согласно некоторым вариантам осуществления фрагменты IL2 не направлены на CD122, например, они не имеют аминокислотных замен в домене IL2, которые позволяют им предпочтительно связываться с IL-2R β по сравнению с IL-2R α .

[0057] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок согласно настоящему изобретению имеет одну или несколько аминокислотных замен в домене IL2, которые снижают связывание с IL-2R β . Например, согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 может иметь от до 50-кратно (и согласно некоторым вариантам осуществления до 100-кратно) до 1000-кратно ослабленное связывание с человеческим IL-2R β по сравнению с человеческим IL2 дикого типа. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 со сниженным связыванием с IL-2R β может сохранять его аффинность в отношении IL-2R α или иметь сниженное связывание с IL-2R α . Например, согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 может иметь до 50-кратно ослабленное связывание с IL2-R α человека по сравнению с человеческим IL2 дикого типа. Согласно одному варианту осуществления домен IL2 содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают аффинность в отношении IL-2R β и сохраняют аффинность в отношении IL2-R α . Примером аминокислотной замены является N88D. Другими аминокислотными заменами, которые снижают или устраняют аффинность IL2 в отношении IL-2R β , являются D20T, N88R, N88D или Q126D (см., например, публикацию патента США № US 2007/0036752).

[0058] Согласно некоторым вариантам осуществления домен IL2 содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают аффинность в отношении IL2-R α и сохраняют или в меньшей степени снижают аффинность в отношении IL-2R β , что приводит к CD122-направленным фрагментам IL2. Иллюстративными доменами IL2, направленными на CD122, являются домены, содержащие замены как H16A, так и F42A. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 содержит аминокислотную последовательность человеческого IL2 с заменами H16A и F42A.

[0059] Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 содержит аминокислотную замену, которая устраняет сайт O-гликозилирования IL2 в положении, соответствующем остатку 3 человеческого IL2. Примерами аминокислотных замен в T3 являются T3A, T3G, T3Q, T3E, T3N, T3D, T3R, T3K и T3P. Согласно конкретному варианту осуществления замена представляет собой T3A.

[0060] Согласно некоторым вариантам осуществления домен IL2 может включать замену в положении C125. C125 может быть заменен на S, V или A для уменьшения агрегации белка, как описано в патенте США № 4518584. Согласно некоторым вариантам осуществления домен IL2 может включать замену метионина 104 нейтральной аминокислотой, такой как аланин, как описано в патенте США № 5206344. Согласно некоторым вариантам

осуществления домен IL2 может быть лишен N-концевого аланинового остатка IL2, что приводит к образованию дез-A1 IL2.

[0061] Согласно некоторым вариантам осуществления домен IL2 может содержать аминокислотные делеции и/или замены, выбранные из дез-A1 M104A IL2, дез-A1 M104A C125S IL2, M104A IL2, M104A C125A IL2, дез-A1 M104A C125A IL2 и M104A C125S IL2, помимо других вариантов, которые изменяют связывание IL2 с его рецептором. Эти и другие мутанты можно найти в патенте США № 5116943 и в Weiger *et al.*, 1989, Eur J Biochem 180:295-300.

[0062] Согласно некоторым вариантам осуществления домен IL2 может включать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, приблизительно по меньшей мере 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичности последовательности со зрелым человеческим IL2.

[0063] . Согласно некоторым вариантам осуществления IL2 или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 53.

[0064] Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 дополнительно включает IL2-связывающий домен IL-2R α (называемый «доменом IL2-R α »), например, внеклеточный домен IL-2R α , слитый на C-конце или N-конце IL2, необязательно через линкер. Согласно некоторым вариантам осуществления IL2R α или его фрагмент представляет собой человеческий IL2R α (hIL2R α) или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления домен IL2-R α может включать внеклеточный домен зрелого человеческого IL-2R α (соответствующий аминокислотам 22-272 человеческого IL-R α). Согласно некоторым вариантам осуществления домен IL2-R α может включать IL2-связывающую часть внеклеточного домена IL-2R α человека (содержащую два домена «sushi», которые соответствуют аминокислотам 22-186 человеческого IL-2R α). Согласно некоторым вариантам осуществления домен IL2-R α может включать альтернативную IL2-связывающую часть

внутриклеточного домена IL-2R α человека, которая соответствует аминокислотам 22-240 человеческого IL-2R α .

[0065] Согласно некоторым вариантам осуществления домен IL2-R α или IL2-связывающая часть внутриклеточного домена IL-2R α имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичности последовательности с любой из вышеприведенных последовательностей, *т.е.* с любой из аминокислот 22-186 IL-2R α , аминокислот 22-240 IL-2R α или аминокислот 22-272 IL-2R α , или любой их IL-2-связывающей частью.

[0066] Согласно некоторым вариантам осуществления домен IL2-R α или IL2-связывающая часть может содержать или состоять из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичности последовательности с IL2-связывающей частью человеческого IL-2R α , где необязательно связывающая часть имеет аминокислотную последовательность из (а) по меньшей мере 160 аминокислот, по меньшей мере 161 аминокислот, по меньшей мере 162 аминокислот, по меньшей мере 164 аминокислот или по меньшей мере 165 аминокислот, и/или (b) до 251, до 240, до 230, до 220, до 210, до 200, до 190, до 180 или до 170 аминокислот внутриклеточного домена человеческого IL2-R α . Согласно конкретным вариантам осуществления часть человеческого IL-2R α связывается любым из (а) и (b) в предыдущем предложении, например, по меньшей мере 160 и до 180 аминокислот из человеческого IL-2R α , по меньшей мере 162 и до 200 аминокислот из человеческого IL-2R α , по меньшей мере 160 и до 220 аминокислот из человеческого IL-2R α , по меньшей мере 164 и до 190 аминокислот из человеческого IL-2R α , и т.д. и т.п.

[0067] Согласно некоторым вариантам осуществления домен IL2-R α или IL2-связывающая часть содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотами 22-186, с дополнительными до 5 аминокислот, до 10

аминокислот, до 15 аминокислот, до 20 аминокислот, до 30 аминокислот или до 40 аминокислот на С-конце аминокислотного остатка 186 в IL2-R α или без них.

[0068] Согласно некоторым вариантам осуществления домен IL2-R α или внеклеточный домен IL-2R α имеет по меньшей мере на одно О-гликозилирование и/или N-гликозилирование меньше по сравнению с внеклеточным доменом нативного IL-2R α , например, посредством замены одной или нескольких из аминокислоты N49, аминокислоты N68, аминокислоты T74, аминокислоты T85, аминокислоты T197, аминокислоты T203, аминокислоты T208 и аминокислоты T216. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько замен представляют собой замену аспарагина на аминокислоту, выбранную из аланина, треонина, серина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько замен представляют собой замену треонина на аминокислоту, выбранную из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько замен относятся к аминокислоте S50 (*например*, S50P), аминокислоте S51 (*например*, S51R, S51N, S51D, S51C, S51Q, S51E, S51G, S51H, S51I, S51L, S51K, S51M, S51F, S51P, S51W, S51Y или S51V), аминокислоте T69 (*например*, T69P), аминокислоте T70 (*например*, T70R, T70N, T70D, T70C, T70Q, T70E, T70G, T70H, T70I, T70L, T70K, T70M, T70F, T70P, T70W, T70Y или T70V), аминокислоте C192 (*например*, C192R, C192N, C192D, C192Q, C192E, C192G, C192H, C192I, C192L, C192K, C192M, C192F, C192P, C192W, C192Y или C192V) или любой их комбинации.

[0069] Согласно некоторым вариантам осуществления IL2R α или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 51 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 51.

[0070] Слитый белок может включать один или несколько линкеров (например, пептидный линкер или непептидный линкер), соединяющих различные компоненты молекулы. Согласно некоторым вариантам осуществления два или более компонента слитого белка соединены друг с другом пептидным линкером. В качестве примера и без ограничения, можно использовать линкеры для соединения (а) фрагмента IL2 и антигенсвязывающего

фрагмента, (b) различных доменов в фрагменте IL2 (например, домен IL2 и домен IL-R α) или (c) различных доменов в антигенсвязывающем фрагменте (например, различных компоненты анти-PD-1 антитела).

[0071] Пептидный линкер может составлять в диапазоне от 2 аминокислот до 60 или более аминокислот, и согласно некоторым вариантам осуществления пептидный линкер может составлять в диапазоне от 3 аминокислот до 50 аминокислот, от 4 до 30 аминокислот, от 5 до 25 аминокислот, от 10 до 25 аминокислот, от 10 аминокислот до 60 аминокислот, от 12 аминокислот до 20 аминокислот, от 20 аминокислот до 50 аминокислот или от 25 аминокислот до 35 аминокислот в длину.

[0072] Согласно некоторым вариантам осуществления пептидный линкер составляет по меньшей мере 5 аминокислот, по меньшей мере 6 аминокислот или по меньшей мере 7 аминокислот в длину и необязательно составляет до 30 аминокислот, до 40 аминокислот, до 50 аминокислот или до 60 аминокислот в длину. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер составляет в диапазоне от 5 аминокислот до 50 аминокислот в длину, *например*, в диапазоне от 5 до 50, от 5 до 45, от 5 до 40, от 5 до 35, от 5 до 30, от 5 до 25 или от 5 до 20 аминокислот в длину. Согласно другим вариантам осуществления вышеуказанного, линкер составляет в диапазоне от 6 аминокислот до 50 аминокислот в длину, *например*, в диапазоне от 6 до 50, от 6 до 45, от 6 до 40, от 6 до 35, от 6 до 30, от 6 до 25 или от 6 до 20 аминокислот в длину. Согласно другим вариантам осуществления вышеуказанного, линкер составляет в диапазоне от 7 аминокислот до 50 аминокислот в длину, *например*, в диапазоне от 7 до 50, от 7 до 45, от 7 до 40, от 7 до 35, от 7 до 30, от 7 до 25 или от 7 до 20 аминокислот в длину.

[0073] Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит полярные (например, серин (S)) или заряженные (например, лизин (K)) остатки. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер представляет собой гибкий линкер, например, содержащий один или несколько остатков глицина (G) или серина (S).

[0074] Примеры гибких линкеров, которые можно использовать в слитом белке согласно настоящему изобретению, включают те, которые раскрыты в Chen *et al.*, 2013, Adv Drug Deliv Rev. 65(10): 1357-1369 и Klein *et al.*, 2014, Protein Engineering, Design & Selection 27(10): 325-330. Особенно полезные гибкие линкеры представляют собой или содержат повторы глицинов и серинов, например, мономер или мультимер GnS или SGn, где n представляет собой целое число от 1 до 10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8., 9 или 10. Согласно

одному варианту осуществления линкер представляет собой или содержит мономер или мультимер повтора G4S (GGGGS, SEQ ID NO: 67), например (GGGGS)_n.

[0075] Полиглициновые линкеры можно подходящим образом использовать в слитом белке согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления пептидный линкер содержит два последовательных глицина (2Gly), три последовательных глицина (3Gly), четыре последовательных глицина (4Gly) (SEQ ID NO:68), пять последовательных глицинов (5Gly) (SEQ ID NO:69), шесть последовательных глицинов (6Gly) (SEQ ID NO:70), семь последовательных глицинов (7Gly) (SEQ ID NO:71), восемь последовательных глицинов (8Gly) (SEQ ID NO:72) или девять последовательных глицинов (9Gly) (SEQ ID NO: 73).

[0076] Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 и антигенсвязывающий фрагмент соединены через линкер. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность одного или нескольких повторов GGGGS (SEQ ID NO: 67). Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 50 или 52. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 связан с С-концом антигенсвязывающего фрагмента через пептидный линкер. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 50.

[0077] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему: (i) первый полипептид, содержащий вариабельную область легкой цепи (LCVR) человеческого антитела, которое специфически связывается с PD-1 человека, и (ii) второй полипептид, который содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) антитела, которое специфически связывается с PD-1 человека, и (b) фрагмент IL2.

[0078] Согласно некоторым вариантам осуществления HCVR содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и LCVR содержит три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где: HCDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, 24 или 43, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, 26 или 45, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8, 28 или 47, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12 или 32, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 16 или 35.

[0079] Согласно некоторым вариантам осуществления HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат соответствующие аминокислотные последовательности согласно (i) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 и 16, (ii) SEQ ID NO: 24, 26, 28, 32, 14 и 35 или (iii) SEQ ID NO: 43, 45, 47, 12, 14 и 16.

[0080] Согласно некоторым вариантам осуществления HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат соответствующие аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 43, 45, 47, 12, 14 и 16.

[0081] Согласно некоторым вариантам осуществления HCVR содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, 22 или 41 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 22 или 41. Согласно некоторым вариантам осуществления LCVR содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10 или 30 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10 или 30.

[0082] Согласно некоторым вариантам осуществления HCVR содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, и LCVR содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10.

[0083] Согласно некоторым вариантам осуществления HCVR содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, и LCVR содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 30 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 30.

[0084] Согласно некоторым вариантам осуществления HCVR содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 41, и LCVR содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10.

[0085] Согласно некоторым вариантам осуществления HCVR и LCVR содержат соответствующие аминокислотные последовательности согласно (i) SEQ ID NO: 2 и 10, (ii) SEQ ID NO: 22 и 30 или (iii) SEQ ID NO: 41 и 10. Согласно некоторым вариантам осуществления HCVR и LCVR содержат соответствующие аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 41 и 10.

[0086] Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид дополнительно содержит константную область легкой цепи, связанную с LCVR. Согласно некоторым вариантам осуществления константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 56 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 56.

[0087] Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, расположенную между HCVR и фрагментом IL2. Согласно некоторым вариантам осуществления константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 55.

[0088] Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность легкой цепи согласно SEQ ID NO: 58, 60 или 62, или аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 58, 60 или 62.

[0089] Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 57, 59 или 61, или аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 57, 59 или 61.

[0090] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок содержит пару последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи согласно SEQ ID NO: 57/58, 59/60 или 61/62. Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок содержит пару аминокислотных последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи согласно SEQ ID NO: 61 / 62.

[0091] Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 соединен с С-концом константной области тяжелой цепи через линкер. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность одного или нескольких

повторов GGGGS (SEQ ID NO: 67). Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 50 или 52. Согласно одному варианту осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 50.

[0092] Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 содержит (i) IL2 или его фрагмент, и (ii) рецептор IL2 альфа (IL2R α) или его фрагмент.

[0093] Согласно некоторым вариантам осуществления IL2 или его фрагмент представляет собой человеческий IL2 (hIL2) или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления IL2 или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 53.

[0094] Согласно некоторым вариантам осуществления IL2R α или его фрагмент представляет собой человеческий IL2R α (hIL2R α) или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления IL2R α или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 51 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 51.

[0095] Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент IL2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 54.

[0096] Согласно некоторым вариантам осуществления IL2 или его фрагмент связан с С-концом IL2R α или его фрагмента через линкер. Согласно одному варианту осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52.

[0097] Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 58, 60 или 62 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 58, 60 или 62. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 63, 64 или 65 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 63, 64 или 65.

[0098] Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 58 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 58, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 64 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 64.

[0099] Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 60 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 60, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 63 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 63.

[0100] Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 62 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 62, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 65 или аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 65.

[0101] Настоящее изобретение также относится к димерному слитому белку, образованному слитым белком, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления димерный слитый белок представляет собой гомодимерный слитый белок, где каждый составляющий мономер содержит слитый белок, описанный в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления каждый составляющий мономер состоит из слитого белка, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления мономеры димерного слитого белка димеризуются через константную область тяжелой цепи каждого мономера.

Биологическая активность

[0102] Слитые белки согласно настоящему изобретению проявляет ослабленное связывание с $IL2R\alpha$, $IL2R\beta$ и $IL2R\gamma$. Согласно некоторым вариантам осуществления слитые белки не конкурируют с REGN2810, пембролизумабом или ниволумабом. Согласно некоторым вариантам осуществления слитые белки проявляют сниженную активность в активации тримерных рецепторных комплексов человеческого $IL2R\alpha/\beta/\gamma$ и димерных рецепторных комплексов $IL2R\beta/\gamma$ по сравнению с $IL2$ и повышенную активность в активации тримерных рецепторных комплексов человеческого $IL2R\alpha/\beta/\gamma$ и димерных рецепторных комплексов $IL2R\beta/\gamma$ по сравнению с ненаправленной конструкцией $IL2R\alpha-IL2$. Согласно некоторым вариантам осуществления слитые белки проявляют повышенную активность в стимуляции активируемых антигеном Т-клеток, как измерено по уровню высвобождения $IFN-\gamma$, по сравнению с человеческим $IL2$ дикого типа. Согласно некоторым вариантам осуществления слитые белки продемонстрировали повышенную противоопухолевую эффективность по сравнению с $IL2$ отдельно или в комбинации с анти-PD-1 антителом.

Нуклеиновые кислоты и клетки-хозяева

[0103] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте или нуклеиновым кислотам, содержащим одну или несколько полинуклеотидных последовательностей, кодирующих слитый белок согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок кодируется одной нуклеиновой кислотой. Согласно другим вариантам осуществления, например, в случае гетеродимерной молекулы или молекулы, содержащей анти-PD-1 антитело, состоящей из более чем одной полипептидной цепи, слитый белок может кодироваться множеством (например, двумя, тремя, четырьмя или более) нуклеиновых кислот.

[0104] Одна нуклеиновая кислота может кодировать слитый белок, который содержит одну полипептидную цепь, слитый белок, который содержит две или более полипептидных цепей, или часть слитого белка, которая содержит более двух полипептидных цепей (например, одна нуклеиновая кислота может кодировать две полипептидные цепи слитого белка, содержащего три, четыре или более полипептидных цепей, или три полипептидные цепи слитого белка, содержащего четыре или более полипептидных цепей). Для отдельного контроля экспрессии открытые рамки считывания, кодирующие две или более полипептидные цепи, могут находиться под контролем отдельных регуляторных элементов

транскрипции (например, промоторов и/или энхансеров). Открытые рамки считывания, кодирующие два или более полипептидов, также могут контролироваться одними и теми же регуляторными элементами транскрипции и быть разделены последовательностями участка внутренней посадки рибосомы (IRES), что позволяет осуществлять трансляцию в отдельные полипептиды.

[0105] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок, содержащий две или более полипептидные цепи, кодируется двумя или более нуклеиновыми кислотами. Число нуклеиновых кислот, кодирующих слитый белок, может быть равно или меньше количества полипептидных цепей в слитом белке (например, когда более чем одна полипептидная цепь кодируется одной нуклеиновой кислотой).

[0106] Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению могут представлять собой ДНК или РНК (например, мРНК).

[0107] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам и векторам, содержащим нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в одном векторе или в отдельных векторах, присутствующих в одной и той же клетке-хозяине или в отдельной клетке-хозяине, как более подробно описано ниже.

[0108] Согласно некоторым вариантам осуществления клетка-хозяин экспрессирует первый вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антитела, как указано в настоящем документе, и второй вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR антитела, как указано в настоящем документе.

[0109] Согласно некоторым вариантам осуществления клетка-хозяин экспрессирует первый вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, которая кодирует первый полипептид слитого белка, как указано в настоящем документе, и второй вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, которая кодирует второй полипептид слитого белка, как указано в настоящем документе.

[0110] Настоящее изобретение относится к векторам, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие слитый белок или компонент слитого белка, описанный в настоящем документе, например, одну или две полипептидные цепи полуантитела. Векторы включают без ограничения вирус, плазмиду, космиду, фаг лямбда или искусственную хромосому дрожжей (YAC).

[0111] Могут быть использованы многочисленные векторные системы. Например, в одном классе векторов используются элементы ДНК, которые происходят из вирусов животных, таких как, например, вирус папилломы крупного рогатого скота, полиомавирус, аденовирус, вирус коровьей оспы, бакуловирус, ретровирусы (вирус саркомы Рауса, MMTV или MOMLV) или вирус SV40. В другом классе векторов используются элементы РНК, происходящие из РНК-вирусов, таких как вирус леса Семлики, вирус восточного лошадиного энцефалита и флавивирусы.

[0112] Кроме того, клетки, которые стабильно интегрировали ДНК в свои хромосомы, можно отбирать путем введения одного или нескольких маркеров, которые позволяют отбирать трансфицированные клетки-хозяева. Маркер может обеспечивать, например, прототрофность ауксотрофному хозяину, устойчивость к биоцидам (например, антибиотикам) или устойчивость к тяжелым металлам, таким как медь и т.п. Ген селективируемого маркера может быть либо непосредственно связан с последовательностями ДНК, подлежащими экспрессии, либо введен в ту же клетку путем совместной трансформации. Дополнительные элементы также могут быть необходимы для оптимального синтеза мРНК. Эти элементы могут включать сигналы сплайсинга, а также промоторы транскрипции, энхансеры и сигналы терминации.

[0113] После того как вектор экспрессии или последовательность ДНК, содержащая конструкции, получены для экспрессии, векторы экспрессии можно трансфицировать или ввести в соответствующую клетку-хозяина. Различные методики можно применять для достижения этого, такие как, например, слияние протопластов, осаждение фосфатом кальция, электропорация, ретровирусная трансдукция, вирусная трансфекция, генная пушка, трансфекция на основе липидов или другие традиционные методики. Способы и условия культивирования полученных трансфицированных клеток и выделения экспрессированных полипептидов известны специалистам в данной области техники и могут варьироваться или оптимизироваться в зависимости от конкретного вектора экспрессии и используемой клетки-хозяина млекопитающего, на основании настоящего описания.

[0114] Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, содержащим нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту осуществления клетки-хозяева генетически модифицированы таким образом, чтобы они содержали одну или несколько нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления клетки-хозяева генетически модифицированы с

использованием кассеты экспрессии. Фраза «кассета экспрессии» относится к нуклеотидным последовательностям, которые способны влиять на экспрессию гена у хозяев, совместимых с такими последовательностями. Такие кассеты могут включать промотор, открытую рамку считывания с интронами или без них и сигнал терминации. Также можно использовать дополнительные факторы, необходимые или полезные для осуществления экспрессии, такие как, например, индуцируемый промотор.

[0115] Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, содержащим векторы, описанные в настоящем документе.

[0116] Клетка может представлять собой без ограничения эукариотическую клетку, бактериальную клетку, клетку насекомого или клетку человека. Подходящие эукариотические клетки включают без ограничения клетки Vero, клетки HeLa, клетки COS, клетки CHO, клетки HEK293, клетки ВНК и клетки MDCKII. Подходящие клетки насекомых включают без ограничения клетки Sf9.

Фармацевтические композиции

[0117] Слитый белок или димерный слитый белок, как раскрыто в настоящем документе, может быть в форме композиций, содержащих слитый белок (например, димерный слитый белок) и один или несколько носителей, вспомогательных веществ и/или разбавителей.

[0118] Композиции могут быть составлены для конкретных применений, например, для ветеринарных применений или фармацевтических применений у людей. Форма композиции (например, сухой порошок, жидкий состав и т.д.) и используемые вспомогательные вещества, разбавители и/или носители будут зависеть от предполагаемого использования слитого белка или димерного слитого белка и от способа введения для терапевтического применения.

[0119] Для терапевтических применений композиции могут быть представлены как часть стерильной фармацевтической композиции, которая включает фармацевтически приемлемый носитель. Эта композиция может находиться в любой подходящей форме (в зависимости от желаемого способа ее введения пациенту). Фармацевтическую композицию можно вводить пациенту различными способами, как например, перорально, чрескожно, подкожно, интраназально, внутривенно, внутримышечно, внутриопухолево, интратекально, местно или локально. Наиболее подходящий путь введения в каждом конкретном случае будет зависеть от конкретного антигена, субъекта, природы и тяжести заболевания и физического

состояния субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно или подкожно.

[0120] Фармацевтические композиции могут быть удобным образом представлены в стандартных дозированных формах, содержащих заданное количество слитого белка согласно настоящему изобретению на дозу. Количество слитого белка, включаемое в стандартную дозу, будет зависеть от заболевания, подлежащего лечению, а также от других факторов, которые хорошо известны в данной области техники. Такие стандартные дозы могут быть в форме лиофилизированного сухого порошка, содержащего количество слитого белка, подходящее для однократного введения, или в форме жидкости. Стандартные дозированные формы в форме сухого порошка могут быть упакованы в набор со шприцем, подходящим количеством разбавителя и/или других компонентов, полезных для введения. Стандартные дозы в жидкой форме можно удобно поставлять в виде шприца, предварительно наполненного количеством слитого белка, подходящим для однократного введения. Фармацевтические композиции также могут поставляться нерасфасованными, содержащими количества слитого белка, подходящие для многократного введения.

[0121] Фармацевтические композиции могут быть получены для хранения в виде лиофилизированных составов или водных растворов путем смешивания слитого белка, имеющего желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами, обычно используемыми в данной области техники (все упоминаются в настоящем документе как «носители»), то есть буферными агентами, стабилизирующими агентами, консервантами, изотонификаторами, неионогенными детергентами, антиоксидантами и другими различными добавками (см., Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (Osol, ed. 1980)). Такие добавки должны быть нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях.

Способы применения

[0122] Слитые белки согласно настоящему изобретению полезны для лечения болезненных состояний, при которых стимуляция иммунной системы хозяина полезна, в частности состояний, когда желателен усиленный клеточный иммунный ответ. Они могут включать болезненные состояния, при которых иммунный ответ хозяина является недостаточным или дефицитным. Болезненные состояния, при которых можно вводить слитый белок согласно настоящему изобретению, содержат, например, опухоль или инфекцию, при

которой клеточный иммунный ответ будет критическим механизмом для специфического иммунитета. Конкретные болезненные состояния, для которых можно применять слитый белок согласно настоящему изобретению, включают рак, например, почечно-клеточный рак или меланому, иммунный дефицит, особенно у ВИЧ-положительных пациентов, пациентов с иммуносупрессией, хронической инфекцией и т.п. Слитый белок согласно настоящему изобретению можно вводить как таковой или в любой подходящей фармацевтической композиции.

[0123] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к слитому белку согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства. Согласно другим аспектам настоящее изобретение относится к слитому белку согласно настоящему изобретению для применения для лечения заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к слитому белку согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к слитому белку согласно настоящему изобретению для применения для лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к слитому белку для применения в способе лечения субъекта, страдающего заболеванием, предусматривающем введение субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное заболевание. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание представляет собой рак.

[0124] Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, например, противоракового средства, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. Согласно другим вариантам осуществления настоящее изобретение относится к слитому белку для применения для стимуляции иммунной системы. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к слитому белку для применения в способе стимуляции иммунной системы у субъекта, предусматривающем введение субъекту эффективного количества слитого белка для стимуляции иммунной системы.

[0125] «Стимуляция иммунной системы» согласно любому из вариантов осуществления в настоящем документе может включать одно или несколько из общего

повышения иммунной функции, повышения функции Т-клеток, повышения функции В-клеток, восстановления функции лимфоцитов, увеличения в экспрессии рецепторов IL-2, повышения чувствительности Т-клеток, повышения активности естественных клеток-киллеров или активности лимфокинактивированных клеток-киллеров (ЛАК) и т.п.

[0126] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к применению слитого белка согласно настоящему изобретению для производства или получения лекарственного средства для лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом. Согласно одному варианту осуществления лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения заболевания, предусматривающем введение субъекту, страдающему заболеванием, терапевтически эффективного количества лекарственного средства. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное заболевание. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание представляет собой рак. Согласно одному такому варианту осуществления способ дополнительно предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, например, противоракового средства, если заболеванием, подлежащим лечению, является рак. Согласно другому варианту осуществления лекарственное средство предназначено для стимуляции иммунной системы. Согласно другому варианту осуществления лекарственное средство предназначено для применения в способе стимуляции иммунной системы у субъекта, предусматривающем введение субъекту количества лекарственного средства, эффективного для стимуляции иммунной системы.

[0127] Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное заболевание, предпочтительно рак. Неограничивающие примеры раковых заболеваний включают рак мочевого пузыря, рак головного мозга, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак легких, рак молочной железы, рак яичников, рак матки, рак шейки матки, рак эндометрия, рак пищевода, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак прямой кишки, рак желудка, рак предстательной железы, рак крови, рак кожи, плоскоклеточный рак, рак костей и рак почки. Другие нарушения клеточной пролиферации, которые можно лечить с применением слитого белка согласно настоящему изобретению, включают без ограничения новообразования, расположенные в: брюшной полости, костях, молочной железе, пищеварительной системе, печени, поджелудочной железе, брюшине, эндокринных железах (надпочечниках, паращитовидной железе, гипофизе, яичке,

яичнике, тимусе, щитовидной железе), глазе, голове и шее, нервной системе (центральной и периферической), лимфатической системе, почечной лоханке, коже, мягких тканях, селезенке, грудном отделе и мочеполовой системе. Также включены предраковые состояния или поражения и метастазы рака. Согласно некоторым вариантам осуществления рак выбран из группы, состоящей из почечно-клеточного рака, рака кожи, рака легких, колоректального рака, рака молочной железы, рака головного мозга, рака головы и шеи. Подобным образом, другие нарушения клеточной пролиферации также можно лечить с помощью слитого белка согласно настоящему изобретению. Примеры таких нарушений клеточной пролиферации включают без ограничения: гипергаммаглобулинемию, лимфопролиферативные нарушения, парапротеинемии, пурпuru, саркоидоз, синдром Сезари, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь Гоше, гистиоцитоз и любое другое заболевание клеточной пролиферации, кроме неоплазии, локализованное в органе/системе, как указано выше. Согласно другому варианту осуществления заболевание связано с аутоиммунитетом, отторжением трансплантата, посттравматическими иммунными реакциями и инфекционными заболеваниями (например, ВИЧ). Более конкретно, слитый белок можно применять для устранения клеток, участвующих в нарушениях, опосредованных иммунными клетками, включая лимфому, аутоиммунитет, отторжение трансплантата, реакция «трансплантат против хозяина», ишемия и инсульт. Специалисту в данной области техники понятно, что во многих случаях слитый белок может не обеспечить излечение, а может принести лишь частичную пользу. Согласно некоторым вариантам осуществления физиологическое изменение, приносящее некоторую пользу, также считается терапевтически полезным. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления количество слитого белка, которое обеспечивает физиологическое изменение, считается «эффективным количеством» или «терапевтически эффективным количеством». Субъектом или пациентом, нуждающимся в лечении, обычно является млекопитающее, более конкретно, человек.

[0128] Различные схемы дозирования, включая без ограничения однократное или многократное введение в различные моменты времени, болюсное введение и импульсную инфузию, охватываются настоящим изобретением.

[0129] Слитый белок согласно настоящему изобретению в общем применяют в количестве, эффективном для достижения намеченной цели. Для применения для лечения или предотвращения болезненного состояния слитый белок согласно настоящему изобретению или

его фармацевтические композиции вводят или применяют в терапевтически эффективном количестве.

[0130] Одна иллюстративная суточная доза может варьироваться в диапазоне от приблизительно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более. При повторных введениях в течение нескольких дней или более, в зависимости от состояния, лечение обычно продолжают до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Одна иллюстративная доза слитого белка может находиться в диапазоне от приблизительно 0,005 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. В других неограничивающих примерах доза может также содержать приблизительно 1 мкг/кг/массы тела, приблизительно 5 мкг/кг/массы тела, приблизительно 10 мкг/кг/массы тела, приблизительно 50 мкг/кг/массы тела, приблизительно 100 мкг/кг массы тела, приблизительно 200 мкг/кг/массы тела, приблизительно 350 мкг/кг массы тела, приблизительно 500 мкг/кг массы тела, приблизительно 1 мг/кг массы тела, приблизительно 5 мг/кг массы тела, приблизительно 10 мг/кг массы тела, приблизительно 50 мг/кг массы тела или приблизительно 100 мг/кг массы тела или более на одно введение и любой диапазон, определяемый этим. В неограничивающих примерах диапазона, определяемого числами, перечисленными в настоящем документе, диапазон от приблизительно 5 мг/кг массы тела до приблизительно 50 мг/кг массы тела, от приблизительно 5 мкг/кг массы тела до приблизительно 100 мг/кг массы тела, и т.д., можно вводить, исходя из количества, описанного выше. Таким образом, одну или несколько доз приблизительно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 5,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любую их комбинацию) можно вводить пациенту. Такие дозы можно вводить с перерывами, например, каждую неделю или каждые три недели (например, таким образом, чтобы пациент получал от приблизительно двух до приблизительно двадцати или, например, приблизительно шести доз слитого белка). Может быть введена первоначальная более высокая нагрузочная доза, за которой следуют одна или несколько более низких доз. Однако могут быть полезны и другие схемы дозирования. Ход этой терапии легко контролировать с помощью обычных методов и анализов.

[0131] Терапевтически эффективная доза слитого белка, описанного в настоящем документе, в общем обеспечивает терапевтический эффект, не вызывая существенной токсичности. Токсичность и терапевтическую эффективность слитого белка можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур на клеточной культуре или на экспериментальных животных. Анализы клеточных культур и исследования на животных можно использовать для определения LD50 (доза, смертельная для 50% населения) и ED50

(доза, терапевтически эффективная для 50% населения). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс, который можно выразить как соотношение LD50/ED50. Предпочтителен слитый белок, который демонстрирует высокие терапевтические индексы. Согласно одному варианту осуществления слитый белок согласно настоящему изобретению демонстрирует высокий терапевтический индекс. Данные, полученные в результате анализа клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы при составлении диапазона доз, подходящих для применения у людей. Доза предпочтительно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, включающих ED50, с небольшой токсичностью или без нее. Доза может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от множества факторов, например, используемой лекарственной формы, используемого пути введения, состояния субъекта и т.п. (См., например, *например*, Fingl *et al.*, 1975, In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p. 1, включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0132] Из-за более низкой токсичности слитый белок согласно настоящему изобретению может иметь более высокие максимальные терапевтические дозы, чем IL2 дикого типа.

[0133] Слитый белок согласно настоящему изобретению можно вводить в комбинации с одним или несколькими другими средствами или терапиями. Например, слитый белок согласно настоящему изобретению можно вводить одновременно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством или терапией. Термин «терапевтическое средство» охватывает любой агент, вводимый для лечения симптома или заболевания у субъекта, нуждающегося в таком лечении. Такое дополнительное терапевтическое средство может содержать любые активные ингредиенты, подходящие для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно те, которые обладают дополняющей активностью и не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой иммуномодулирующий агент, цитостатический агент, ингибитор клеточной адгезии, цитотоксический агент, активатор клеточного апоптоза или агент, повышающий чувствительность клеток к индукторам апоптоза. Согласно конкретному варианту осуществления дополнительное терапевтическое средство 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.

[0134] Согласно определенным вариантам осуществления второе терапевтическое средство или терапия выбраны из: лучевой терапии, хирургического вмешательства, химиотерапевтического агента, онколитического вируса, противораковой вакцины, ингибитора PD-1, ингибитора B7-H3, ингибитора B7-H4, ингибитора гена активации лимфоцитов 3 (LAG3), ингибитора белка 3 мембраны Т-клеток (TIM3), ингибитора галектина 9 (GAL9), ингибитора иммуноглобулиновый V-домен (Ig)-содержащего супрессора активации Т-клеток (VISTA), ингибитора киллерного иммуноглобулин-подобного рецептора (KIR), ингибитора аттенюатора В- и Т-лимфоцитов (BTLA), ингибитора иммунорецептора Т-клеток с доменами Ig и ITIM (TIGIT), ингибитора CTLA4, ингибитора CD38, ингибитора CD47, активатора CD28, активатора 4-1BB, агониста GITR, агониста CD40, модулятора OX40, ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ингибитора ангиопоэтина-2 (Ang2), ингибитора трансформирующего фактора роста бета (TGF β), ингибитора рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), антитела к опухолеспецифическому антигену, вакцины бациллы Кальмета-Герена, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, цитотоксина, ингибитора рецептора интерлейкин 6 (IL-6R), ингибитора рецептора интерлейкина 4 (IL-4R), ингибитора IL-10, IL-7, IL-12, IL-21, IL-15, IL-18, интерферонов I типа, конъюгата антитело-лекарственное средство, противовоспалительного лекарственного средства и их комбинаций.

[0135] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок согласно настоящему изобретению можно использовать в комбинации с анти-PD-1 антителом, где антитело не конкурирует перекрестно с слитым белком за связывание с PD-1 человека.

[0136] Такие другие агенты подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для намеченной цели. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества используемого слитого белка, типа нарушения или лечения и других факторов, раскрытых выше. Слитый белок обычно используют в тех же дозах и теми же путями введения, как описано в настоящем документе, или приблизительно от 1 до 99% доз, описанных в настоящем документе, или в любой дозе и любым путем, который эмпирически/клинически определен как подходящий.

[0137] Такие комбинированные способы лечения, отмеченные выше, охватывают комбинированное введение (когда два или более терапевтических средства включены в одну и

ту же или отдельные композиции) и раздельное введение, и в этом случае введение слитого белка согласно настоящему изобретению может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адъюванта. Слитый белок согласно настоящему изобретению также можно использовать в комбинации с лучевой терапией и/или хирургическим вмешательством.

Дополнительные определения

[0138] В целях понимания подробного описания композиций и способов согласно настоящему изобретению, предоставлено несколько четких определений (в дополнение к тем, которые раскрыты в других местах настоящего документа), чтобы облегчить однозначное раскрытие различных аспектов настоящего изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее раскрытие.

[0139] В контексте настоящего изобретения термин «слитый белок» или «слитый полипептид» означает белок, содержащий две или более полипептидные последовательности, которые соединены вместе ковалентно или нековалентно. Например, слитые полипептиды, охватываемые настоящим изобретением, могут включать продукты трансляции химерной генной конструкции, которая соединяет последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие первый полипептид, с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй полипептид, с образованием одной открытой рамки считывания. Альтернативно, слитый белок может кодироваться двумя или более генными конструкциями на отдельных векторах, которые могут совместно экспрессироваться в клетке-хозяине. Другими словами, «слитый полипептид» или «слитый белок» представляет собой рекомбинантный белок, состоящий из двух или более белков, которые соединены пептидной связью или посредством нескольких пептидов. Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок может также содержать пептидный линкер между двумя доменами.

[0140] В контексте настоящего изобретения термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может прерываться неаминокислотами. Эти термины также охватывают модифицированный аминокислотный полимер, например,

образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидирование, ацетилирование, фосфорилирование, пегилирование или любые другие манипуляции, такие как конъюгация с меченым компонентом. В контексте настоящего изобретения термин «аминокислота» включает природные и/или неприродные или синтетические аминокислоты, включая глицин и оба оптических изомера D или L, а также аналоги аминокислот и пептидомиметики.

[0141] В контексте настоящего изобретения форма ПЛ-2 «дикого типа» представляет собой форму ПЛ-2, которая в остальном аналогична мутантному полипептиду ПЛ-2, за исключением того, что форма дикого типа имеет аминокислоту дикого типа в каждом аминокислотном положении мутантного полипептида ПЛ-2. Например, если мутант ПЛ-2 представляет собой полноразмерный ПЛ-2 (т.е. ПЛ-2, не слитый и не конъюгированный с какой-либо другой молекулой), форма дикого типа этого мутанта представляет собой полноразмерный нативный ПЛ-2. Если мутант ПЛ-2 представляет собой слияние ПЛ-2 и другого полипептида, кодируемого по ходу транскрипции от ПЛ-2 (например, цепи антитела), формой дикого типа этого мутанта ПЛ-2 является ПЛ-2 с аминокислотной последовательностью дикого типа, слитой с тем же полипептидом по ходу транскрипции. Более того, если мутант ПЛ-2 представляет собой усеченную форму ПЛ-2 (мутантная или модифицированная последовательность в неусеченной части ПЛ-2), то форма дикого типа этого мутанта ПЛ-2 представляет собой подобным образом усеченный ПЛ-2, имеющий последовательность дикого типа.

[0142] Слитый белок, как раскрыто в настоящем документе, может включать одну или несколько консервативных модификаций. Слитый белок с одной или несколькими консервативными модификациями может сохранять желаемые функциональные свойства, что можно проверить с помощью функциональных анализов, известных в данной области техники. В контексте настоящего изобретения термин «консервативные модификации последовательности» относится к модификациям аминокислот, которые существенно не влияют и не изменяют характеристики связывания белка, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают замены, добавления и делеции аминокислот. Модификации могут быть внесены стандартными методами, известными в данной области техники, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим подобную боковую цепь. В данной области техники определены семейства

аминокислотных остатков, имеющих подобные боковые цепи. Эти семейства включают: аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин), включая одну или несколько консервативных модификаций. Белок Cas с одной или несколькими консервативными модификациями может сохранять желаемые функциональные свойства, что можно проверить с помощью функциональных анализов, известных в данной области техники. В контексте настоящего изобретения термин «консервативные модификации последовательности» относится к модификациям аминокислот, которые существенно не влияют и не изменяют характеристики связывания белка, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают замены, добавления и делеции аминокислот. Модификации могут быть внесены стандартными методами, известными в данной области техники, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим подобную боковую цепь. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков, имеющих подобные боковые цепи. Эти семейства включают: аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

[0143] В контексте настоящего изобретения процент гомологии между двумя аминокислотными последовательностями эквивалентен проценту идентичности между двумя последовательностями. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. %

гомологии = количество идентичных положений/общее количество положений x 100), принимая во внимание количество гэпов и длину каждого гэта, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно выполнить с использованием математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах ниже.

[0144] Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с использованием алгоритма E. Meyers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)), который включен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу весов замен остатков PAM120, штраф за удлинение гэта 12 и штраф за открытие гэта 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с использованием алгоритма Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)), который включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступен на сайте www.gcg.com), с использованием матрицы Blossum62 или матрицы PAM250 и штрафа за удлинения гэта 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и штрафа за открытие гэта 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

[0145] Дополнительно или альтернативно, белковые последовательности согласно настоящему изобретению могут дополнительно использоваться в качестве «последовательности запроса» для выполнения поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски могут быть выполнены с использованием программы XBLAST (версия 2.0) Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиск белков BLAST можно выполнять с помощью программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам антител согласно настоящему изобретению. Для того, чтобы получить выравнивания с гэпами для целей сравнения, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см. www.ncbi.nlm.nih.gov).

[0146] В контексте настоящего изобретения термин «существенная идентичность» или «по существу идентичная» в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими вставками или делециями нуклеотидов с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) идентичность

нуклеотидной последовательности составляет по меньшей мере приблизительно 90%, а более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательности, такого как FASTA, BLAST или GAP, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может, в некоторых случаях, кодировать полипептид, имеющий ту же или по существу подобную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты. Применительно к полипептидам термин «существенное сходство» или «по существу подобный» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием весов гэпов по умолчанию, имеют по меньшей мере 90% идентичности последовательностей, даже более предпочтительно по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичности последовательностей. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу R) с подобными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная замена аминокислот существенно не меняет функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень сходства может быть скорректирована в сторону увеличения, чтобы внести поправку на консервативный характер замены. Средства для осуществления этой регулировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

[0147] В контексте настоящего изобретения термин «рекомбинантный» относится к белкам или их фрагментам согласно настоящему изобретению, созданным, экспрессированным, выделенным или полученным с помощью технологий или способов, известных в данной области техники как технология рекомбинантной ДНК, которые включают, например, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Этот термин относится к слитым белкам, экспрессируемым у млекопитающих, отличных от человека (включая трансгенных млекопитающих, отличных от человека, например, трансгенных мышей), или в

системе экспрессии клеток (например, клеток CHO), или выделенным из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител.

[0148] В контексте настоящего изобретения термин «ассоциированный» в контексте слитого белка или его компонента (например, нацеливающего фрагмента, такого как антитело) относится к функциональному взаимодействию между двумя или более полипептидными цепями. В частности, термин «ассоциированный» означает, что два или более полипептидов связаны друг с другом, например, нековалентно посредством молекулярных взаимодействий или ковалентно посредством одного или нескольких дисульфидных мостиков или химических поперечных связей, с образованием функционального слитого белка. Примеры ассоциаций, которые могут присутствовать в слитом белке согласно настоящему изобретению, включают (но без ограничения) ассоциации между гомодимерными или гетеродимерными доменами Fc в области Fc, ассоциации между областями VH и VL в Fab или scFv, ассоциации между CH1 и CL в Fab и ассоциации между CH3 и CH3 в домен-замещенном Fab.

[0149] В контексте настоящего изобретения термин «моновалентный» в отношении фрагмента IL2 и/или нацеливающего фрагмента в слитом белке означает слитый белок, который имеет только один фрагмент IL2 и/или нацеливающий фрагмент (например, анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающая часть), соответственно.

[0150] В контексте настоящего изобретения термин «двухвалентный» по отношению к фрагменту IL2 и/или нацеливающему фрагменту в слитом белке означает слитый белок, который имеет два фрагмента IL2 и/или нацеливающих фрагмента (например, анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающая часть), соответственно. Как правило, слитый белок, который является двухвалентным по отношению к фрагменту IL2 и/или нацеливающему фрагменту, является димерным (либо гомодимерным, либо гетеродимерным).

[0151] В контексте настоящего изобретения термины «определяющая комплементарность область» или «CDR» относятся к последовательностям аминокислот в переменных областях антитела, которые придают антигенную специфичность и аффинность связывания. В общем, имеется три CDR в каждой переменной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, HCDR-H3) и три CDR в каждой переменной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Примеры соглашений, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают, например, определение Кабата, определение Chothia, определение АВМ и определение IMGT. См., например, Kabat, 1991, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (схема нумерации по Кабату), Al-Lazikani

et al., 1997, J. Mol. Biol. 273:927-948 (схема нумерации Chothia), Martin *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (схема нумерации ABM) и Lefranc *et al.*, 2003, Dev. Comp. Immunol. 27:55-77 (схема нумерации IMGT). Также доступны общедоступные базы данных для идентификации последовательностей CDR в антителе.

[0152] В контексте настоящего изобретения термин «домен Fc» относится к части тяжелой цепи, которая спаривается с соответствующей частью другой тяжелой цепи. Термин «область Fc» относится к области связывающих молекул на основе антител, образованной ассоциацией двух доменов Fc тяжелой цепи. Два домена Fc внутри области Fc могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга. В нативном антителе домены Fc обычно идентичны, но один или оба домена Fc могут быть преимущественно модифицированы для обеспечения гетеродимеризации, например, посредством взаимодействия «выступ во впадину».

[0153] В контексте настоящего изобретения термин «EC50» относится к половине максимальной эффективной концентрации молекулы (такой как слитый белок), которая индуцирует ответ на полпути между исходным уровнем и максимумом после определенного времени воздействия. EC50 по существу представляет собой концентрацию антитела или слитого белка, при которой наблюдается 50% его максимального эффекта. Согласно некоторым вариантам осуществления значение EC50 равно концентрации слитого белка, которая обеспечивает полумаксимальную активацию STAT5 в анализе.

[0154] Эпитоп или антигенная детерминанта представляет собой часть антигена (например, молекулы-мишени), распознаваемую антителом или другим антигенсвязывающим фрагментом, как описано в настоящем документе. Эпитоп может быть линейным или конформационным.

[0155] В контексте настоящего изобретения термин «субъект» включает человека и животных, отличных от человека. Животные, отличные от человека, включают всех позвоночных, например, млекопитающих и не относящихся к млекопитающим, таких как приматы, не относящиеся к человеку, овцы, собаки, коровы, куры, амфибии и рептилии. Если не указано иное, термины «пациент» или «субъект» используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

[0156] В контексте настоящего изобретения термин «молекула-мишень» относится к любой биологической молекуле (например, белку, углеводу, липиду или их комбинации), экспрессируемой на поверхности клетки или во внеклеточном матриксе, которая может

специфически связываться нацеливающим фрагментом в слитом белке согласно настоящему изобретению.

[0157] В контексте настоящего изобретения термины «лечить», «лечение» и «обработка» относятся к уменьшению или облегчению прогрессирующего, тяжести и/или продолжительности пролиферативного нарушения или уменьшению одного или нескольких симптомов (предпочтительно одного или более различных симптомов) пролиферативного нарушения, возникающему в результате введения одного или более слитых белков согласно настоящему изобретению. Согласно конкретным вариантам осуществления термины «лечить», «лечение» и «обработка» относятся к улучшению по меньшей мере одного измеримого физического параметра пролиферативного нарушения, такого как рост опухоли, не обязательно различимого пациентом. Согласно другим вариантам осуществления термины «лечить», «лечение» и «обработка» относятся к ингибированию прогрессирующего пролиферативного нарушения, либо физически, например, путем стабилизации различного симптома, либо физиологически, например, путем стабилизации физического параметра, или и того, и другого. Согласно другим вариантам осуществления термины «лечить», «лечение» и «обработка» относятся к уменьшению или стабилизации размера опухоли или количества раковых клеток.

[0158] В контексте настоящего изобретения термин «рак» относится к заболеванию, характеризующемуся неконтролируемым (и часто быстрым) ростом аберрантных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части организма. Примеры различных раковых заболеваний описаны в настоящем документе и включают без ограничения рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почки, рак печени, рак головного мозга, рак надпочечников, рак вегетативных ганглий, рак желчевыводящих путей, рак костей, рак эндометрия, рак глаза, рак фаллопиевых труб, рак половых путей, рак толстой кишки, рак оболочек головного мозга, рак пищевода, рак брюшины, рак гипофиза, рак полового члена, рак плаценты, плевральный рак, рак слюнной железы, рак тонкой кишки, рак желудка, рак яичка, рак тимуса, рак щитовидной железы, рак верхних отделов пищеварительной системы, рак мочевыводящих путей, рак влагалища, рак вульвы, лимфома, лейкемия, рак легких и тому подобное.

[0159] В контексте настоящего изобретения термин «опухоль» используется в настоящем документе взаимозаменяемо с термином «рак», например, оба термина охватывают

солидные и жидкие, например, диффузные или циркулирующие опухоли. В контексте настоящего изобретения термин «рак» или «опухоль» включает предраковые, а также злокачественные виды рака и опухоли.

[0160] В контексте настоящего изобретения термин «клетка-хозяин» относится к клеткам, в которые была введена нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению. Термины «клетка-хозяин» и «рекомбинантная клетка-хозяин» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Понятно, что такие термины относятся к конкретной рассматриваемой клетке и к потомству или потенциальному потомству такой клетки. Поскольку определенные модификации могут возникать в последующих поколениях вследствие либо мутации, либо влияний окружающей среды, такое потомство фактически может не быть идентичным родительской клетке, но все же включено в объем термина, используемого в настоящем документе. Типичными клетками-хозяевами являются эукариотические клетки-хозяева, такие как клетки-хозяева млекопитающих.

[0161] В контексте настоящего изобретения термин «экспрессия» относится к процессу, посредством которого полинуклеотид транскрибируется с матрицы ДНК (например, в мРНК или другой транскрипт РНК), и/или к процессу, посредством которого транскрибируемая мРНК впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Транскрипты и кодируемые полипептиды можно в общем называть «генным продуктом (продуктами)». Если полинуклеотид получен из геномной ДНК, экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке.

[0162] В контексте настоящего изобретения «выделенная» молекула нуклеиновой кислоты или полинуклеотид относится к молекуле нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которая была удалена из ее нативной среды. Например, для целей настоящего изобретения рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий терапевтический полипептид, содержащийся в векторе, считается выделенным. Дополнительные примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, поддерживаемые в гетерологичных клетках-хозяевах, или очищенные (частично или существенно) полинуклеотиды в растворе. Выделенный полинуклеотид включает полинуклеотидную молекулу, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат эту полинуклеотидную молекулу, но эта полинуклеотидная молекула присутствует внехромосомно или в хромосомном положении, отличном от ее естественного хромосомного положения. Выделенные молекулы РНК включают *in vivo* или *in vitro* РНК-транскрипты согласно настоящему изобретению, а также формы с положительной и

отрицательной цепью и двухцепочечные формы. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению дополнительно включают такие молекулы, полученные синтетическим путем. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота могут представлять собой или могут включать регуляторный элемент, такой как промотор, сайт связывания рибосомы или терминатор транскрипции.

[0163] В контексте настоящего изобретения термин «заболевание» в целом является синонимом и используется взаимозаменяемо с терминами «нарушение» и «состояние» (как в случае медицинского состояния), поскольку все они отражают аномальное состояние организма человека или животного или одной из его частей, которое нарушает нормальное функционирование, обычно проявляется характерными признаками и симптомами и приводит к снижению продолжительности или качества жизни человека или животного.

[0164] В контексте настоящего изобретения термин «композиция» или «фармацевтическая композиция» относится к смеси по меньшей мере одного компонента, полезного с раскрытым в настоящем документе слитым белком, в комбинации с другими компонентами, такими как носители, стабилизаторы, разбавители, диспергирующие агенты, суспендирующие агенты, загустители и/или вспомогательные вещества. Фармацевтическая композиция способствует введению в организм одного или нескольких компонентов согласно настоящему изобретению.

[0165] В контексте настоящего изобретения термин «фармацевтически приемлемый» относится к веществу, такому как носитель или разбавитель, который не отменяет биологическую активность или свойства композиции и является относительно нетоксичным, т.е. вещество можно вводить субъекту, не вызывая нежелательных биологических эффектов или вредного взаимодействия с любым из компонентов композиции, в которой он содержится.

[0166] В контексте настоящего изобретения термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает фармацевтически приемлемую соль, фармацевтически приемлемое вещество, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, растворитель или инкапсулирующий материал, участвующий в переносе или транспортировке соединения (соединений) согласно настоящему изобретению внутри субъекта или субъекту, так что он может выполнять намеченную функцию. Обычно такие соединения переносятся или транспортируются из одного органа или части организма в другой орган или часть организма. Каждая соль или носитель должны быть

«приемлемыми» в том смысле, что они совместимы с другими ингредиентами состава и не вредны для субъекта. Некоторые примеры веществ, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза, крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал, целлюлозу и ее производные, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы, порошкообразный трагакант, солод, желатин, тальк, наполнители, такие как масло какао и воски для суппозиторий, масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло, гликоли, такие как пропиленгликоль, полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль, сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат, агар, буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия, альгиновая кислота, апирогенная вода, изотонический физиологический раствор, раствор Рингера, этиловый спирт, фосфатные буферные растворы, разбавитель, гранулирующий агент, смазывающее вещество, связующее вещество, дезинтегрирующий агент, смачивающий агент, эмульгатор, краситель, агент высвобождения, покрывающий агент, подсластитель, ароматизатор, парфюмерный агент, консервант, антиоксидант, пластификатор, желирующий агент, загуститель, отвердитель, структурообразователь, суспендирующий агент, поверхностно-активное вещество, увлажнитель, носитель, стабилизатор и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах, или любую их комбинацию. В контексте настоящего изобретения термин «фармацевтически приемлемый носитель» также включает любые и все покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, агенты, замедляющие всасывание, и т.п., которые совместимы с активностью одного или более компонентов согласно настоящему изобретению и являются физиологически приемлемыми для субъекта. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

[0167] В контексте настоящего изобретения термин «модулировать» означает любое изменение биологического состояния, т.е. увеличение, уменьшение и т.п.

[0168] В контексте настоящего изобретения термины «увеличенное», «увеличить», «улучшить» или «активировать» все используются в настоящем документе для обозначения увеличения на статически значимую величину, во избежание каких-либо сомнений, термины «увеличенное», «увеличить», «улучшить» или «активировать» означают увеличение по меньшей мере на 10% по сравнению с эталонным уровнем, например, увеличение на по меньшей мере приблизительно 20%, или по меньшей мере приблизительно 30%, или по

меньшей мере приблизительно 40%, или по меньшей мере приблизительно 50%, или по меньшей мере приблизительно 60%, или по меньшей мере приблизительно 70%, или по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 90%, или до и включая 100%, или любое увеличение между 10-100% по сравнению с эталонным уровнем, или увеличение по меньшей мере приблизительно в 2 раза, или по меньшей мере приблизительно в 3 раза, или по меньшей мере приблизительно в 4 раза, или по меньшей мере приблизительно в 5 раз, или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, или любое увеличение между в 2 раза и 10 раз или более, по сравнению с эталонным уровнем.

[0169] В контексте настоящего изобретения формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

[0170] В контексте настоящего изобретения термины «включающий», «содержащий», «охватывающий» или «имеющий» и их варианты означают, что они охватывают перечисленные далее элементы и их эквиваленты, а также дополнительный объект, если не указано иное.

[0171] В контексте настоящего изобретения фразы «согласно одному варианту осуществления», «согласно различным вариантам осуществления», «согласно некоторым вариантам осуществления» и т.п. используются неоднократно. Такие фразы не обязательно относятся к одному и тому же варианту осуществления, но могут, если из контекста явно не следует иное.

[0172] В контексте настоящего изобретения термины «и/или» или «/» означают любой из элементов, любую комбинацию элементов или все элементы, с которыми связан этот термин.

[0173] В контексте настоящего изобретения слово «по существу» не исключает «полностью», например, композиция, которая «по существу свободна» от Y, может быть полностью свободна от Y. При необходимости слово «по существу» может быть опущено из определения.

[0174] В контексте настоящего изобретения термин «приблизительно» или «около» применительно к одному или нескольким представляющим интерес значениям относится к значению, которое подобно заявленному эталонному значению. Согласно некоторым вариантам осуществления термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, которые попадают в пределы 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12 %, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше в любом направлении (больше

или меньше) от заявленного эталонного значения, если не указано иное или иным образом не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышает 100% возможного значения). Если в настоящем документе не указано иное, термин «приблизительно» включает значения, например, массовые проценты, близкие к указанному диапазону, которые эквивалентны с точки зрения функциональности отдельного ингредиента, композиции или варианта осуществления.

[0175] Как раскрыто в настоящем документе, предусмотрен ряд диапазонов значений. Понятно, что каждое промежуточное значение, с точностью до десятой единицы нижнего предела, если из контекста явно не следует иное, между верхним и нижним пределами этого диапазона также конкретно раскрыто. Каждый меньший диапазон между любым заявленным значением или промежуточным значением в указанном диапазоне и любым другим установленным или промежуточным значением в этом установленном диапазоне охватывается настоящим изобретением. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться или исключаться из диапазона, и каждый диапазон, в котором один из пределов, ни один из них или оба предела не включены в меньшие диапазоны, также охватывается настоящим изобретением с учетом любого конкретно исключенного предела. в заявленном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, настоящее изобретение также охватывает диапазоны, исключаящие один или оба включенных предела.

[0176] В контексте настоящего изобретения термин «каждый», когда он используется по отношению к набору элементов, предназначен для идентификации отдельного элемента в наборе, но не обязательно относится к каждому элементу в наборе. Исключения могут иметь место, если явное раскрытие или контекст ясно диктуют иное.

[0177] Применение любых и всех примеров или примерных формулировок (например, «таких как»), представленных в настоящем документе, предназначено только для лучшего освещения настоящего описания и не накладывает ограничения на объем настоящего изобретения, если не заявлено иное. Никакие формулировки в описании не должны быть истолкованы как указывающие какой-либо не заявленный элемент как существенный для осуществления на практике настоящего изобретения.

[0178] Все описанные в настоящем документе способы выполняют в любом подходящем порядке, если в настоящем документе не указано иное или иное явно не следует из контекста. Что касается любого из предложенных способов, стадии способа могут выполняться одновременно или последовательно. Когда стадии способа выполняются

последовательно, стадии могут выполняться в любом порядке, если не указано иное. В случаях, когда способ предусматривает комбинацию стадий, каждая комбинация или подкомбинация стадий входит в объем настоящего изобретения, если в настоящем документе не указано иное.

[0179] Каждая публикация, патентная заявка, патент и другие ссылочные источники, цитируемые в настоящем документе, полностью включены посредством ссылки в той степени, в которой они не противоречат настоящему описанию. Публикации, раскрытые в настоящем документе, предназначены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящего раскрытия. Ничто в настоящем документе не должно быть истолковано как признание того, что настоящее раскрытие не имеет права предшествовать такой публикации в силу предварительного раскрытия. Кроме того, предоставленные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, что, возможно, потребует независимое подтверждение.

[0180] Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, предназначены только для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения в их свете будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в суть и объем настоящей заявки и объем прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

[0181] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как получить и использовать способы и композиции согласно настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения относят к настоящему изобретению. Аналогично, настоящее изобретение не ограничивается какими-либо конкретными предпочтительными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, модификации и вариации вариантов осуществления могут быть очевидны специалистам в данной области техники после прочтения настоящего описания и могут быть выполнены без отклонения от его сущности и объема. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой массовые части, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура указана в градусах Цельсия, комнатная температура составляет приблизительно 25°C, а давление равно атмосферному или близко к нему.

Пример 1. Создание человеческих антител к PD-1 человека

[0182] Человеческие антитела к белку PD-1 создавали у мышей VELOCIMMUNE[®], содержащих ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека. Мышей иммунизировали фрагментом PD-1, который находится в диапазоне приблизительно от 25 до 170 аминокислот GenBank номер доступа NP_005009.2, в присутствии адъюванта. Иммунный ответ антител контролировали с помощью PD-1-специфического иммуноанализа. Когда желаемый иммунный ответ достигался, спленциты собирали и сливали с клетками миеломы мыши, чтобы сохранить их жизнеспособность и сформировать клеточные линии гибридомы. Линии гибридомных клеток подвергали скринингу и отбору для идентификации клеточных линий, продуцирующих PD-1-специфические антитела.

[0183] Анти-PD-1 антитела выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток мышей без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США № 7582298, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0184] Применяя этот способ получали несколько полностью человеческих анти-PD-1 антител (т.е. антител, обладающих человеческими переменными доменами и человеческими константными доменами).

[0185] Иллюстративные антитела, полученные, как описано выше, были обозначены как mAb29512, mAb7798 и mAb9048, имеющие аминокислотные и нуклеиновые последовательности HCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCVR, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано в таблицах 1 и 2.

[0186] Иллюстративные анти-PD-1 антитела использовали при создании реагентов на основе IL2 с использованием стандартных методов молекулярной биологии, известных в данной области техники. В таблице 4 представлены аминокислотные последовательности реагентов.

[0187] Биологические свойства иллюстративных белков, полученных в соответствии со способами этого примера, подробно описаны в примерах, изложенных ниже.

Пример 2. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи

[0188] В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей последовательностей варибельных областей тяжелой и легкой цепей, последовательностей CDR иллюстративных анти-PD-1 антител.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

ID антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb29512	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb7798	22	24	26	28	30	32	14	35
mAb9048	41	43	45	47	10	12	14	16

[0189] Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот иллюстративных анти-PD-1 антител представлены в Таблице 2.

Таблица 2. Идентификаторы нуклеиновых кислот

ID антитело	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb29512	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb7798	21	23	25	27	29	31	33	34
mAb9048	40	42	44	46	9	11	13	15

[0190] Антитела могут иметь изотип Fc человека или мыши. Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, может быть преобразовано в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с мышинным IgG1 Fc может быть преобразовано в антитело с человеческим IgG1 или человеческим IgG4 и т.д.), но в любом случае варибельные домены (включая CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в Таблице 1, останутся такими же, а свойства связывания с

антигеном, как ожидается, будут идентичными или по существу подобными независимо от природы домена Fc.

[0191] Иллюстративные антитела mAb29512, mAb7798 и mAb9048, содержащие человеческий IgG4 Fc, содержащий мутацию серина на пролин в шарнирной области (S108P), обозначены как H4H29512, REGN2810 и H4H9048, соответственно. В таблице 3 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей полноразмерных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи этих антител.

Таблица 3. Последовательности тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) анти-PD-1 антител

ID антитела	Название антитела	SEQ ID NO:			
		HC		LC	
		ДНК	Пептид	ДНК	Пептид
mAb29512	H4H29512	17	18	19	20
mAb7798	REGN2810	36	37	38	39
mAb9048	H4H9048	48	49	19	20

[0192] REGN2810 (также известный как цемиплимаб, LIBTAYO[®]) был впервые описан в патенте США 9987500 и с тех пор одобрен для лечения плоскоклеточного рака кожи, базальноклеточного рака и немелкоклеточного рака легких.

[0193] В таблице 4 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей анти-PD-1-IL2R α -IL2 реагентов.

Таблица 4. Идентификаторы аминокислотных последовательностей анти-PD-1-IL2R α -IL2

ID	SEQ ID NO:										Фрагмент IL2
	HC VR	HC DR1	HC DR2	HC DR3	LC VR	LCD R1	LC DR2	LC DR3	HC	LC	
REGN 10595	2	4	6	8	10	12	14	16	57	58	54
REGN	22	24	26	28	30	32	14	35	59	60	54

10486											
REGN 10597	41	43	45	47	10	12	14	16	61	62	54

[0194] Фрагмент IL2 соединен с С-концом константной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 55) через линкер, содержащий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 50. Для REGN10595, тяжелая цепь (HC) SEQ ID NO: 57 включает аминокислотные последовательности согласно HCVR (SEQ ID NO: 2), константную область тяжелой цепи (SEQ ID NO: 55), линкер (SEQ ID NO: 50) и фрагмент IL2 (SEQ ID NO: 54). Для REGN10486, тяжелая цепь (HC) SEQ ID NO: 59 включает аминокислотные последовательности согласно HCVR (SEQ ID NO: 22), константную область тяжелой цепи (SEQ ID NO: 55), линкер (SEQ ID NO: 50) и фрагмент IL2 (SEQ ID NO: 54). Для REGN10597, тяжелая цепь (HC) SEQ ID NO: 61 включает аминокислотные последовательности согласно HCVR (SEQ ID NO: 41), константную область тяжелой цепи (SEQ ID NO: 55), линкер (SEQ ID NO: 50) и фрагмент IL2 (SEQ ID NO: 54).

Контрольные конструкции, используемые в следующих примерах

[0195] Следующие контрольные конструкции были включены в следующие примеры для сравнительных целей: «Сравнение 1»: моноклональное анти-PD-1 антитело, имеющее последовательности V_H/V_L антитела «МК-3475» согласно WO 2008/156712 (Merck Sharp & Dohme), «Сравнение 2»: моноклональное анти-PD-1 антитело, имеющее последовательности V_H/V_L антитела «5C4» согласно WO2006/121168 (Medarex, Inc/ER Squibb), и «REGN13233»: анти-PD-1 антитело, содержащее последовательности V_H/V_L SEQ ID NO: 41/10 и связанное с вариантом IL2 (IL2(3m)), имеющим устраненное связывание CD25 (Klein et al., 2017, Oncoimmunology).

Пример 3. Кинетика связывания слитых конструкций анти-PD1-IL2R α -IL2 и родительских двухвалентных анти-PD1 антител

[0196] Для оценки кинетики связывания слитых конструкций анти-PD1-IL2RA-IL2 и родительских двухвалентных анти-PD1 антител, равновесные константы диссоциации (значения K_D) для человеческого PD-1, экспрессированного с С-концевой мус-мус-гексагистидиновой меткой (hPD-1.mmH, SEQ ID NO: 66), связывающегося с очищенными

родительскими анти-PD-1 моноклональными антителами и слитыми конструкциями анти-PD1-IL2RA-IL2 определяли с использованием биосенсора поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени с использованием устройства Biacore 3000 или 4000. Поверхность сенсора CM5 Biacore дериватизировали путем аминного сочетания с моноклональным мышинным анти-человеческий Fc антителом (GE, #BR-1008-39). Все исследования связывания Biacore проводили в буфере, состоящем из 0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20 (рабочий буфер HBS-EP). Различные концентрации hPD-1. нМ, приготовленные в рабочем буфере HBS-EP (в диапазоне от 100 до 3,7 нМ в 3-кратных разведениях или от 90 до 3,33 нМ в 3-кратных разведениях), вводили поверх поверхности захвата анти-PD-1 антитела или слитой конструкции анти-PD1-IL2R α -IL2 при скорости потока 30 или 50 мкл/мин. Ассоциацию антитело-реагент контролировали в течение 4 или 5 минут, тогда как диссоциацию в рабочем буфере HBS-EP контролировали в течение 10 минут. В конце каждого цикла поверхность захвата анти-PD-1 моноклонального антитела (mAb) или анти-PD1-IL2R α -IL2 регенерировали с использованием 12-секундной инъекции 20 мМ фосфорной кислоты. Все эксперименты по кинетике связывания проводили при 25°C.

[0197] Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем аппроксимации сенсорограмм в реальном времени к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для подбора кривой Scrubber 2.0с. Равновесные константы диссоциации связывания (K_D) и периоды полужизни диссоциации ($t_{1/2}$) рассчитывали на основе кинетических констант скорости как:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t_{1/2} (\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

[0198] Кинетика связывания слитых конструкций анти-PD1-IL2R α -IL2 и родительских двухвалентных анти-PD1 антител приведены в Таблице 5.

Таблица 5. Кинетика связывания hPD-1.mmH с анти-PD-1 моноклональными антителами и слитыми конструкциями анти-PD1-IL2R α -IL2 при 25°C

№ реагента / № антитела	Захват mAb (RU)	Связывание 90 нМ или 100 нМ hPD-1.mmH (RU)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)	t1/2 (мин)
REGN10486	241,8 ± 6,4	46,9	1,07E+05	3,02E-04	2,83E-09	38,3
REGN2810	337,6 ± 3,9	88,7	9,88E+04	2,53E-04	2,56E-09	45,7
REGN10595	186,5 ± 1,5	44,7	1,04E+05	4,76E-04	4,59E-09	24,3
mAb29512	481,1 ± 1,3	123,8	1,38E+05	4,27E-04	3,10E-09	27,1
REGN10597	211,5 ± 2,6	41,8	1,48E+05	5,82E-04	3,92E-09	19,9
mAb9048	229,91	52,7	1,37E+05	1,23E-03	8,95E-09	9,4

Пример 4. Перекрестное конкурирование анти-PD-1 моноклональных антител и анти-PD1-IL2R α -IL2 слитых конструкций

[0199] Для того, чтобы оценить перекрестную конкуренцию анти-PD-1 моноклональных антител и слитых конструкций анти-PD1-IL2R α -IL2, конкуренцию за связывание между анти-PD1-IL2R α -IL2 и коммерческими анти-PD-1 моноклональными антителами определяли с использованием анализа интерферометрии биослоя (BLI) без метки в реальном времени на биосенсоре Octet HTX (ForteBio Corp., A Division of Sartorius). Весь эксперимент проводили при 25°C в буфере, состоящем из 0,01 М HEPES pH7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20, 0,1 мг/мл BSA (буфер Octet HBS-EP) с встряхивание пластины со скоростью 1000 оборотов в минуту. Для того, чтобы оценить, способны ли два антитела конкурировать друг с другом за связывание с соответствующими эпитопами hPD-1.mmH (SEQ ID NO: 66), приблизительно ~0,34 нМ hPD-1.mmH сначала захватывалось на биосенсорах Octet, покрытых антителом HIS1K (ForteBio Inc, № 18-5120) путем погружения биосенсоров на 2 минуты в лунки, содержащие 20 мкг/мл раствора hPD-1.mmH. Затем биосенсоры с захваченным антигеном насыщали первым анти-PD-1 антителом или слитой конструкцией анти-PD1-IL2R α -IL2 (впоследствии называемой mAb-1) путем погружения в лунки, содержащие раствор mAb-1 в концентрации 50 мкг/мл на 5 минут. Затем биосенсоры погружали в лунки, содержащие раствор 50 мкг/мл второго анти-PD-1 антитела или слитой конструкции анти-PD1-IL2R α -IL2 (впоследствии называемой mAb-

2) на 3 минуты. Все биосенсоры промывали буфером Octet HBS-EP между каждой стадией эксперимента. Реакцию связывания контролировали в режиме реального времени в ходе эксперимента, и реакцию связывания в конце каждой стадии записывали — сравнивали ответ связывания mAb-2 с hPD-1.mmH, предварительно связанным с mAb-1, и конкурентное/неконкурентное поведение различных анти-PD-1 антител определяли с использованием 50% порога ингибирования.

[0200] В Таблице 6 определены взаимоотношения антител, конкурирующих в обоих направлениях, независимо от порядка связывания.

Таблица 6. Перекрестное конкурирование анти-PD-1 и моноклональных антител и анти-PD1-IL2R α -IL2 слитых конструкций для связывания с hPD-1.mmh

Первое моноклональное антитело (mAb-1), захваченное с помощью октетных биосенсоров HIS1K	Показано, что антитела mAb-2 конкурируют с mAb-1
REGN10486	REGN2810
REGN2810	REGN10486
REGN10595	REGN10597
REGN10597	REGN10595

[0201] В Таблице 6 показано, что REGN10486, а также его родительское антитело REGN2810 не вступали в перекрестную конкуренцию ни с REGN10595, ни с REGN10597 за связывание с hPD-1.

Пример 5. Определение функциональных характеристик *in vitro* анти-PD1-IL2R α -IL2 конструкций

Конструирование клеточной линии

[0202] Конструирование YT/репортерных клеток: Клеточную линию человеческих T/NK-клеток лейкоза YT подвергали электропорации с использованием преобразователь сигнала и активатор транскрипции 5 (STAT5) - люцифераза репортерной конструкции и поддерживали в Iscoves + 20% FBS + P/S/G + 200 мкг/мл гигромицина. Одиночный клеточный клон, обладающий высокой чувствительностью к IL-2, идентифицировали и переименовали в YT/Stat5-Luc cl.4. IL2R α (CD25) нокаутировали в этом клоне с использованием технологии CRISPR-Cas9, и полученную клеточную линию YT/STAT5-Luc/IL2R α KO валидировали с

помощью проточной цитометрии. Затем человеческий IL2R α стабильно вводили в клеточную линию YT/STAT5-Luc/IL2R α KO (аминокислоты M1-I272 с номером доступа NP_000408.1), и полученную клеточную линию YT/STAT5-Luc/hIL2R α валидировали методом проточной цитометрии и поддерживали в Iscoves + 20% FBS + P/S/G + 200 мкг/мл гигромицина + 15 мкг/мл бластицидина. Клетки YT/Stat5-Luc cl.4, YT/Stat5-Luc/IL2R α KO и YT/Stat5-Luc/hIL2R α конструировали для стабильной экспрессии человеческого PD1 (аминокислоты M1-L288 с номером доступа NP_005009.2, с мутацией 2Q=>E) и клетки отбирали в среде с добавлением 1 мг/мл G418. Клетки валидировали с помощью проточной цитометрии и переименовали в YT/STAT5-Luc/hPD1, YT/STAT5-Luc/IL2R α KO/hPD1 и YT/STAT5-Luc/hIL2R α /hPD1.

[0203] Конструирование PD1 репортерных клеток: Клетки Jurkat E6-1 конструировали таким образом, чтобы они стабильно экспрессировали репортерную конструкцию люциферазы белка активации 1 (AP1), и устойчивые к антибиотикам клетки отбирали и поддерживали в среде RPMI + 10% FBS + P/S/G + 1 мкг/мл пуромицина. Полученный пул репортерных клеток конструировали для экспрессии человеческого PD1 (аминокислоты M1-L288 с номером доступа NP_005009.2 с мутацией 2Q=>E), и клональную клеточную линию с высоким уровнем экспрессии PD-1 выделяли с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток и поддерживали в среде RPMI + 10% FBS + P/S/G + 1 мкг/мл пуромицина. Полученный клон переименовали в Jurkat/AP1-Luc/hPD1 cl. 4E5.

[0204] Конструирование HEK293/анти-CD3/PD-L1 клеток: HEK293 трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим CD79a человека (hIga: M1-P226 с номером доступа NP_001774.1), CD79b человека (hIgb: M1-E229 с номером доступа NP_000617. 1), вариабельные домены анти-CD3 (тяжелая цепь анти-CD3 mIgE, легкая цепь анти-CD3 каппа, клон 2706N, GenBank IgE № AAB59424.1, CemX-migis-Cyto/TM PIR# PИ1215) и человеческий PD-L1 (аминокислоты M1-T290 с номером доступа NP_054862.1), затем отдельные клетки сортировали и хранили в DMEM + 10% FBS + P/S/G + 500 мкг/мл G418 + 100 мкг/мл гигромицина + 1 мкг/мл пуромицина. Экспрессию анти-CD3 и PD-L1 подтверждали с помощью проточной цитометрии, и полученную клональную линию переименовали в 293/aCD3/hPD-L1 cl. A3.

[0205] Конструирование Raji/CD80 KO/CD86 KO и Raji/CD80 KO/CD86 KO/PD-L1 клеток: технологию CRISPR-Cas9 применяли для устранения экспрессии CD80 и CD86 в клетках Raji. Клетки Raji/CD80 KO/CD86 KO клонировали в виде одной клетки, и полученный

клон (Raji/CD80 KO/CD86 KO cl.1D6) конструировали для экспрессии человеческого PD-L1 (аминокислоты M1-T290 с номером доступа NP_054862.1). Полученную клеточную линию Raji/CD80 KO/CD86 KO/hPD-L1 проверяли методом проточной цитометрии и поддерживали в среде RPMI-1640 + 10% FBS + HEPES + NaPyг + P/S/G + 0,5 мкг/мл пуромицина.

Антагонистический анализ PD1

[0206] Клетки HEK293, экспрессирующие мембрана-связанные анти-hCD3-эпсилон и человеческий PD-L1, инкубировали с репортерными Т-клетками Jurkat/AP1-Luc/hPD-1. Кластеризация CD3 в комплекс с Т-клеточным рецептором на репортерных клетках посредством анти-CD3 на клетках HEK293 приводила к активации транскрипционного фактора AP1, который управляет экспрессией репортерного гена люциферазы. Однако экспрессия люциферазы в репортерных Т-клетках может подавляться посредством взаимодействия ингибирующего рецептора PD-1 с PD-L1 на клетках HEK293, что можно преодолеть добавлением антител, блокирующих ось PD1/PD-L1.

[0207] RPMI1640 с добавлением 10% FBS и P/S/G использовали в качестве среды для анализа для приготовления клеточных суспензий и разведений антител. За день до скрининга сконструированные репортерные клетки Jurkat/AP1-Luc/hPD1 разводили до концентрации 3×10^5 клеток/мл. В день анализа клетки центрифугировали, ресуспендировали в среде для анализа и высевали по $2,5 \times 10^4$ 293/aCD3/hPD-L1 клеток/лунка в 96-луночные белые планшеты с плоским дном. Серийно разведенные (1:4) ненацеленный IL2R α -IL2 [анти-PSMA-IL2R α -IL2 (IL2R α -IL2, слитый с несвязанным (PSMA) антителом), анти-PD1 (REGN2810, H4H29512 или H4H9048), анти-PD1-IL2R α -IL2 (REGN10486, REGN10595, REGN10597) или изотипические контроли (изотипический контроль 1 или изотипический контроль 2) в 11-точечном диапазоне титрования (от 500 нМ до 477 фМ), при этом точка 12 не содержала рекомбинантный белок, затем добавляли к высеянными клеткам с последующим добавлением $2,5 \times 10^4$ репортерных клеток Jurkat/AP1-Luc/hPD1/лунка. Планшеты инкубировали в течение 5 часов при 37 °C/5% CO₂, а затем в лунки добавляли 100 мкл реагента ONE-Glo™ (Promega) для лизиса клеток и обнаружения активности люциферазы. Излучаемый свет измеряли в относительных световых единицах (RLU) на устройстве для считывания планшета с множеством меток Envision (PerkinElmer). Значения EC₅₀ антител определяли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™ из четырехпараметрического логистического уравнения по 12-

точечной кривой зависимости ответа от дозы. Кратность индукции вычисляли по следующему уравнению:

$$\text{Кратность индукции} = \frac{\text{Самое высокое среднее значение RLU в тестируемом диапазоне доз}}{\text{Средние значения RLU контроля без белка}}$$

Репортерный анализ IL2

[0208] В этом эксперименте сконструированные репортерные клетки YT стимулировали либо рекомбинантным IL2-Fc, либо ненацеленным IL2R α -IL2, либо слитыми конструкциями анти-PD1-IL2R α -IL2. Функциональные рецепторы IL2 образуются путем дифференциальной сборки субъединиц IL2R (IL2R α , IL2R β и IL2R γ), при этом сборка субъединиц IL2R β /IL2R γ включает рецептор с низкой аффинностью и рецепторы, содержащие все три субъединицы (IL2R α /IL2R β /IL2R γ), образующие рецептор с высокой аффинностью. Связывание цитокина с IL2R приводит к активации STAT5, который управляет продукцией люциферазы в сконструированных клеточных линиях. Для того, чтобы оценить относительную эффективность анти-PD1-IL2R α -IL2 в присутствии рецептора IL2 с низкой аффинностью (IL2R β / γ) или высокой аффинностью (IL2R α / β / γ), репортерные клетки YT/STAT5-Luc, экспрессирующие эндогенный IL2R α , конструировали таким образом, чтобы они не экспрессировали или сверхэкспрессировали IL2R α . Хотя репортерные клетки экспрессируют эндогенный PD1, создавали производные, в которых PD1 был сверхэкспрессирован, для оценки влияния уровней экспрессии PD1 на активность анти-PD1-IL2R α -IL2.

[0209] RPMI1640 с добавлением 10% FBS и P/S/G использовали в качестве среды для анализа для приготовления клеточных суспензий и разведений антител. За день до скрининга сконструированные репортерные клетки YT/Stat5-Luc, сверхэкспрессирующие или лишенные IL2R α и эндогенно экспрессирующие или сверхэкспрессирующие PD1, разводили в концентрации 3×10^5 клеток/мл. В день анализа $2,5 \times 10^4$ репортерных клеток на лунку помещали в свежую среду для анализа в 96-луночные белые плоскодонные планшеты и инкубировали с IL2-Fc (SEQ ID NO: 74), ненацеленным IL2R α -IL2, REGN10486, REGN10595, REGN10597 или изотипическим контролем, серийно разведенными (1:4) в 11-точечном диапазоне титрования (от 200 нМ до 191 фМ), и точка 12 не содержала рекомбинантный белок. Планшеты инкубировали в течение 5 часов при 37°C/5% CO₂, а затем в лунки добавляли 100 мкл реагента ONE-Glo™ (Promega) для лизиса клеток и обнаружения активности люциферазы. Излучаемый свет измеряли в RLU на устройстве для считывания планшетов с множеством меток Envision

(PerkinElmer). Значения EC_{50} антител определяли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™ из четырехпараметрического логистического уравнения по 12-точечной кривой зависимости ответа от дозы. Кратность индукции вычисляли по следующему уравнению:

$$\text{Кратность индукции} = \frac{\text{Самое высокое среднее значение RLU в тестируемом диапазоне доз}}{\text{Средние значения RLU контроля без белка}}$$

Конкурентный анализ PD1

[0210] Двухвалентное анти-PD1 антитело или изотопический контроль добавляли к сконструированным репортерным клеткам YT перед их стимуляцией либо с помощью ненацеленного IL2R α -IL2, либо слитых конструкций анти-PD1-IL2R α -IL2. Конкуренция двухвалентного анти-PD1 с анти-PD1-IL2R α -IL2 будет ослаблять способность анти-PD1-IL2R α -IL2 нацеливаться и, следовательно, активировать PD-1-экспрессирующие репортерные клетки STAT5-Luc. Репортерные клетки, сверхэкспрессирующие PD1, использовали для максимизации эффективности нацеливания и обеспечения наилучшего обнаружения конкуренции двухвалентного анти-PD1 с анти-PD1-IL2R α -IL2.

[0211] RPMI1640 с добавлением 10% FBS и P/S/G использовали в качестве среды для анализа для приготовления клеточных суспензий и разведений антител. За день до скрининга репортерные клетки YT/Stat5-Luc/hPD1, нокаутированные или сверхэкспрессирующие IL2R α , разводили в концентрации 3×10^5 клеток/мл. В день анализа $2,5 \times 10^4$ репортерных клеток на лунку помещали в среду для анализа в 96-луночные белые планшеты с плоским дном и проводили титрование двухвалентных анти-PD1 антител или антител изотипического контроля (5 точек, диапазон разведения 1:10 в диапазоне от 500 нМ до 0,05 нМ, причем точка 6 не содержала рекомбинантный белок), с последующим добавлением титрования ненацеленного IL2R α -IL2, REGN10486, REGN10595 или REGN10597 (от 62,5 нМ до 59,6 фМ, 1:4 серийные разведения в диапазоне 11-точечных разведений, причем точка 12 не содержала рекомбинантный белок). Планшеты инкубировали в течение 4 часов при 37°C/5% CO₂, а затем в лунки добавляли 100 мкл реагента ONE-Glo™ (Promega) для лизирования клеток и обнаружения активности люциферазы. Излучаемый свет измеряли в RLU на устройстве для считывания нескольких меток Envision (PerkinElmer). Значения EC_{50} антител определяли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™ из четырехпараметрического логистического уравнения по 12-точечной кривой зависимости ответа от дозы. Кратность индукции вычисляли по следующему уравнению:

$$\text{Кратность индукции} = \frac{\text{Самое высокое среднее значение RLU в тестируемом диапазоне доз}}{\text{Средние значения RLU контроля без белка}}$$

Анализ стимуляции первичных Т-клеток

[0212] Первичные Т-клетки стимулировали посредством 4-дневного совместного культивирования с обработанными митомицином клетками Raji/CD80 KO/CD86 KO. Поскольку клетки Raji эндогенно экспрессируют CD20, добавляли биспецифическое антитело CD20хCD3 для активации первичных Т-клеток. Титрование изотипического контроля, IL2, анти-PD1, ненацеленного антитела IL2R α -IL2 (REGN9904) или анти-PD1-IL2R α -IL2 (REGN10486, REGN10595 или REGN10597) добавляли во время совместного культивирования, и их влияние на активность Т-клеток определяли путем измерения высвобождения IFN- γ в супернатанте клеточной культуры с использованием гомогенных, не требующих промывки наборов AlphaLISA (Perkin Elmer).

[0213] Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из лейкопака здорового донора с использованием набора EasySep Direct Human PBMC Isolation Kit (Stemcell) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Т-клетки выделяли из PBMC с использованием набора для выделения Т-клеток человека EasySep (Stemcell) в соответствии с протоколом производителя. Клетки центрифугировали, ресуспендировали в стимулирующей среде (среда для культивирования клеток X-VIVO 15 с добавлением 10% FBS, HEPES, NaPyg, NEAA и 0,01 мМ BME) и 1×10^5 клеток/лунка высевали в 96-луночные круглодонные планшеты. Клетки Raji/CD80 KO/CD86 KO и Raji/CD80 KO/CD86 KO/hPD-L1 обрабатывали 20 мкг/мл митомицина С в среде первичной стимуляции в концентрации 10×10^6 клеток/мл в течение 1 часа при 37°C, чтобы остановить рост клеток. Затем клетки промывали 3 раза D-PBS, содержащим 2% FBS, и добавляли 5×10^4 клеток на лунку. Затем добавляли 0,5 нМ биспецифического антитела анти-CD3ханти-CD20 в сочетании с титрованием анти-PD1, IL2, комбинации REGN2810 + IL2, ненацеленного антитела IL2R α -IL2, анти-PD1-IL2R α -IL2. (REGN10486, REGN10595 или REGN10597) или антитела изотипического контроля (изотипический контроль 1 или изотипический контроль 2) в 9-точечном серийном разведении 1:6 в диапазоне от 500 нМ до 0,3 пМ, при этом точка 10 разведения содержит только константу 0,5 нМ биспецифического антитела. Планшеты инкубировали в течение 96 часов при 37°C/5% CO₂. Количественное определение IFN- γ проводили в супернатанте клеточной культуры с использованием анализа AlphaLISA в соответствии с протоколами производителя с использованием образцов с известными

концентрациями IFN- γ для экстраполяции пг/мл IFN- γ в каждой лунке с образцом. Измерения получали с помощью устройства для считывания планшетов с множеством меток Envision (Perkin Elmer). Значения EC₅₀ цитокинов определяли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™ по четырехпараметрическому логистическому уравнению на 10-точечной кривой зависимости ответа от дозы, где точка 10 разведения содержала только 0,5 нМ константу биспецифического антитела.

Результаты и заключения

Антагонистический анализ PD1:

[0214] Способность слитых конструкций анти-PD1-IL2R α -IL2 блокировать PD1/PD-L1-опосредованное подавление передачи сигналов TCR оценивали с использованием биоанализа на основе AP1-репортерных клеток. Инкубация клеток 293/aCD3/hPD-L1 с репортерными клетками Jurkat/AP1-Luc/hPD1 приводит к снижению репортерной активности из-за активации PD1 с помощью PD-L1. Оценивали способность двухвалентных антител против PD1 или слитых белков антител IL2R α -IL2 блокировать взаимодействие PD1-PD-L1 и сохранять репортерную активность. Значения EC₅₀ и кратности индукции приведены в Таблице 7 для сконструированных репортерных клеток.

[0215] При обработке репортерных клеток контрольными белками (изотипический контроль Ab 1, изотипический контроль Ab 2 или ненацеленный IL2R α -IL2) не было обнаружено увеличения активности люциферазы. Напротив, инкубация репортерных клеток с анти-PD1 антителом, REGN2810 или соответствующим анти-PD1-IL2R α -IL2, REGN10486, повышала активность люциферазы (в 19,210 и 17,740 раз, соответственно) с подобной эффективностью (3,668E-09 и 5,351E-09, соответственно). Двухвалентные антитела к PD1, H4H29512 и H4H9048, с другой стороны, не усиливали активность люциферазы, а соответствующие белки анти-PD1-IL2R-IL2, REGN10595 и REGN10597, индуцировали низкую активность люциферазы (2,725 и 3,038-кратную, соответственно) со слабой эффективностью (1,266E-08 и 1,264E-08, соответственно).

Репортерный анализ IL2:

[0216] Способность слитых конструкций анти-PD1-IL2R α -IL2 индуцировать передачу сигналов рецептора IL-2, нацеленного на PD1, оценивали с использованием STAT5-репортерного анализа. Репортерные клетки YT/STAT5-Luc, которые экспрессировали

эндогенный IL2R α , не имели экспрессии IL2R α (клетки КО) или сверхэкспрессировали IL2R α , а также экспрессировали эндогенный PD1 или сверхэкспрессировали PD1, инкубировали совместно с изотипическим контролем, IL2-Fc, ненацеленным IL2R α -IL2 или анти-PD1-IL2R α -IL2 (REGN10486, REGN10595 или REGN10597) и оценивали репортерную активность STAT5. Значения кратности индукции и EC₅₀ приведены в таблицах 8 и 9, соответственно.

[0217] По сравнению с IL2, ненацеленный IL2R α -IL2 проявлял пониженную индукцию репортерной активности STAT5, независимо от экспрессии IL2R α . Молекулы, нацеленные на PD1, демонстрировали повышенную эффективность по сравнению с ненацеленным IL2R α -IL2, независимо от экспрессии IL2R α . Более того, когда PD1 сверхэкспрессировался на репортерных клетках, эффективность анти-PD1-IL2R α -IL2 еще больше увеличивалась до уровня, подобного активности IL2.

Конкурентный анализ PD-1:

[0218] Способность двухвалентных моноклональных анти-PD1 антител препятствовать слитым конструкциям анти-PD1-IL2R α -IL2 оценивали с использованием репортерного биоанализа STAT5. Репортерные клетки YT/STAT5-Luc, которые сверхэкспрессировали IL2R α или не имели экспрессии IL2R α и сверхэкспрессировали PD1, инкубировали с 500 нМ либо изотипического контроля, либо двухвалентного моноклонального анти-PD1 антитела (REGN2810, сравнение 1 или сравнение 2) перед инкубацией с титрованием ненацеленных IL2R α -IL2 или нацеленных на PD1 конструкций анти-PD1-IL2R α -IL2 (REGN10486, REGN10595 или REGN10597). После инкубации оценивали репортерную активность STAT5. Конкуренция двухвалентных моноклональных анти-PD1 антител с анти-PD1-IL2R α -IL2 может привести к потере нацеливания на PD1 анти-PD1-IL2R α -IL2, что приведет к снижению репортерной активности. Значения EC₅₀ приведены в Таблице 10.

[0219] В отсутствие двухвалентных моноклональных анти-PD1 антител, нацеленный на PD1 IL2R α -IL2 (REGN10486, REGN10595, REGN10597) обладал большей эффективностью по сравнению с ненацеленным IL2R α -IL2 (REGN9904). Хотя эффективность REGN10486 сильно снижалась при инкубации репортерных клеток с антителом PD1 (REGN2810, сравнение 1 или сравнение 2), влияние на эффективность REGN10595 и REGN10597 было минимальным, независимо от экспрессии IL2R α . Добавление анти-PD1 (REGN2810, сравнение 1 или сравнение 2) не оказало влияния на эффективность ненацеленного IL2R α -IL2.

Анализ стимуляции первичных Т-клеток:

[0220] Способность анти-PD1-IL2R α -IL-2 усиливать стимуляцию Т-клеток оценивали с помощью функционального анализа первичных Т-клеток, измеряющего продукцию цитокина IFN- γ . Т-клетки, инкубированные с обработанными митомицином С клетками Raji/CD80 KO/CD86 KO, или клетки Raji/CD80 KO/CD86 KO/hPD-L1 обрабатывали постоянным количеством 0,5 нМ биспецифического антитела анти-CD3ханти-CD20 и титрованием изотипического контроля, IL2, двухвалентного анти-PD1 антитела (REGN2810) отдельно или в сочетании с IL2, ненацеленного IL2R α -IL2 или анти-PD1-IL2R α -IL2 (REGN10486, REGN10595 или REGN10597). Совместная инкубация Т-клеток с клетками Raji в течение 4 дней приводила к измеримому высвобождению IFN- γ . В присутствии клеток Raji/CD80 KO/CD86 KO обработка Т-клеток анти-PD1-IL2R α -IL2, IL2 или IL2 в сочетании с REGN2810 приводила к подобным уровням высвобождения IFN γ , тогда как обработка ненацеленным IL2R α -IL2, антителом изотипического контроля и REGN2810 приводила к более низким уровням высвобождения IFN γ . В присутствии клеток Raji/CD80 KO/CD86 KO, экспрессирующих hPD-L1, общее высвобождение IFN γ снижалось в контрольных образцах, обработанных изотипом, по сравнению с клетками RAJI, не экспрессирующими PD-L1. Обработка ненацеленным IL2R α -IL2 и REGN2810 приводила к подобному увеличению высвобождения IFN γ по сравнению с изотипическими контролями, тогда как обработка IL2, REGN10597 и REGN10595 приводила к еще большему ответу. Наибольший ответ наблюдали для REGN10486 или комбинации IL2 с REGN2810. Значения EC₅₀ и максимального высвобождения интерферона в диапазоне доз антител приведены в Таблице 11.

Таблица 7. Значения EC₅₀ и кратной индукции для анти-PD1 и анти-PD1-IL2R α -IL2 конструкций, как определено с помощью антагонистического анализа PD1

	Кратность индукции*	EC ₅₀ (M)
Изотипический контроль 1	1,126	ND
Изотипический контроль 2	1,202	ND
Ненацеленный IL2R α -IL2	1,076	ND
REGN2810	19,210	3,668E-09
REGN10486	17,740	5,351E-09
H4H29512	1,286	ND
REGN10595	2,725	1,266E-08

H4H9048	1,237	ND
REGN10597	3,038	1,264E-08

ND: Не определено, поскольку не наблюдали зависимый от концентрации ответ.

* Кратность индукции представляет собой наивысшее среднее значение RLU в пределах тестируемого диапазона доз относительно среднего значения RLU в отсутствие антитела.

Таблица 8. Кратность индукции для IL2-Fc, ненацеленного IL2R α -IL2 и анти-PD1-IL2R α -IL2 конструкций, как определено посредством репортерного анализа IL2

	Изотипический контроль	Ненацеленный IL2R α -IL2	IL2-Fc	REGN10486	REGN10595	REGN10597
YT/Stat5-Luc	1,072	3,206	4,955	3,426	3,254	3,295
YT/Stat5-Luc/IL2R α KO	1,118	2,622	5,397	3,093	2,834	2,851
YT/Stat5-Luc/hIL2R α	1,074	4,868	5,485	5,080	5,016	5,187
YT/Stat5-Luc/hPD1	1,082	4,521	7,967	5,605	6,638	6,393
YT/Stat5-Luc/IL2R α KO/hPD1	1,061	2,586	3,870	3,347	3,612	3,538
YT/Stat5-Luc/hIL2R α /hPD1	1,000	2,770	3,060	2,714	3,013	2,879

* Кратность индукции представляет собой самое высокое среднее значение RLU в пределах тестируемого диапазона доз относительно среднего значения RLU в отсутствие антитела.

Таблица 9. Значения EC_{50} для IL2-Fc, ненацеленного IL2R α -IL2 и анти-PD1-IL2R α -IL2 конструкций, как определено посредством репортерного анализа IL2

	Изотипический контроль	Ненацеленный IL2R α -IL2	IL2-Fc	REGN1048 6	REGN1059 5	REGN10597
YT/Stat5-Luc	ND	NC	4,023E-10	NC	NC	NC
YT/Stat5-Luc/IL2R α KO	ND	NC	1,327E-09	NC	NC	NC
YT/Stat5-Luc/hIL2R α	ND	1,631E-09	2,415E-11	7,524E-10	8,87E-10	8,482E-10
YT/Stat5-Luc/hPD1	ND	NC	3,918E-10	1,702E-10	2,193E-10	1,749E-10
YT/Stat5-Luc/IL2R α KO/hPD1	ND	NC	4,423E-10	1,948E-10	1,865E-10	1,913E-10
YT/Stat5-Luc/hIL2R α /hPD1	ND	9,714E-10	2,316E-11	1,668E-11	5,777E-11	3,533E-11

NC: Не вычислено, поскольку данные не соответствуют 4-параметрическому логистическому уравнению.

ND: Не определено, поскольку не наблюдали зависимый от концентрации ответ.

Таблица 10. Значения EC_{50} ненацеленного IL2R α -IL2 и анти-PD1-IL2R α -IL2 конструкций в присутствии анти-PD1 антитела и изотипического контроля

		-	Изотипический контроль	REGN2810	Сравнение 1	Сравнение 2
Ненацеленный IL2R α -IL2	YT/STAT5-Luc/IL2R α KO/hPD1	NC	NC	NC	NC	NC
	YT/STAT5-Luc/hIL2R α /hPD1	7,033E-10	7,906E-10	6,506E-10	9,182E-10	9,376E-10
REG10486	YT/STAT5-Luc/IL2R α KO/hPD1	9,388E-11	1,295E-10	NC	NC	NC
	YT/STAT5-Luc/hIL2R α /hPD1	1,499E-11	2,018E-11	5,860E-10	6,927E-10	4,531E-10
REGN10595	YT/STAT5-Luc/IL2R α KO/hPD1	2,499E-10	3,623E-10	4,550E-10	3,480E-10	2,941E-10
	YT/STAT5-Luc/hIL2R α /hPD1	5,300E-11	6,223E-11	1,375E-10	1,335E-10	1,531E-10
REGN10597	YT/STAT5-Luc/IL2R α KO/hPD1	1,285E-10	1,317E-10	2,216E-10	3,058E-10	2,807E-10
	YT/STAT5-Luc/hIL2R α /hPD1	5,448E-11	7,094E-11	1,172E-10	7,649E-11	8,046E-11

NC: Не вычислено, поскольку данные не соответствуют 4-параметрическому логистическому уравнению.

Таблица 11. Значения EC₅₀ и максимального высвобождения IFN γ для первичных Т-клеток, обработанных IL2, анти-PD1 или анти-PD1-IL2R α -IL2 конструкциями

	Максимальный IFN γ (пг/мл)		EC ₅₀ (М)	
	Raji/ CD80 KO/ CD86 KO	Raji/ CD80 KO/ CD86 KO/ hPD-L1	Raji /CD80 KO/ CD86 KO	Raji/CD80 KO/ CD86 KO/ hPD-L1
Изотипический контроль 1	1512	386	ND	ND
Изотипический контроль 2	1563	343	ND	ND
Ненацеленный IL2R α -IL2	1687	859	7,325E-09	NC
REGN10486	2306	1687	NC	1,457E-09
REGN10595	2108	1157	1,096E-09	2,047E-09
REGN10597	2484	1261	4,798E-10	1,839E-09
IL2	2544	1081	4,914E-10	2,660E-10
REGN2810	1172	858	ND	1,833E-09
IL2 + REGN2810	2500	1868	3,148E-10	2,016E-10

NC: Не вычислено, поскольку данные не соответствуют 4-параметрическому логистическому уравнению.

ND: Не определено, поскольку не наблюдали зависимый от концентрации ответ.

Пример 6. *In vivo* оценка противоопухолевой активности у PD1xLAG3 гуманизированных мышей

Исследование №1

[0221] Мышам с нокином человеческим PD1 x LAG3 (описанным Burova E. et al., Mol Cancer Ther 2019 (18) (11) 2051-2062) инокулировали подкожно 3×10^5 опухолевых клеток MC38 в день 0 и рандомизировали на день 7, когда средний размер опухоли достигал 95 мм³. Затем мышам вводили внутривенно антитело изотипического контроля (0,33 мг/кг), изотип-IL2R α -IL2 (0,5 мг/кг) + анти-hPD1 антитело (0,33 мг/кг) или анти-hPD1-IL2R α -IL2 (0,5 мг/кг) + антитело изотипического контроля (0,33 мг/кг) два раза в неделю с в общем четырьмя инъекциями. Средние объемы опухолей (мм³ + SEM) в каждой группе лечения наносили на график (фиг. 1А). Размеры опухоли вычисляли как $v=ab^2/2$, где а представляет собой самый длинный диаметр опухоли, и b представляет собой перпендикулярный диаметр опухоли. Стрелки на фиг. 1А показывают дни лечения.

[0222] Также строили кривые выживаемости Каплана-Мейера для каждой группы лечения (фиг. 1B). Потерю выживаемости определяли как эвтаназию, когда опухоли показывали глубокие изъязвления или когда опухоли достигали 20 мм в любом измерении или 2250 мм³ в общем объеме.

Исследование №2

[0223] Мышам с нокином человеческого PD1 x LAG3 подкожно инокулировали 3×10^5 опухолевых клеток MC38 в день 0 и рандомизировали на день 7, когда средний размер опухоли достигал 105 мм³. Затем мышам вводили внутривенно изотип (0,5 мг/кг) или три различных клон анти-hPD1-IL2R α -IL2 (0,5 мг/кг) два раза в неделю, всего четыре инъекции. Средние объемы опухолей (мм³ + SEM) в каждой группе лечения наносили на график (фиг. 1C). Размеры опухоли вычисляли как $v=ab^2/2$, где a представляет собой самый длинный диаметр опухоли, и b представляет собой перпендикулярный диаметр опухоли. Стрелки на чертеже показывают дни лечения.

[0224] Также строили кривые выживаемости Каплана-Мейера в каждой группе лечения (фиг. 1D). Потеря выживаемости определялась как эвтаназия, когда опухоли обнаруживали глубокие изъязвления или когда опухоли достигали 20 мм в любом измерении или 2250 мм³ в общем объеме.

Результаты и заключения

[0225] В исследовании № 1 противоопухолевую эффективность анти-hPD1-IL2R α -IL2 оценивали по сравнению с комбинацией двух его отдельных компонентов, изотипа-IL2R α -IL2 и равного молярного количества родительского блокирующего анти-hPD1 антитела.

[0226] Хотя изотип-IL2R α -IL2 + анти-hPD1 не смог обеспечить эффективный контроль над опухолью в тестируемой дозе, та же молярная доза лечения анти-hPD1-IL2R α -IL2 + изотип была способна регрессировать уже сформировавшиеся опухоли, что приводило к долгосрочной выживаемости без опухолей у большинства обработанных мышей (фиг. 1A-B). Этот результат продемонстрировал превосходную противоопухолевую эффективность IL2R α -IL2, нацеленного против hPD1, по сравнению с комбинацией ненацеленного IL2R α -IL2 и родительского анти-hPD1 антитела.

[0227] В исследовании № 2 сравнивали противоопухолевую активность трех различных клонов анти-hPD1-IL2R α -IL2. Один из клонов анти-hPD1 является сильным

блокатором, тогда как два других минимально блокируют передачу сигналов hPD1. Все три клона молекулы анти-hPD1-IL2R α -IL2 продемонстрировали сравнительно мощную противоопухолевую эффективность и привели к подобным показателям долгосрочной выживаемости без опухолей (фиг. 1C-D). Этот результат показал, что доставка IL2R α -IL2, нацеленная на анти-hPD1, в большей степени, чем его блокирующая активность, в первую очередь ответственна за сильный противоопухолевый эффект терапии анти-hPD1-IL2R α -IL2. Это также указывает на возможность объединения молекулы анти-hPD1-IL2R α -IL2 с неконкурирующим реагентом, блокирующим PD1, для дальнейшего повышения его терапевтической эффективности.

Пример 7. Способность слитых конструкций анти-PD1-IL2R α -IL2 связывать рекомбинантный мономерный белок IL2R α , IL2R β или IL2R γ в растворе

Связывание человеческого рецептора IL-2 альфа

[0228] Связывание человеческого IL2R α , экспрессированного с С-концевой гексагистиридиновой меткой (hIL2R α .6H, R&D, № по каталогу 10305-RL-050), с очищенными анти-PD1 антителами со слитыми С-концевыми IL2R α -IL2 определяли с использованием биосенсорной технологии поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени с устройством Biacore S-200. Для получения поверхностей захвата hIgG, поверхности сенсора CM5 Biacore дериватизировывали путем аминного сочетания со смесью моноклональных анти-человеческий Fab антител (Cytiva, номер по каталогу 28-9583-25). Все исследования связывания Biacore проводили при 25°C в буфере, состоящем из 0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20 (рабочий буфер HBS-EP). Конструкции и контроли анти-PD1-IL2R α -IL2 захватывались на этой поверхности анти-hFab путем инъекции растворов с концентрацией 3 мкг/мл в течение 1 минуты со скоростью 8 мкл/мин. Раствор hIL2R α .6H в концентрации 1 мкМ, приготовленной в рабочем буфере HBS-EP, затем вводили поверх захваченных поверхностей слитой конструкции IL2 захваченного антитела со скоростью потока 50 мкл/мин. Ассоциацию слитых антител IL2 контролировали в течение 1 минуты с последующей 1-минутной фазой диссоциации в рабочем буфере HBS-EP. Реакции связывания измеряли в конце инъекции, и данные представлены в таблице 12. В конце каждого цикла поверхность захвата слитой конструкции анти-PD1-IL2R α -IL2 регенерировали с использованием 30-секундной инъекции 10 мМ глицина, pH 1,5.

Связывание человеческого рецептора IL-2 бета / гамма

[0229] Связывание человеческого рецептора IL2 бета (hIL2R β), экспрессируемого с С-концевой меткой мус-мус-гексагистидина (hIL2R β .mmH, REGN9169), или связывание человеческого рецептора IL2 гамма (hIL2R γ), экспрессируемого с С-концевой меткой мус-мус-гексагистидина (hIL2R γ .mmH, REGN1183) со слитыми конструкциями анти-PD1-IL2R α -IL2 определяли с использованием биосенсорной технологии поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени на устройстве Biacore S-200. Поверхность сенсора CM5 Biacore дериватизировали путем аминного сочетания со смесью моноклональных анти-человеческий Fab антител (Cytiva, номер по каталогу 28-9583-25). Все исследования связывания Biacore проводили при 25°C в буфере, состоящем из 0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20 (рабочий буфер HBS-EP). Все компоненты рецептора IL2 готовили в одном и том же буфере. Конструкции анти-PD1-IL2R α -IL2 и контроли захватывались на этой поверхности анти-hFab при инъекции растворов 3 мкг/мл в течение 1 минуты со скоростью 8 мкл/мин.

[0230] В литературе раскрыто (Liparoto, *et al. Biochemistry*. 2002), что IL2R γ обладает IL2R β или IL2R α/β -зависимой аффинностью в отношении IL2. Таким образом, добавление IL2R β позволяет сформировать обнаружимый тройной комплекс. Эксперимент по последовательному связыванию был разработан для изучения связывания IL2R γ в присутствии предварительно связанного IL2R β . На поверхностях анти-PD1-IL2R α -IL2 за 30-секундной инъекцией 1 мкМ IL2R β .mmH со скоростью 50 мкл/мин немедленно следовала 1-минутная инъекция раствора смеси 1 мкМ IL2R β .mmH и 1 мкМ IL2R γ .mmH. Регистрировали сигналы связывания в конце каждой инъекции. Результаты представлены в таблице 13. В конце каждого цикла поверхность захвата слитой конструкции анти-PD1-IL2R α -IL2 регенерировали с использованием 30-секундной инъекции 10 мМ глицина, pH 1,5.

[0231] Для вычисления активности слитых конструкций анти-PD1-IL2R α -IL2 сначала вычисляли теоретический максимальный сигнал (TRmax) на основе количества захваченного слияния анти-PD1-IL2-IL2R α , стехиометрии взаимодействия рецептора IL2 и молекулярной массы взаимодействующих белков. Затем активность слитых конструкций анти-PD1-IL2R α -IL2 выражали в процентах от вычисленного TRmax. Кроме того, процент результатов TRmax затем нормализовали по отношению к контрольным антителам (REGN1945 и REGN8512) с использованием следующей формулы:

$$\text{Нормализованная активность (\%)} = \frac{(\%TR_{\max} \text{ образец} - \%TR_{\max} \text{ REGN1945})}{(\%TR_{\max} \text{ REGN8512} - \%TR_{\max} \text{ REGN1945})} \times 100$$

		mmH (RU)			актив ности	.mmH (RU)			активно сти
REGN10486	355,1	13,3	111,5	12,0	46,4	0,8	125,7	0,6	5,5
REGN10595	324,1	15,6	101,7	15,3	61,6	2,2	114,7	1,9	12,6
REGN10597	304,3	16,8	95,5	17,6	71,9	1,4	107,7	1,3	9,3
REGN8512 (антитело, связанное с IL2)	1474,0	110,3	462,6	23,8	100,0	90,0	521,7	17,3	100,0
Изотипический контроль	611,8	3,2	192,0	1,7	0,0	-0,7	216,5	-0,3	0,0

Пример 8. Связывание с клетками слитых конструкций анти-PD1-IL2R α -IL2 и родительских моноклональных антител, охарактеризованное с помощью анализа связывания FACS

[0234] Для того, чтобы сравнить связывание hPD1 белков α hPD1-IL2R α -IL2 с соответствующими родительскими анти-hPD1 антителами, клетки YT/STAT5 luc/C14, экспрессирующие эндогенные уровни hPD1, дважды промывали промывкой FACS (PBS + 2% FBS) и ресуспендировали при 1×10^6 клеток/мл в промывке FACS. Затем клетки (100 мкл/лунка) помещали в 96-луночные планшеты с U-образным дном. Клетки центрифугировали (1200 оборотов в минуту, 5 минут) и ресуспендировали при 100 мкл/лунка различных разведений антител, перечисленных в идентификаторах клонов mAb. Титры антител готовили, начиная с концентрации 20 мкг/мл, с 6-кратным разведением с использованием промывки FACS. Клетки инкубировали с антителами в течение 30 минут при 4 °C. Несвязанные антитела затем удаляли путем двукратного промывания клеток с использованием промывки FACS. Затем клетки ресуспендировали при 100 мкл/лунка разведения 1:200 вторичного антитела APC-анти-человеческий Fc γ . Клетки инкубировали в течение 30 минут при 4 °C. Несвязанные антитела затем удаляли путем двукратного промывания клеток с использованием промывки FACS. Затем клетки ресуспендировали в 160 мкл/лунка промывки FACS и проводили тестирование связывания с использованием проточного цитометра BD FACSCanto™.

[0235] Белки анти-hPD1-IL2R α -IL2 и их соответствующие родительские анти-hPD1 антитела сравнимым образом связываются с клетками PD1+ (фиг. 2A, 2B). Связывание белков

анти-hPD1-IL2R α -IL2 демонстрирует несколько более низкую аффинность (~2x), чем соответствующие родительские моноклональные антитела.

Пример 9. Анализ обмена Fab и нативной масс-спектрометрии (МС) слитых конструкций анти-PD1-IL2R α -IL2

[0236] Обмен Fab и анализ нативной масс-спектрометрии (МС) использовали для определения конформации слитых молекул PD-1-IL2R α -IL2. Каждый из REGN10597, REGN8509, REGN2810 и REGN475 обрабатывали пептидной N-гликозидазой F (PNGase F, 1 миллиединица IUB на 10 мкг белка) при 45°C в течение 1 часа для полного удаления гликановых цепей из каждой константной области тяжелой цепи. Затем образцы дегликозилированного белка смешивали согласно фиг. 3А и Таблице 14 ниже, и каждую смесь инкубировали при 37°C в присутствии 2 мМ DTT в течение 30 минут. Обработанные белковые смеси затем подвергали эксклюзионной хроматографии с нативным обессоливанием в сочетании с масс-спектрометрическим анализом (SEC-MS) на нативной платформе LC-MS (см. предварительный патент № 10724). Обессоливание SEC проводили на колонке VEN® SEC (4,6 × 30 мм, 200 Å, 1,7 мкм) с использованием изократического потока 150 мМ ацетата аммония (рН 6,8) со скоростью потока 0,2 мл/мин. Измерение массы проводили на масс-спектрометре Thermo Q-Exactive UHMR.

Таблица 14. Смешивание REGN10597, REGN8509, REGN2810 и REGN475 для обмена Fab и нативного МС-анализа

	Компонент		Соотношение смеси (молярное соотношение)	Конечная концентрация белка
Смесь 1	REGN2810	REGN475	1:1	5 мг/мл
Смесь 2	REGN8509	REGN475	1:1	5 мг/мл
Смесь 3	REGN10597	REGN475	1:1	5 мг/мл

[0237] При разрыве дисульфидной связи шарнирной области молекулы IgG4 проходят быстрый обмен Fab, продукт которого можно отслеживать с помощью нативного МС-анализа. Контрольные эксперименты с использованием смеси двух антител IgG4 (смесь 1) или смеси одного антитела IgG4 + анти-hCD20-IL2 (смесь 2) продемонстрировали обмен Fab в

условиях частичного восстановления и обмен Fc в условиях расщепления FabRICATOR (фиг. 3B). Продукты обмена Fab или Fc не наблюдали для смеси PD1-IL2R α -IL2 + молекулы IgG4 (Смесь 3) в условиях частичного восстановления или расщепления FabRICATOR, соответственно, что позволяет предположить, что молекулы PD1-IL2R α -IL2 существуют преимущественно в неактивной форме, где сильное межцепочечное взаимодействие между IL2R α и IL2 препятствует обмену Fab (или Fc) (фиг. 3B). Таким образом, обмен Fab и анализ нативного MC показывают, что молекула анти-PD1-IL2R α -IL2 существует преимущественно в транс-секвестрированной конформации.

Пример 10. Способность конструкций анти-PD1-IL2R α -IL2 усиливать первичную активацию Т-клеток человека, как оценено с помощью анализа реакции смешанных лимфоцитов (MLR)

[0238] Способность конструкций анти-PD1-IL2R α -IL2 усиливать активацию первичных Т-клеток человека оценивали с использованием анализа реакции смешанных лимфоцитов (MLR). Аллогенные донорские PBMC будут стимулировать Т-клетки, что приводит к их пролиферации и высвобождению цитокинов. Добавление рекомбинантного IL-2 может дополнительно поддерживать активацию Т-клеток. Таким образом, этот анализ применяли для оценки того, как IL2R α -IL2, нацеленный на PD1, может влиять на пролиферацию Т-клеток и высвобождение IFN γ , которые служат индикаторами активации Т-клеток.

Выделение первичных человеческих клеток

[0239] PBMC человека выделяли из лейкопаков периферической крови 2 здоровых доноров, полученных от Precision for Medicine (донор 1) или Stem Cell Technologies (донор 2), с использованием набора EasySep™ Direct Human PBMC Isolation Kit и следуя протоколу, рекомендованному производителем. Т-клетки CD3⁺ от донора 2 выделяли из PBMC с использованием набора для выделения Т-клеток CD3⁺ человека EasySep™ от StemCell Technologies и следуя инструкциям производителя.

Процедура анализа:

[0240] Выделенные Т-клетки CD3⁺ донора 2 ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в первичной культуральной среде (среда X Vivo 15 с добавлением 10% FBS,

10 мМ HEPES, 1 мМ пирувата натрия, 1 X заменимых аминокислот и 0,01 мМ бета-меркаптоэтанола). РВМС донора 1 (10×10^6 клеток/мл) обрабатывали в течение 1 часа при $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 50 мкг/мл митомицина С, разведенного в первичной культуральной среде (для остановки роста клеток). После 3-кратного промывания первичной культуральной средой РВМС ресуспендировали и добавляли к Т-клеткам донора 2 так, чтобы окончательное соотношение Т-клеток и РВМС составляло 1:3 (1×10^6 Т-клеток + 3×10^6 РВМС на мл). После инкубации смесей CD3+ Т-клеток/РВМС в течение 6 дней Т-клетки повторно выделяли с использованием микрогранул MilteNY CD3+ Microbeads, следуя инструкциям производителя. Затем выделенные клетки выдерживали в течение 24 часов в культуральной среде первичных клеток. 100000 Т-клеток добавляли в лунки круглодонного микротитровального планшета, а свежее обработанные митомицином С РВМС донора 1 добавляли в лунки по 300000 клеток/лунка. Анти-PD1-IL2R α -IL2 (REGN10597, REGN10595 или REGN10486), контроль изотип-IL2R α -IL2 (REGN9903), анти-PD1 (REGN2810), рекомбинантный IL2 или соответствующие IgG4 и изотипические контроли IgG4 (REGN1945 и REGN7540, соответственно) титровали 1:6 в 9-точечном разведении в диапазоне от 1000 нМ до 0,595 пМ, с конечной точкой 10, не содержащей антител (представленной самой низкой точкой на кривой). Каждое условие выполняли с тремя повторениями. После 72-часовой инкубации при $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ микротитровальные планшеты центрифугировали для осаждения клеток и собирали 50 мкл супернатанта среды. Из собранного супернатанта 5 мкл тестировали с помощью анализа человеческого IFN γ AlphaLISA (PerkinElmer) в соответствии с протоколом производителя. Измерения получали с помощью устройства для считывания планшета с множеством меток Envision (PerkinElmer). Осажденные клетки ресуспендировали в среде для первичной стимуляции, содержащей 3H-тимидин (1,25 мCi/мл), и инкубировали в течение 6 часов при $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Планшеты обрабатывали с использованием устройства для сбора клеток Filtermate (PerkinElmer) и измеряли с помощью счетчика микропланшетов MicroBeta2 (PerkinElmer). Значения записывались в виде количества импульсов в минуту (CPM). Значения EC₅₀ антител определяли из четырехпараметрического логистического уравнения по 10-точечной кривой зависимости ответа от дозы с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™.

[0241] В присутствии аллогенных РВМС Т-клетки, обработанные титрованием дозы рекомбинантного IL-2, анти-PD-1-IL2R α -IL2 (REGN10597, REGN10595, REGN10486) или контроля изотип-IL2R α -IL2 (REGN9903), приводят к зависимому от дозы увеличению

высвобождения и пролиферации $IFN\gamma$ (фиг. 4А, 4В и таблица 15). Рекомбинантный IL2 приводил к самому высокому максимальному высвобождению цитокинов и наиболее мощной пролиферации, за ним следовали молекулы анти-PD1-IL2R α -IL2. IL2R α -IL2, нацеленный на изотип, по сравнению с нацеленным на PD-1, демонстрировал сниженную эффективность в отношении высвобождения и пролиферации цитокинов. REGN2810 приводил только к незначительному зависимому от дозы увеличению $IFN\gamma$, в то время как соответствующие IgG4 и изотипические контроли IgG4 (REGN1945 и REGN7540 соответственно) не влияли на высвобождение или пролиферацию цитокинов.

Таблица 15. Максимальные значения и значения EC_{50} для высвобождения и пролиферации $IFN\gamma$

Антитела	Высвобождение $IFN\gamma$		Пролиферация	
	Max [пг/мл]	EC_{50} [M]	Max [CPM]	EC_{50} [M]
REGN10486	1709,7	4,44E-09	22558	1,3E-10
REGN10595	1395,2	1,27E-09	25376	6,1E-11
REGN10597	1534,0	9,53E-09	26602	1,8E-10
REGN9903	1268,0	1,53E-08	21951	4,88E-10
REGN2810	158,3	NC	4671	ND
REGN1945	2,4	ND	4342	ND
rhIL-2	5552,6	NC	20711	NC
REGN7540	6,2	ND	5702	ND

Сокращения: ND: Не определено, поскольку не наблюдали зависимость от концентрации увеличения, NC: Не вычислено, поскольку данные не соответствуют 4-параметрическому логистическому уравнению.

Пример 11. Сравнение конструкций анти-PD1-IL2R α -IL2 и изотипический контроль-IL2R α -IL2 + анти-PD1 в анализе стимуляции первичных Т-клеток на основе Raji

[0242] Способность конструкций анти-PD1-IL2R α -IL2 усиливать активацию первичных Т-клеток человека оценивали с использованием анализа первичных Т-клеток на основе клеток Raji. Т-клетки стимулировали путем совместного культивирования с клетками

Raji, нокаутированными по CD80 и CD86 и сверхэкспрессирующими человеческий PD-L1 (Raji/ CD80 KO/CD86 KO /hPD-L1) в присутствии биспецифического антитела CD3xCD20, что приводило к высвобождению Т-клетками цитокинов. Добавление рекомбинантного IL-2 может дополнительно поддерживать активацию Т-клеток. Таким образом, этот анализ применяли для оценки того, как IL2R α -IL2, нацеленный на PD1, может влиять на высвобождение IFN γ Т-клетками, что служит индикатором активации Т-клеток.

Выделение человеческих первичных клеток:

PBMC человека выделяли из лейкопаков периферической крови здорового донора, полученных от Precision for Medicine, с использованием набора EasySep™ Direct Human Isolation Kit и следуя протоколу, рекомендованному производителем. Т-клетки CD3⁺ выделяли из PBMC с использованием набора для выделения CD3⁺ Т-клеток человека EasySep™ от StemCell Technologies и следуя инструкциям производителя.

Процедура анализа Т-клеток на основе Raji:

[0243] Т-клетки центрифугировали, ресуспендировали в стимулирующей среде (среда X Vivo 15, дополненная 10% FBS, 10 mM HEPES, 1 mM пирувата натрия, 1X заменимых аминокислот и 0,01 mM бета-меркаптоэтанола) и высевали 1×10^5 клеток/лунка в 96-луночные круглодонные планшеты. Клетки Raji/CD80 KO/CD86 KO/hPD-L1 (1×10^7 клеток/мл) обрабатывали в течение 1 часа при 37°C/5% CO₂ 20 мг/мл митомицина C, разведенного в стимулирующей среде, чтобы остановить рост клеток. Затем клетки промывали 3 раза D-PBS, содержащим 2% FBS, ресуспендировали в стимулирующей среде и добавляли 5×10^4 клеток на лунку. Затем добавляли 0,5 нМ биспецифического антитела анти-CD3 x анти-CD20 (REGN1979) вместе с 20 нМ постоянного изотипического контроля (REGN1945) или анти-PD1 (REGN2810). Титрование либо изотипического контроля (REGN7540), либо антитела изотип-IL2R α -IL2 (REGN9903), либо анти-PD1 антитела с VR из mAb9048 (REGN15187), либо анти-PD1-IL2R α -IL2 (REGN10597), либо эквимольного титрования REGN9903 + REGN15187 добавляли в лунки в 9-точечном серийном разведении 1:6 в диапазоне от 500 нМ до 0,3 пМ на молекулу, при этом точка 10 разведения содержала только 0,5 нМ константы REGN1979 и 20 нМ REGN2810 или REGN1945. Каждое условие выполняли в двух повторениях. Планшеты инкубировали в течение 96 часов при 37°C/5% CO₂. Количественное определение IFN γ проводили в супернатанте клеточной культуры с использованием анализа AlphaLISA в

соответствии с протоколом производителя. Измерения получали с помощью устройства для считывания планшетов с множеством меток Envision (Perkin Elmer). Значения EC₅₀ цитокинов определяли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™ из четырехпараметрического логистического уравнения на 10-точечной кривой зависимости ответа от дозы, где точка 10 разведения содержала только 0,5 нМ константы REGN1979 и 20 нМ REGN2810 или REGN1945.

Результаты

[0244] В присутствии Raji/CD80 KO/CD86 KO/hPDL1 Т-клетки, обработанные титрованием дозы изотип-IL2R α -IL2 (REGN9903) или анти-PD1-IL2R α -IL2 (REGN10597) в присутствии или в отсутствие REGN2810, приводили к неожиданно значительному зависимому от дозы увеличению высвобождения IFN γ (таблица 16 и фиг. 5A, 5B). Молекула анти-PD1-IL2R α -IL2 приводила к самому высокому максимальному высвобождению цитокинов, за ней следовала молекула изотип-IL2R α -IL2 отдельно или в сочетании с анти-PD1 антителом REGN15187. Соответствующие IgG4 и изотипические контроли IgG4 (REGN1945 и REGN7540 соответственно) не влияли на высвобождение IFN γ .

Таблица 16. максимальные значения высвобождения IFN γ

	Максимальное высвобождение IFN γ [пг/мл]	
	Постоянное – 20 нМ REGN1945	Постоянное – 20 нМ REGN2810
REGN7540	5,1	75,0
REGN9903	46,9	110,6
REGN15187	17,0	79,5
REGN9903 + REGN15187	47,6	140,0
REGN10597	133,0	258,5

Пример 12. *In vivo* противоопухолевая эффективность и профиль безопасности анти-PD1-IL2R α -IL2 слитых конструкций

[0245] В первом эксперименте оценивали противоопухолевую эффективность одного агента REGN10597 *in vivo*. Мышам с нокином человеческого PD1 x LAG3 (описанным

в Vugova E. et al., 2019) подкожно инокулировали 3×10^5 опухолевых клеток MC38 в день 0 и рандомизировали на день 7, когда средний размер опухоли достигал 105 мм^3 . Мышам в каждой рандомизированной группе два раза в неделю вводили внутривентральные инъекции указанных молекул при определенных уровнях доз в общей сложности с четырьмя инъекциями. Средние объемы опухолей ($\text{мм}^3 + \text{стандартное отклонение}$) в каждой группе лечения наносили на графики (фиг. 6A). Размеры опухоли рассчитывали как $v = a \cdot b^2 / 2$, где a представляет собой самый длинный диаметр опухоли, а b представляет собой перпендикулярный диаметр опухоли. Стрелками на чертеже указаны дни лечения. Были показаны индивидуальные кривые роста опухоли и частота мышей, у которых произошло полное исключение опухоли в каждой группе лечения (фиг. 6B).

[0246] Монотерапия REGN10597 в дозах 0,5 или 1 мг/кг продемонстрировала превосходную противоопухолевую активность по сравнению с комбинацией REGN9904 в дозе 1 мг/кг и REGN2810 в дозе 10 мг/кг, что привело к более высокой частоте полной регрессии опухоли у обработанных мышей. Промежуточную противоопухолевую эффективность также наблюдали при лечении REGN10597 в дозе 0,2 мг/кг (фиг. 6A, 6B).

[0247] Во втором эксперименте профили активности и токсичности REGN10597 *in vivo* сравнивались с таковыми у препарата сравнения REGN13233, мутеина IL2, направленного против PD1, с прекращенным связыванием с IL2Ra. Мышам с нокином человеческого PD1 x LAG3 (описанным в Vugova E. et al., 2019) подкожно инокулировали 3×10^5 опухолевых клеток MC38 в день 0 и рандомизировали на день 7, когда средний размер опухоли достигал 70 мм^3 . Мышам в каждой рандомизированной группе два раза в неделю вводили внутривентральные инъекции указанных молекул при определенных уровнях доз в общей сложности с четырьмя инъекциями. Средние объемы опухолей ($\text{мм}^3 + \text{стандартное отклонение}$) наносили на график (фиг. 6C), строили кривые выживаемости Каплана-Мейера (фиг. 6D) и процента изменений массы тела (среднее + стандартное отклонение) (фиг. 6E) в каждой группе лечения. Стрелки на фиг. 6A указывают дни лечения. Частота мышей, у которых произошло полное исключение опухоли, была указана для выбранных групп (фиг. 6D). На день 13 кровь всех групп собирали и анализировали методом проточной цитометрии. Подсчеты общего количества лейкоцитов показаны (фиг. 6F).

[0248] Монотерапия как REGN10597, так и REGN13233 продемонстрировала превосходную противоопухолевую эффективность по сравнению с комбинацией REGN2810 с соответствующими ненацеленными контролями (REGN9904 для REGN10597, REGN13234 для

REGN13233) и продемонстрировала полную регрессию опухоли у большинства обработанных мышей в обеих группах (фиг. 6C, 6D).

[0249] Однако, в отличие от REGN10597, который не вызывал явного изменения массы тела у обработанных мышей, та же доза лечения REGN13233 приводила к значительной потере массы тела, что сопровождалось заметным увеличением циркулирующих лимфоцитов (фиг. 6E). Эта разница в токсичности, вероятно, была связана с различными фрагментами IL-2 в REGN10597 и REGN13233, поскольку в группе, получавшей REGN13234, наблюдали подобную потерю массы тела и увеличение количества лейкоцитов (фиг. 6E, 6F). Дальнейшее иммунофенотипирование лейкоцитов с помощью многопараметрической проточной цитометрии показало, что REGN10597 более селективно увеличивает количество Т-клеток PD-1 + CD4 и CD8, тогда как REGN13233 не только увеличивает количество этих клеток, но также значительно увеличивает популяции CD44 + CD62L + CD8 Т-клеток и NK-клеток.

[0250] Эти результаты показали, что хотя REGN10597 и молекула сравнения REGN13233 продемонстрировали высокую противоопухолевую эффективность, REGN10597 имеет лучший профиль безопасности, вероятно, из-за его способности более селективно увеличивать PD1 + Т-клетки *in vivo* по сравнению с REGN13233, который увеличивает более широкие популяции CD8⁺ Т- и NK-клеток.

[0251] В третьем эксперименте противоопухолевую эффективность *in vivo* REGN10597 сравнивали с эффективностью aPD1-IL2-IL2R α , молекулы, которая содержит все те же части, что и REGN10597, но фрагменты IL2 и IL2R α слиты друг с другом в обратном порядке. Мышам с нокином человеческого PD1 x LAG3 (описанным в Burova E. et al., 2019) подкожно инокулировали 3×10^5 опухолевых клеток MC38 в день 0 и рандомизировали на день 9, когда средний размер опухоли достигал 120 мм³. Затем мышам в каждой группе еженедельно внутрибрюшинно вводили указанные молекулы в определенных дозах посредством двух общих инъекций (фиг. 6G). Были построены средние объемы опухолей (мм³ + стандартное отклонение) в каждой группе лечения. Размеры опухоли рассчитывали как $v = a \cdot b^2 / 2$, где a представляет собой самый длинный диаметр опухоли, и b представляет собой перпендикулярный диаметр опухоли. Стрелки на фигуре указывают дни лечения (фиг. 6H). Также были показаны кривые выживаемости Каплана-Мейера в каждой группе лечения. Потеря выживаемости определялась как эвтаназия, когда опухоли обнаруживали глубокие изъязвления или когда опухоли достигали 20 мм в любом измерении или 2250 мм³ в общем

объеме. Для выбранных групп были указаны частоты мышей, у которых произошло полное исключение опухоли.

[0252] В отличие от REGN10597, который проявлял выраженную противоопухолевую активность *in vivo*, та же или более высокая доза aPD1-IL2-IL2Ra продемонстрировала минимальный контроль роста опухоли. Этот результат показал, что правильный порядок слияния IL2Ra-IL2 в REGN10597 имеет решающее значение для его мощной противоопухолевой активности *in vivo* (фиг. 6G, 6H).

Пример 13. Проточное связывание слитых молекул Ab-IL2Ra-IL2 с рецепторами IL2

[0253] Функциональные рецепторы IL2 образуются путем дифференциальной сборки субъединиц IL2R (IL2Ra = CD25, IL2Rb = CD122 и IL2Rg = CD132), что приводит к образованию рецепторов IL2 со средней аффинностью (IL2Rb/IL2Rg) и рецепторов IL2 с высокой аффинностью (IL2Ra/IL2Rb/IL2Rg), экспрессируемых на иммунных клетках (PMID: 16293754). Способность химерных антител IL2 и IL2Ra-IL2 связываться с клетками, экспрессирующими рецептор IL2 со средней аффинностью (IL2Rb/g, нокаутированный по IL2Ra) или рецептор с высокой аффинностью (сверхэкспрессирующий IL2Rb/g и IL2Ra), оценивали с помощью проточной цитометрии.

[0254] Тогда как клетки YT эндогенно экспрессируют человеческий PD1, получали клетки, сверхэкспрессирующие PD-1 (PD1 OE). Для того, чтобы проверить связывание человеческого IL2 и химерных антител человеческого IL2Ra-IL2 (= первичное антитело) с клетками, YT/STAT5-Luc/PD1 OE репортерные клетки, эндогенно экспрессирующие все три субъединицы рецептора IL2, генетически модифицировали для отображения либо рецептора IL2 средней аффинности путем нокаута субъединицы IL2Ra (CD25 KO) или высокоаффинного рецептора путем сверхэкспрессии IL2Ra (CD25 OE) на поверхности клетки. Связывание антител с этими клетками детектировали с использованием флуоресцентно-меченного вторичного антитела методом проточной цитометрии. Кратко, клетки PD1 OE YT, которые представляли собой CD25 KO или CD25 OE, ресуспендировали в буфере для красителей (2% FBS в PBS), 3×10^5 клеток высевали на лунку в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение 30 минут на льду с 1:5 серийно разведенными первичными антителами [Изотип-IL2 (REGN8512) или Изотип-IL2Ra-IL2 (REGN9904)]. Конечная концентрация антител находилась в диапазоне от 768 фМ до 300 нМ, включая контроль без антител,

помеченный как «только вторичное». После инкубации образцы промывали ледяным буфером для красителей с последующей инкубацией с меченым AF647 антителом против человеческого IgG на льду в течение 30 минут. Несвязанное вторичные антитела удаляли, образцы один раз промывали ледяным PBS, окрашивали красителем жизнеспособности, один раз промывали ледяным буфером для красителей, фиксировали в течение 30 минут при комнатной температуре, промывали в буфере для красителей, ресуспендировали в буфере для красителей и фильтровали перед анализом на проточном цитометре iQue Plus для определения средней геометрической интенсивности флуоресценции (gMFI). Следующее уравнение применяли для вычисления максимальной кратности связывания для «только вторичное»:

$$\text{Кратность индукции} = \frac{\text{Наивысшее значение gMFI в тестируемом диапазоне доз}}{\text{Средние значения gMFI контроля без первичного антитела}}$$

Результаты

[0255] В таблице 17 приведены максимальные геометрические значения MFI и кратность индукции для химерных конструкций антитело-IL2 или антитело-IL2Ra-IL2, связывающихся с клетками, нокаутированными по CD25, или клетками со сверхэкспрессией CD25. Зависимое от дозы связывание молекулы изотипа IL2 (REGN8512) и молекулы изотипа IL2Ra-IL2 (REGN9904) наблюдали на обеих сконструированных клетках YT, экспрессирующих либо рецептор IL2R β/γ с промежуточной аффинностью (CD25 KO), либо рецептор IL2R $\alpha/\beta/\gamma$ с высокой аффинностью (CD25 OE) (фиг. 7A, 7B, таблица 17). Как и ожидалось, максимальная кратность связывания была выше для обеих конструкций на клетках CD25 OE. Однако связывание Ab-IL2Ra-IL2 было значительно снижено по сравнению с Ab-IL2 как на клеточных линиях, экспрессирующих IL2 R $\alpha/\beta/\gamma$, так и на клеточных линиях, экспрессирующих IL2R β/γ , что позволяет предположить «маскировку» IL-2 присутствием IL2Ra в слитом белке.

Таблица 17. Проточный анализ связывания IL2 - значения максимальной gMFI и кратности индукции

	Тестируемый объект	Максимальная gMFI	Кратность индукции*
CD25 KO /PD1 OE	Изотип-IL2 [REGN8512]	7,18E+04	31,2
	Изотип-IL2Ra-IL2 [REGN9904]	3,99E+03	1,704
CD25 OE /PD1 OE	Изотип-IL2 [REGN8512]	3,33E+06	1341

	Изотип-IL2Ra-IL2 [REG9904]	7,76E+04	33,11
--	----------------------------	----------	-------

*Кратность индукции определяли как наибольшее значение gMFI в тестируемом диапазоне доз относительно gMFI, наблюдаемой в отсутствие антитела.

Пример 14. Биоанализ для оценки эффективности молекул PD1-IL2R2-IL2

[0256] Функциональные рецепторы IL2 образуются путем дифференциальной сборки субъединиц IL2R (IL2Ra = CD25, IL2Rb = CD122 и IL2Rg = CD132), что приводит к образованию рецепторов IL2 со средней аффинностью (IL2R β/γ) и рецепторов IL2 с высокой аффинностью (IL2 Ra/ β/γ), экспрессируемых на иммунных клетках (PMID: 16293754).

[0257] Для оценки биологической активности химерных антител IL2 или IL2Ra-IL2 или IL-2-IL2Ra разрабатывали клеточные репортерные анализы, приводящие к активации экспрессии люциферазы, управляемой STAT5, при связывании IL2 со среднеаффинными или высокоаффинными рецепторами IL2 на сконструированных YT/STAT5-Luc. Тогда как клетки YT эндогенно экспрессируют человеческий PD1, получали клетки, сверхэкспрессирующие PD-1 (PD1 OE). YT/STAT5-Luc/PD1 OE репортерные клетки, эндогенно экспрессирующие все три субъединицы рецептора IL2, генетически модифицировали для отображения либо рецептора IL2 средней аффинности путем нокаутирования субъединицы IL2Ra (CD25 KO) или высокоаффинного рецептора путем сверхэкспрессии IL2Ra (CD25 OE) на поверхности клетки.

[0258] RPMI1640 с добавлением 10% FBS и P/S/G использовали в качестве среды для анализа для приготовления клеточных суспензий и разведений антител. За день до скрининга сконструированные репортерные клетки YT/STAT5-Luc (CD25 KO/PD1 OE и CD25 OE/PD1 OE) разводили в концентрации 3×10^5 клеток/мл. В день анализа клетки центрифугировали, ресуспендировали в аналитической среде, помещали в количестве $2,5 \times 10^4$ репортерных клеток на лунку в 96-луночные белые планшеты с плоским дном и инкубировали с изотип-IL2Ra-IL2 [REGN9903 или REGN9904], изотип-IL2-IL2Ra, изотип-IL2(3m) [REGN13234], анти-PD1 (плечо 9048)-нацеленным IL2Ra-IL2 [REGN10597], анти-PD1 (плечо 9048)-нацеленным IL2-IL2Ra или анти-PD1 (плечо 9048)-нацеленным IL2(3m) [REGN13233], серийно разведенными (1:5) в диапазоне титрования по 11 точкам (от 200 нМ до 21 фМ) (фиг. 1A, 1B, 1C, 1D) или (1:4) в диапазоне титрования по 11 точкам (от 250 нМ до 238 фМ) (фиг. 2A, 2B), и с точкой 12, не содержащей рекомбинантного белка. Планшеты инкубировали в течение 4 часов 30 минут (фиг. 1A, 1B, 1C, 1D) или 4 часов (фиг. 2A, 2B) при 37 °C/5% CO₂, и затем 100 мл реагента ONE-Glo™ (Promega) добавляли в лунки для лизирования клеток и обнаружения активности

люциферазы. Излучаемый свет измеряли в RLU на устройстве для считывания планшета с множеством меток Envision (PerkinElmer). Значения EC_{50} антител определяли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™ из четырехпараметрического логистического уравнения по 12-точечной кривой зависимости ответа от дозы. Кратность индукции вычисляли по следующему уравнению:

$$\text{Максимальная кратность индукции} = \frac{\text{Наивысшее среднее значение RLU в тестируемом диапазоне доз}}{\text{Средние значения RLU контроля без белка}}$$

Результаты

[0259] Изотип IL2Ra-IL2 (REGN9903), изотип-IL2-IL2Ra, IL2Ra-IL2, нацеленный против PD1 (REGN10597), и IL2-IL2Ra, нацеленный против PD1, приводят к зависимому от дозы увеличению экспрессии STAT5-управляемой репортерной экспрессии, как в отсутствие (фиг. 8A), и в присутствии (Фиг.8B) экспрессии IL2Ra на репортерных клетках (Таблица 18). Молекулы, нацеленные на PD-1, демонстрировали повышенную эффективность по сравнению с молекулами, нацеленными на изотип. Химерные молекулы IL2-IL2Ra проявляли пониженную активность по сравнению с химерными молекулами IL2Ra-IL2 независимо от того, присутствовала или отсутствовала экспрессия IL2Ra на репортерных клетках.

Таблица 18. Репортерный анализ IL2 сравнения антитело-IL2Ra-IL2 и антитело-IL2-IL2Ra. Значения EC_{50} и кратности индукции

	EC50 (M)		Максимальная кратность индукции*	
	CD25 KO / PD1 OE	CD25 OE / PD1 OE	CD25 KO / PD1 OE	CD25 OE / PD1 OE
Изотип-IL2Ra-IL2 [REGN9903]	NC	3,313E-10	4,37	7,00
aPD1(9048)-IL2Ra-IL2 [REGN10597]	5,781E-11	3,297E-11	5,72	7,36
Изотип-IL2-IL2Ra	NC	1,408E-09	1,25	7,78
aPD1(9048)-IL2-IL2Ra	2,052E-09	1,748E-10	4,42	7,77

NC: Не вычислено, поскольку данные не соответствуют 4-параметрическому логистическому уравнению.

*Кратность индукции представляет собой самое высокое среднее значение RLU в тестируемом диапазоне доз относительно среднего значения RLU в отсутствие антител.

[0260] Изотип IL2Ra-IL2 (REGN9903), изотип-IL2(3m) (REGN13234), IL2Ra-IL2, нацеленный против PD1 (REGN10597), и IL2(3m), нацеленный против PD1 (REGN13233), приводили к зависимому от дозы увеличению STAT5-управляемой репортерной экспрессии как в отсутствие (Фиг. 9А), так и в присутствии (Фиг. 9В) экспрессии IL2Ra на репортерных клетках (Таблица 19). Молекулы, нацеленные на PD1, демонстрировали подобную эффективность в отсутствие экспрессии IL2Ra в репортерных клетках (REGN13233: 53 пМ, REGN10597: 84 пМ) или в присутствии IL2Ra на репортерных клетках (REGN13233: 46 пМ, REGN10597: 37 пМ). В отсутствие нацеливания на PD1 химерные молекулы IL2Ra-IL2 проявляли меньшую эффективность по сравнению с химерными молекулами IL2(3m).

Таблица 19. Репортерный анализ IL2 сравнения антитело-IL2Ra-IL2 и антитело-IL2(3m). Значения EC₅₀ и кратности индукции

	EC ₅₀ (M)		Максимальная кратность индукции*	
	CD25 KO/ PD1 OE	CD25 OE/ PD1 OE	CD25 KO/ PD1 OE	CD25 OE/ PD1 OE
Isotype-IL2(3m) [REGN13234]	1,743E-09	3,875E-10	4,25	4,49
Isotype-IL2Ra-IL2 [REGN9904]	NC	7,687E-10	3,24	4,57
aPD1(9048)-IL2(3m) [REGN13233]	5,317E-11	4,644E-11	4,24	4,62
aPD1(9048)-IL2Ra-IL2 [REGN10597]	8,383E-11	3,706E-11	4,36	5,10

NC: Не вычислено, поскольку данные не соответствуют 4-параметрическому логистическому уравнению.

*Кратность индукции представляет собой самое высокое среднее значение RLU в тестируемом диапазоне доз относительно среднего значения RLU в отсутствие антител.

[0261] Настоящее изобретение не должно быть ограничено по объему конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, из приведенного выше описания и прилагаемых чертежей специалистам в данной области техники очевидными различными модификациями настоящего изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе. Предполагается, что такие модификации охватываются объемом прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, содержащий: (i) антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с человеческим белком запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1), и (ii) фрагмент интерлейкина 2 (IL2).

2. Слитый белок по п. 1, где антигенсвязывающий фрагмент содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-1 человека.

3. Слитый белок по п. 2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с PD-1 человека, представляют собой человеческое моноклональное антитело.

4. Слитый белок по любому из пп. 1-3, где антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где:

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 43, 4 или 24,

HCDR2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 45, 6 или 26,

HCDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 47, 8 или 28,

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12 или 32,

LCDR2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, и

LCDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 16 или 35.

5. Слитый белок по п. 4, где антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие соответствующие аминокислотные последовательности согласно (i) SEQ ID NO: 43, 45, 47, 12, 14 и 16, (ii) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 и 16 или (iii) SEQ ID NO: 24, 26, 28, 32, 14 и 35.

6. Слитый белок по п. 4 или 5, где антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие соответствующие аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 43, 45, 47, 12, 14 и 16.

7. Слитый белок по любому из пп. 1-6, где антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41, 2 или 22, и переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10 или 30.

8. Слитый белок по п. 7, где HCVR содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, и LCVR содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10.

9. Слитый белок по п. 7, где HCVR содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 22, и LCVR содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 30.

10. Слитый белок по п. 7, где HCVR содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41, и LCVR содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10.

11. Слитый белок по любому из пп. 1-10, где антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 55 и константную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 56.

12. Слитый белок по любому из пп. 1-11, где антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 61, 57 или 59, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 62, 58 или 60.

13. Слитый белок по любому из пп. 1-12, где антигенсвязывающий фрагмент содержит пару последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи согласно SEQ ID NO: 61/62, 57/58 или 59/60.

14. Слитый белок по любому из пп. 1-13, где антигенсвязывающий фрагмент содержит пару последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи согласно SEQ ID NO: 61/62.

15. Слитый белок по любому из пп. 1-14, где фрагмент IL2 содержит (i) IL2 или его фрагмент и (ii) рецептор IL2 альфа (IL2R α) или его фрагмент.

16. Слитый белок по п. 15, где IL2 или его фрагмент представляет собой человеческий IL2 (hIL2) или его фрагмент.

17. Слитый белок по п. 16, где IL2R α или его фрагмент представляет собой человеческий IL2R α (hIL2R α) или его фрагмент.

18. Слитый белок по любому из пп. 15-17, где IL2 или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53.

19. Слитый белок по любому из пп. 15-17, где IL2R α или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 51.

20. Слитый белок по любому из пп. 15-19, где IL2 или его фрагмент соединен с С-концом IL2R α или его фрагмента через линкер.

21. Слитый белок по любому из пп. 1-20, где фрагмент IL2 соединен с С-концом константной области тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента через линкер.

22. Слитый белок по п. 20 или 21, где линкер содержит аминокислотную последовательность одного или нескольких повторов GGGGS (SEQ ID NO: 67).

23. Слитый белок по любому из пп. 20-22, где линкер содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 50 или 52.

24. Слитый белок по любому из пп. 1-23, где фрагмент IL2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54.

25. Слитый белок, содержащий: (i) первый полипептид, содержащий вариабельную область легкой цепи (LCVR) человеческого антитела, которое специфически связывается с PD-1 человека, и (ii) второй полипептид, который содержит (a) вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) антитела, которое специфически связывается с PD-1 человека, и (b) фрагмент IL2.

26. Слитый белок по п. 25, где HCVR содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и LCVR содержит три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где:

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 43, 4 или 24,

HCDR2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 45, 6 или 26,

HCDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 47, 8 или 28,

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12 или 32,

LCDR2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, и

LCDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 16 или 35.

27. Слитый белок по п. 26, где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности согласно (i) SEQ ID NO: 43, 45, 47, 12, 14 и 16, (ii) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 и 16 или (iii) SEQ ID NO: 24, 26, 28, 32, 14 и 35.

28. Слитый белок по п. 26 или 27, где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 43, 45, 47, 12, 14 и 16, соответственно.

29. Слитый белок по любому из пп. 25-28, где HCVR и LCVR содержат аминокислотные последовательности согласно (i) SEQ ID NO: 41 и 10, (ii) SEQ ID NO: 2 и 10 или (iii) SEQ ID NO: 22 и 30.

30. Слитый белок по любому из пп. 25-29, где первый полипептид содержит константную область легкой цепи, связанную с LCVR.

31. Слитый белок по п. 30, где константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 56.

32. Слитый белок по любому из пп. 25-31, где второй полипептид содержит константную область тяжелой цепи, связанную с HCVR, и где фрагмент IL2 связан с С-концом константной области тяжелой цепи.

33. Слитый белок по п. 32, где константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55.

34. Слитый белок по любому из пп. 25-33, где первый полипептид содержит последовательность легкой цепи согласно SEQ ID NO: 62, 58 или 60.

35. Слитый белок по любому из пп. 25-34, где второй полипептид содержит последовательность тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 61, 57 или 59.

36. Слитый белок по любому из пп. 25-35, содержащий пару последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи согласно SEQ ID NO: 61/62, 57/58 или 59/60.

37. Слитый белок по любому из пп. 25-36, содержащий пару последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи согласно SEQ ID NO: 61/62.

38. Слитый белок по любому из пп. 25-37, где фрагмент IL2 содержит (i) IL2 или его фрагмент и (ii) IL2R α или его фрагмент.

39. Слитый белок по любому из пп. 25-38, где фрагмент IL2 соединен с С-концом константной области тяжелой цепи через линкер.

40. Слитый белок по п. 38 или 39, где IL2 или его фрагмент соединен с С-концом IL2R α или его фрагмента через линкер.

41. Слитый белок по любому из пп. 38-40, где IL2 или его фрагмент представляет собой человеческий IL2 (hIL2) или его фрагмент.

42. Слитый белок по любому из пп. 38-41, где IL2R α или его фрагмент представляет собой человеческий IL2R α (hIL2R α) или его фрагмент.
43. Слитый белок по любому из пп. 38-42, где IL2 или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53.
44. Слитый белок по любому из пп. 38-43, где IL2R α или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 51.
45. Слитый белок по любому из пп. 40-44, где линкер содержит аминокислотную последовательность одного или нескольких повторов GGGGS (SEQ ID NO: 67).
46. Слитый белок по п. 45, где линкер содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 50 или 52.
47. Слитый белок по любому из пп. 25-46, где фрагмент IL2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54.
48. Слитый белок по любому из пп. 25-47, где первый полипептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 62, 58 или 60.
49. Слитый белок по любому из пп. 25-48, где второй полипептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 63, 64 или 65.
50. Слитый белок по любому из пп. 25-49, где первый полипептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 58, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 64.
51. Слитый белок по любому из пп. 25-49, где первый полипептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 60, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 63.
52. Слитый белок по любому из пп. 25-49, где первый полипептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 62, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 65.
53. Слитый белок по любому из пп. 1-52, где слитый белок образует димерный слитый белок.
54. Слитый белок по любому из пп. 1-53, где слитый белок димеризуется через его соответствующие константные области тяжелой цепи.
55. Слитый белок по любому из пп. 1-54, где слитый белок не конкурирует перекрестно с REGN2810, пембролизумабом или ниволумабом за связывание с PD-1.

56. Слитый белок по любому из пп. 1-55, где слитый белок проявляет сниженную активность в активации комплексов $IL2R\alpha/\beta/\gamma$ и $IL2R\beta/\gamma$ человека по сравнению с $IL2$.

57. Слитый белок по любому из пп. 1-56, где слитый белок проявляет повышенную активность в активации человеческого $IL2R\alpha$ по сравнению с ненацеленным $IL2R\alpha$ - $IL2$.

58. Слитый белок по любому из пп. 1-57, где слитый белок проявляет повышенную активность в стимуляции Т-клеток, как измерено по уровню высвобождения $IFN-\gamma$, по сравнению с человеческим $IL2$ дикого типа.

59. Слитый белок по любому из пп. 1-58, где слитый белок проявляет ослабленное связывание с $IL2R\alpha$, $IL2R\beta$ и $IL2R\gamma$.

60. Нуклеиновая кислота или множество нуклеиновых кислот, содержащие полинуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок по любому из пп. 1-59.

61. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту или множество нуклеиновых кислот по п. 60.

62. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту или множество нуклеиновых кислот по п. 60 или вектор по п. 61.

63. Клетка-хозяин по п. 62, экспрессирующая первый вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, которая кодирует первый полипептид слитого белка, как указано в любом из пп. 25-59, и второй вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, которая кодирует второй полипептид слитого белка, как указано в любом из пп. 25-59.

64. Способ получения слитого белка по любому из пп. 1-59, предусматривающий культивирование клетки-хозяина по п. 62 или 63 в условиях, позволяющих продукцию слитого белка или фрагмента, и выделение полученного таким образом слитого белка или его фрагмента.

65. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок по любому из пп. 1-59.

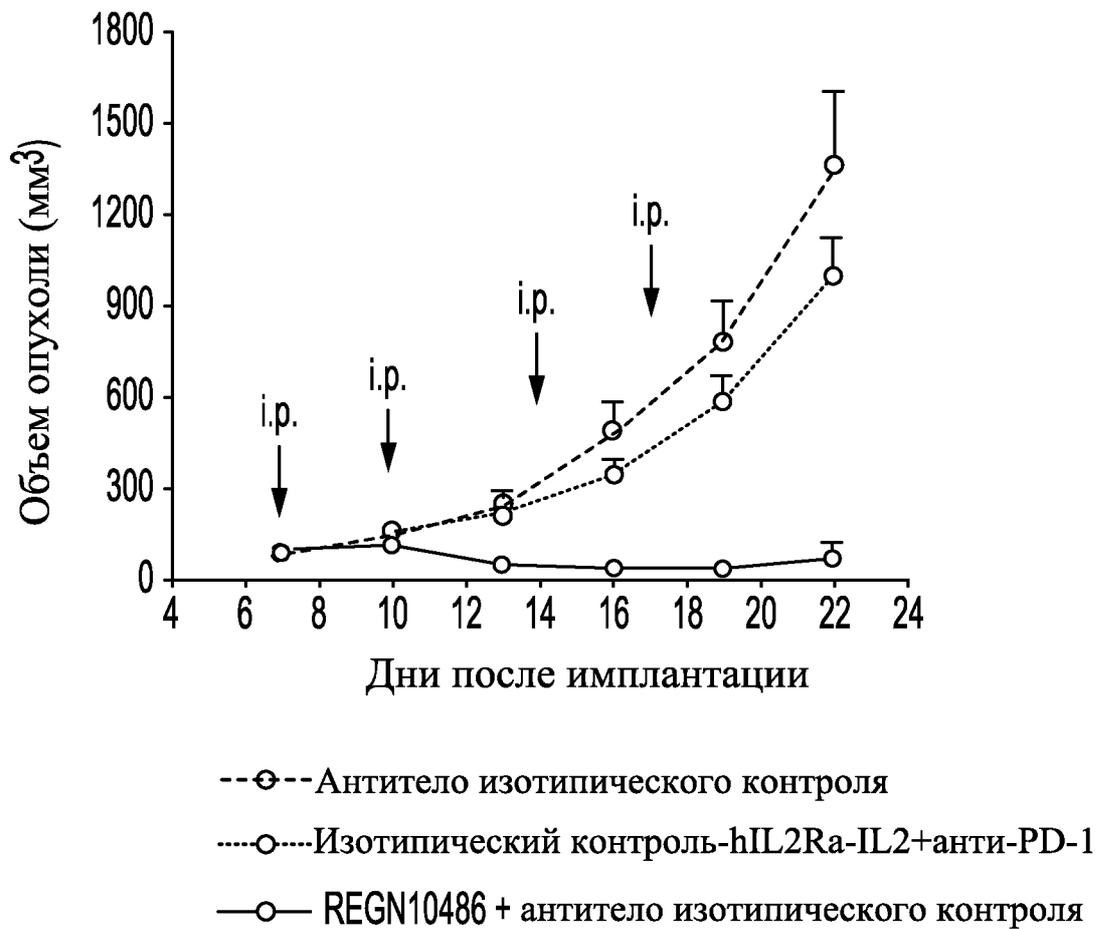
66. Фармацевтическая композиция по п. 65, дополнительно содержащая анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

67. Фармацевтическая композиция по п. 66, где анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не конкурируют перекрестно со слитым белком за связывание с PD-1.

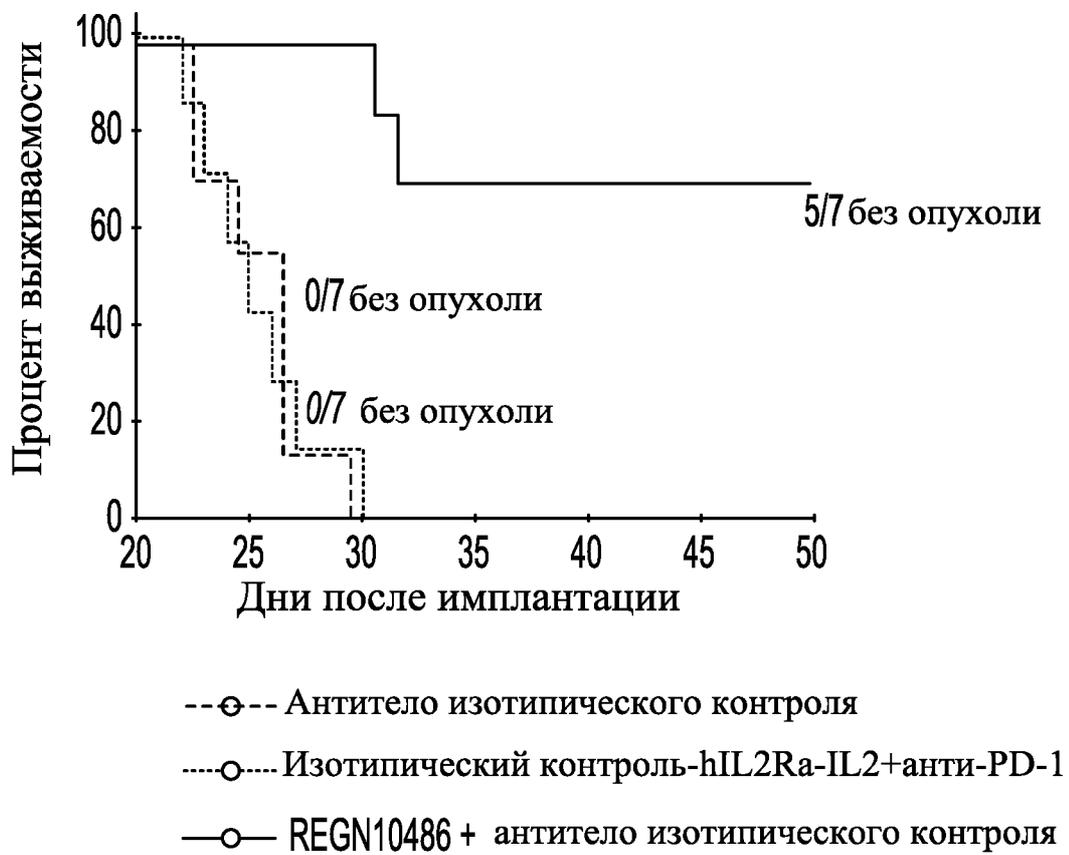
68. Способ лечения рака, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества слитого белка по любому из пп. 1-59 или фармацевтической композиции по любому из пп. 65-67.

69. Способ по п. 68, предусматривающий введение субъекту слитого белка в количестве от 0,005 мг/кг до 10 мг/кг массы тела субъекта.

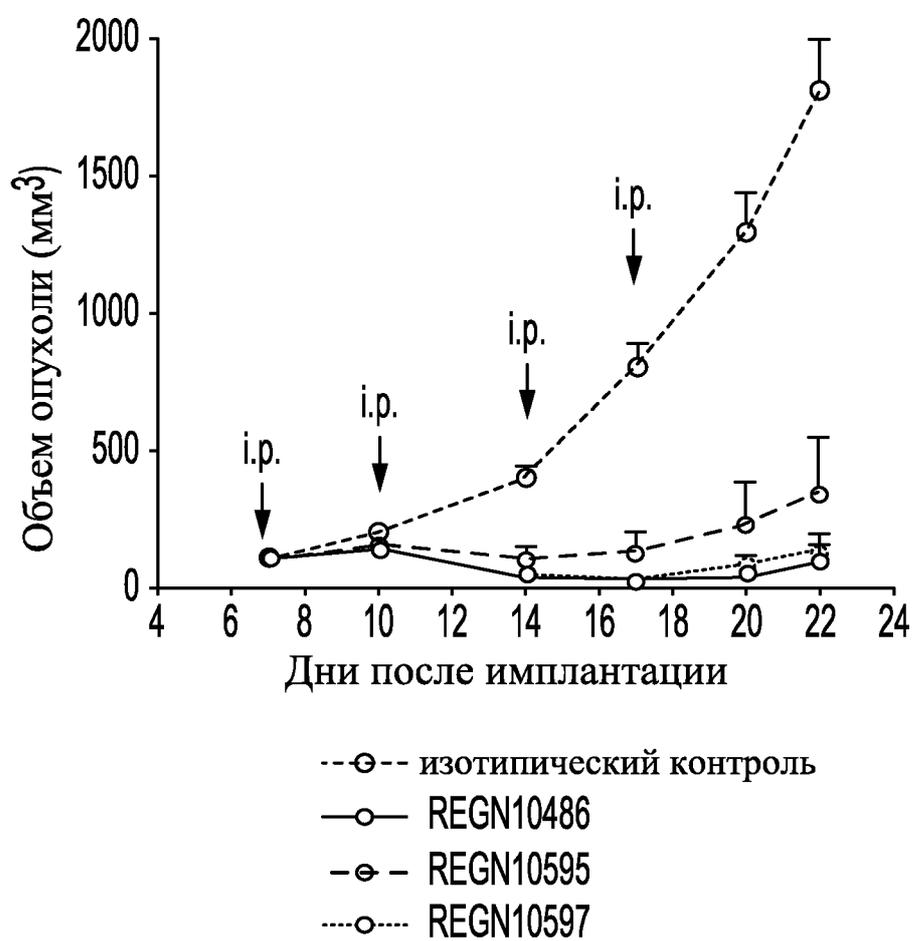
70. Способ по п. 68 или 69, дополнительно предусматривающий введение субъекту второго терапевтического средства или терапии.



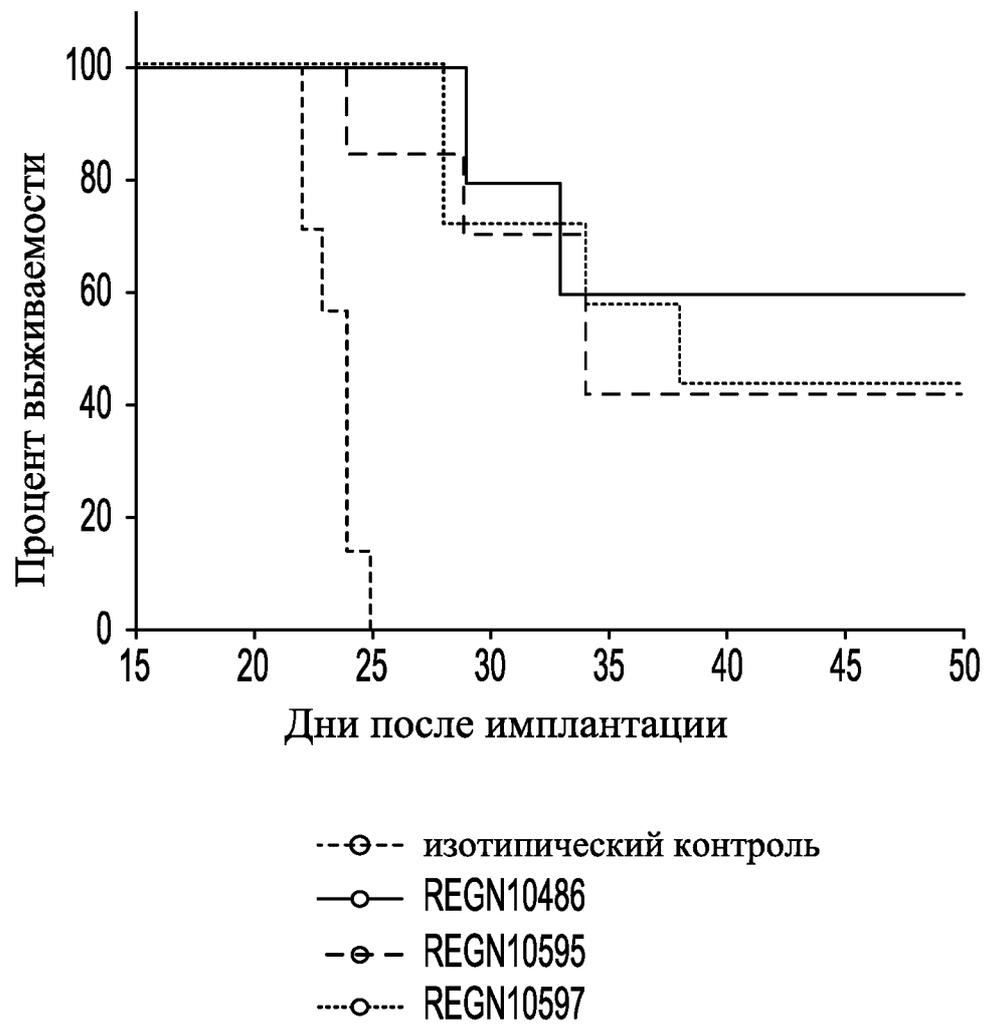
Фиг. 1А



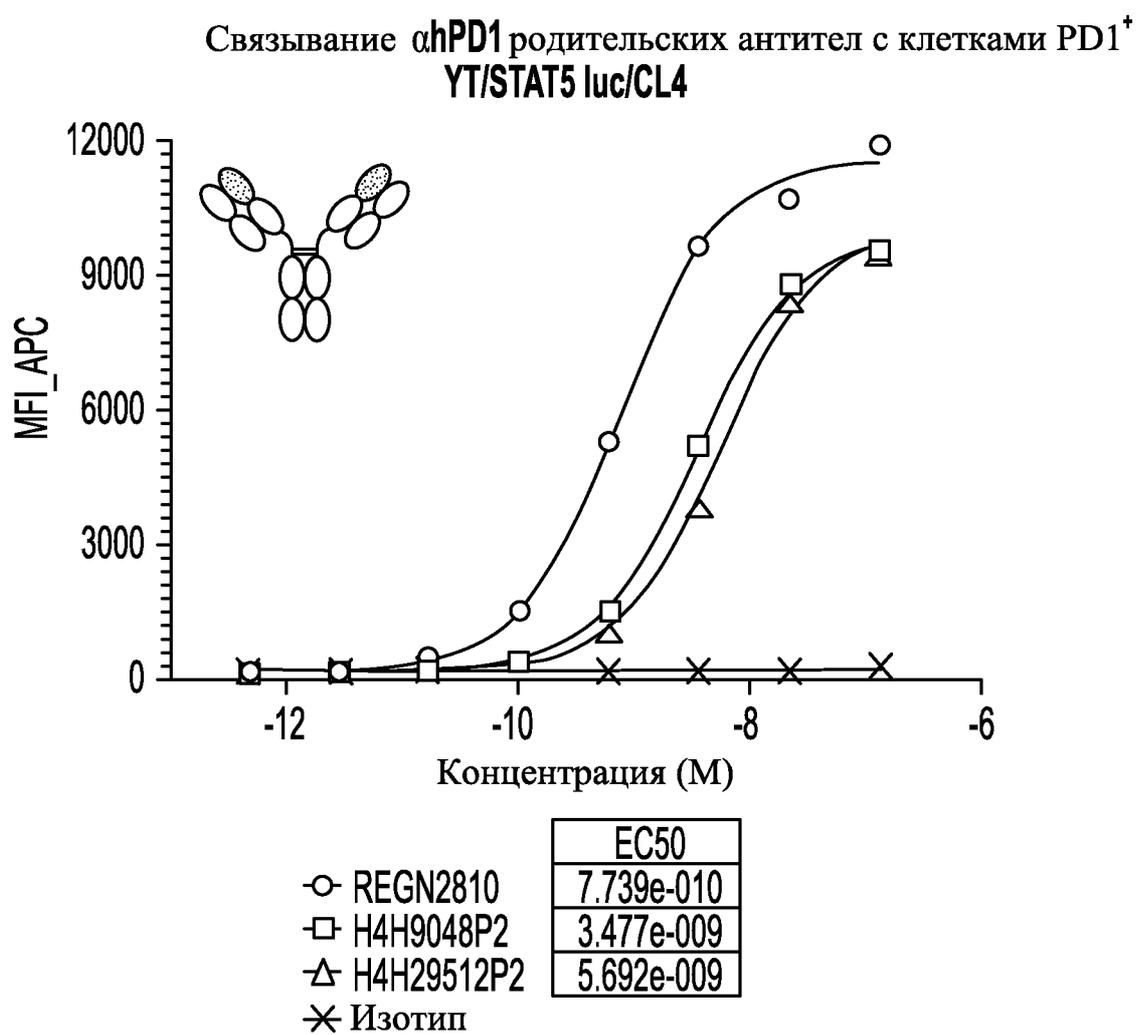
Фиг. 1В



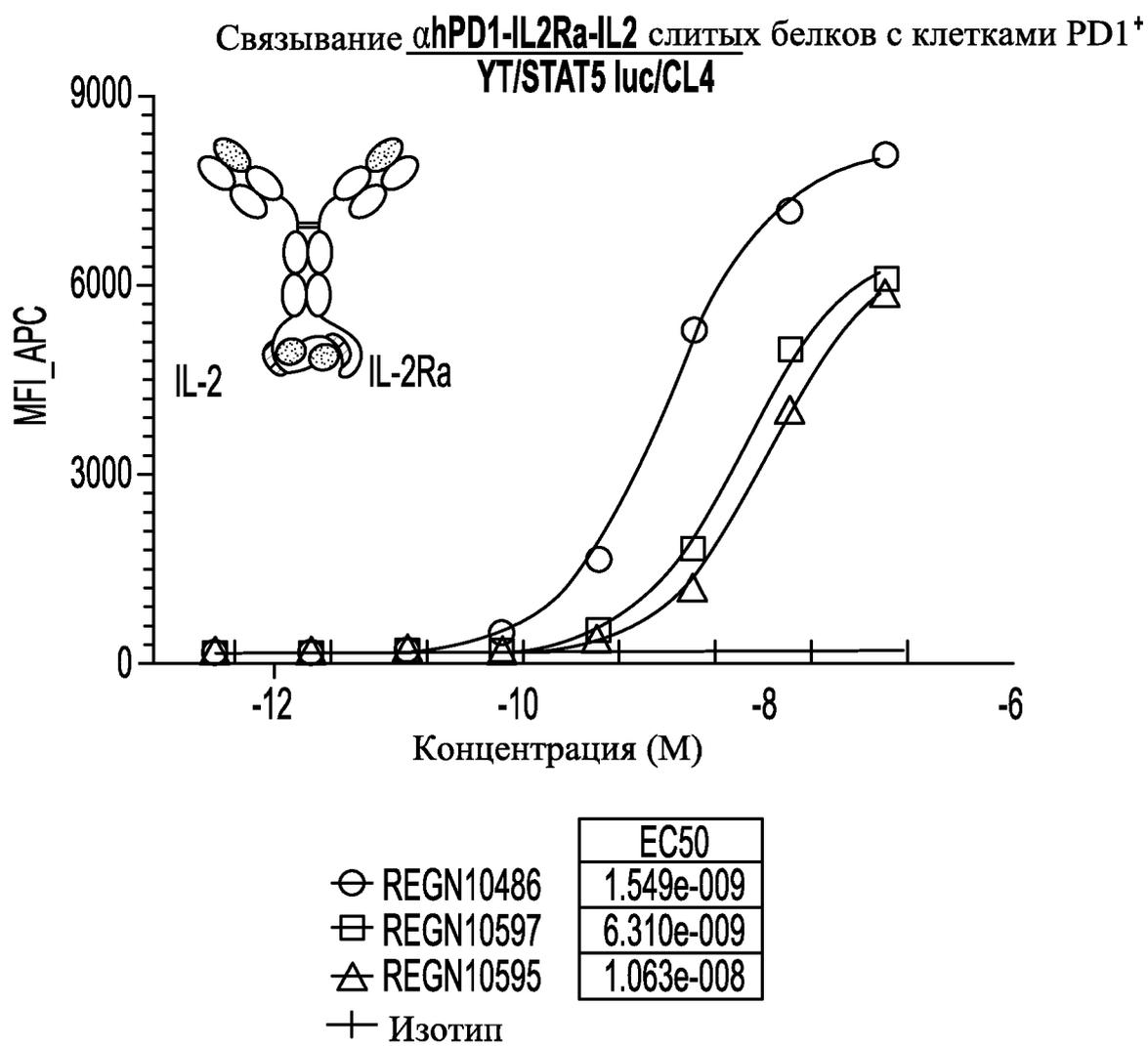
Фиг. 1С



Фиг. 1D



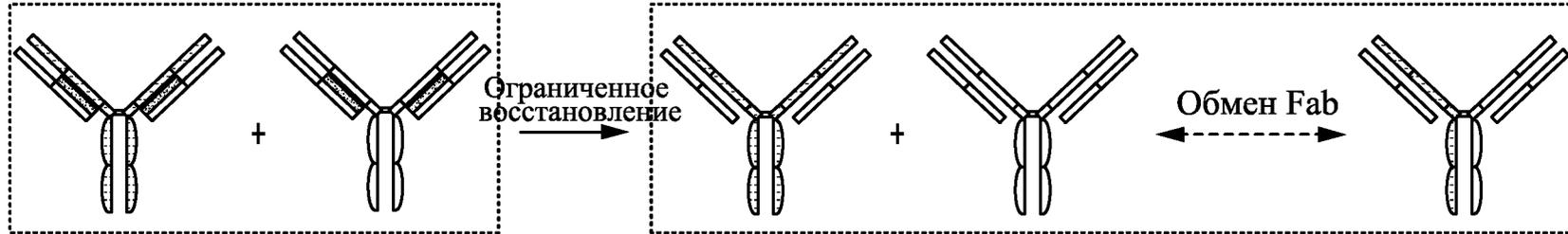
Фиг. 2А



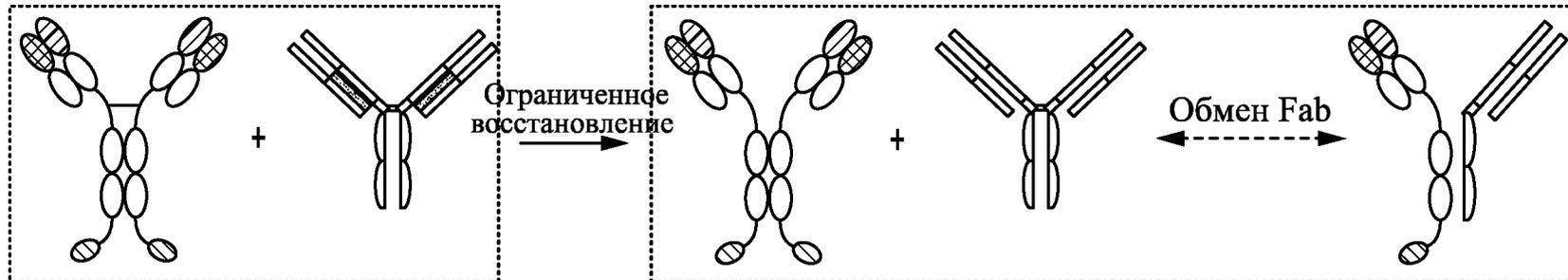
Фиг. 2В

Экспериментальная модель

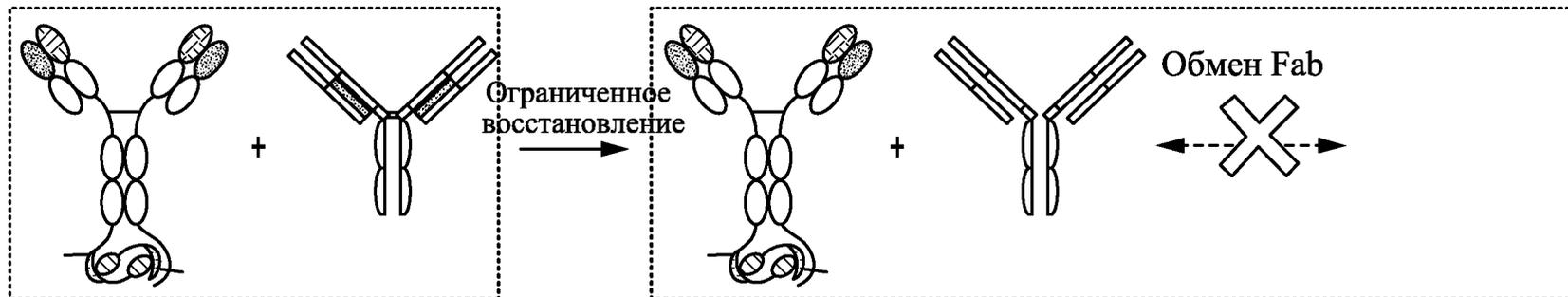
Контрольный эксперимент 1: *REGN2810*+ *REGN475* (две различные молекулы IgG4)



Контрольный эксперимент 2: *REGN8509* (анти-*hCD20-IL2*) + *REGN475* (ожидаемый обмен Fab)



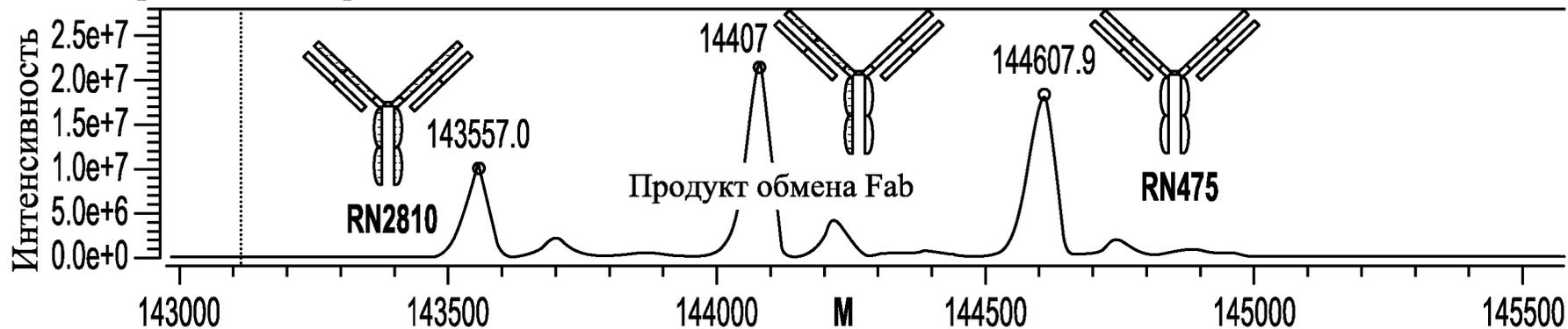
aPD1-IL2Ra-IL2 + *REGN475*



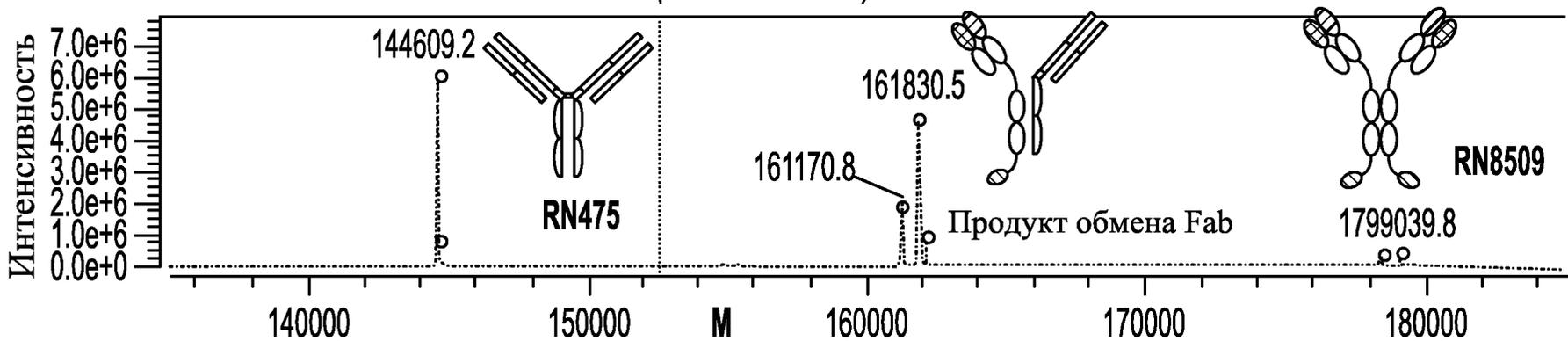
Фиг. 3А

Результат: деконволюированный нативный масс - спектр

Контрольный эксперимент 1: *REGN2810*+ *REGN475*

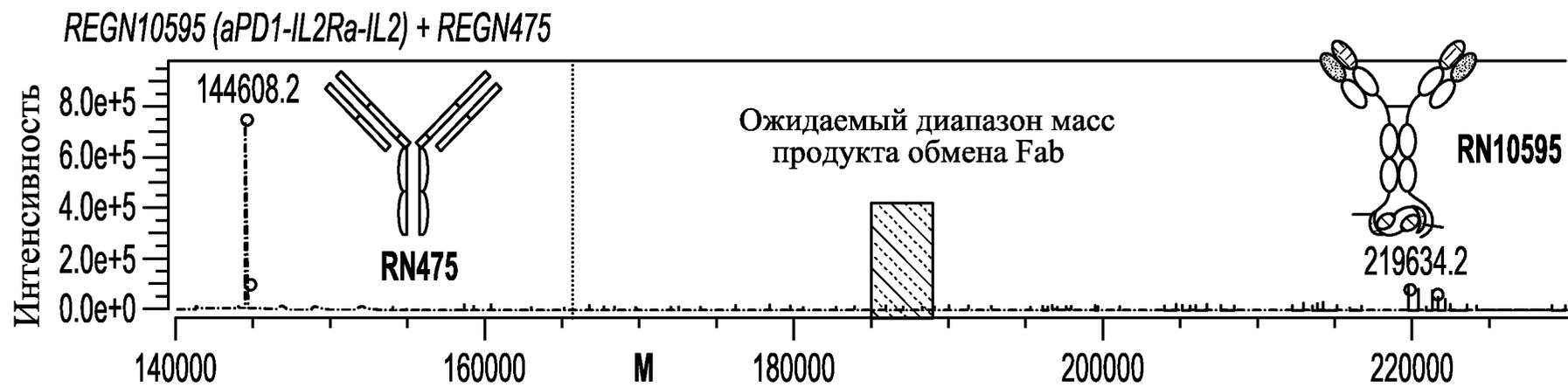


Контрольный эксперимент 2: *REGN8509* (анти-*hCD20-IL2*) + *REGN475*

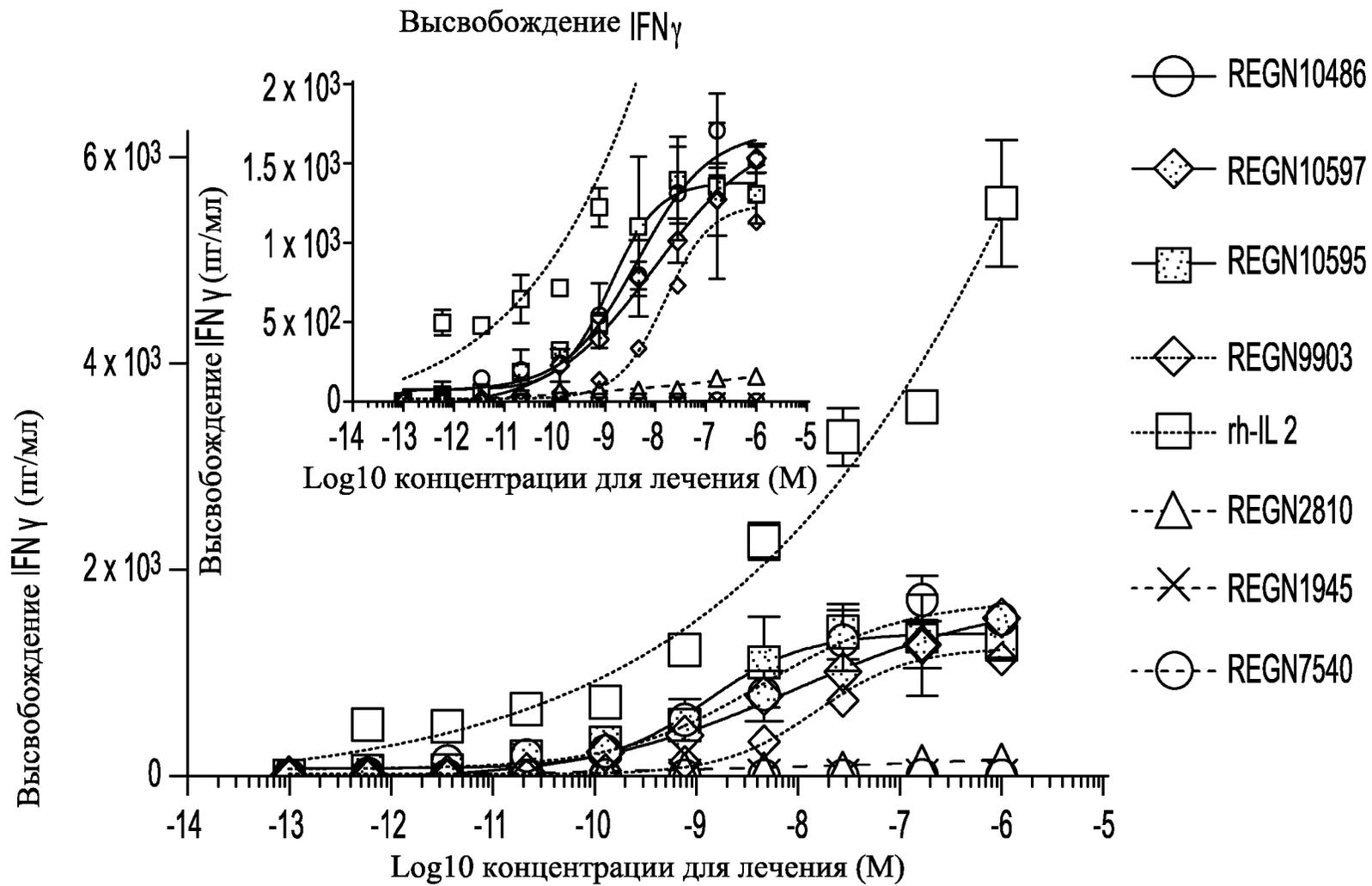


Фиг. 3В

Результат: деконволюированный нативный масс - спектр

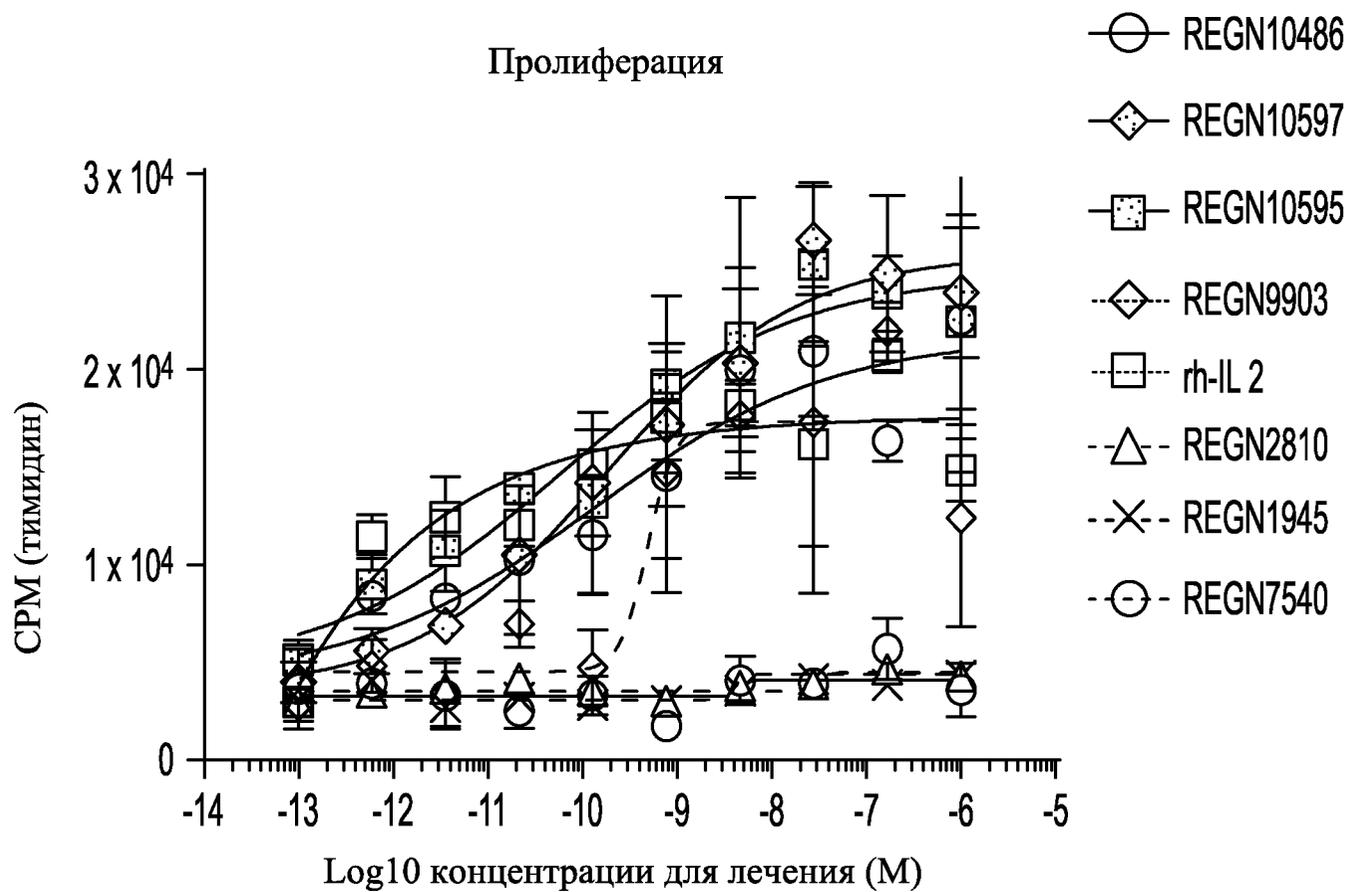


Фиг. 3В (продолжение)

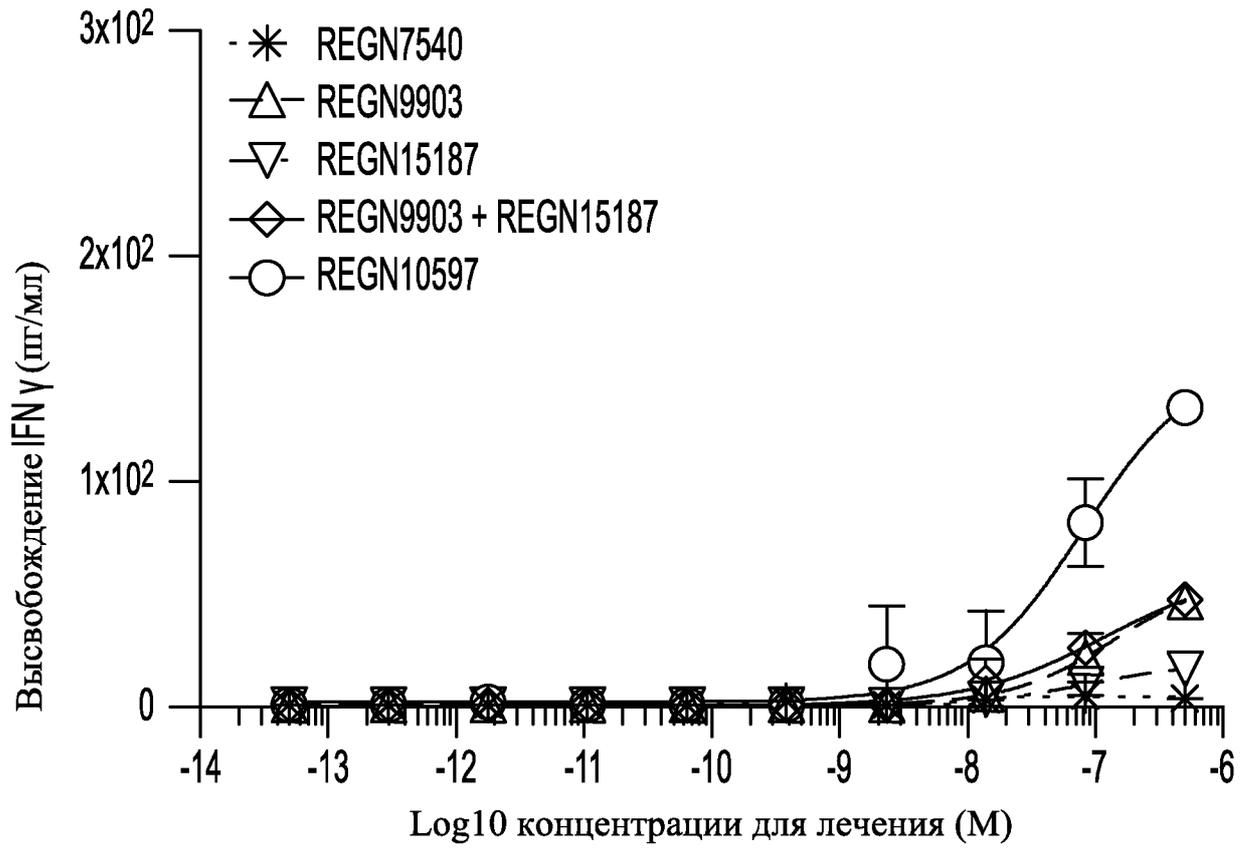


Фиг. 4А

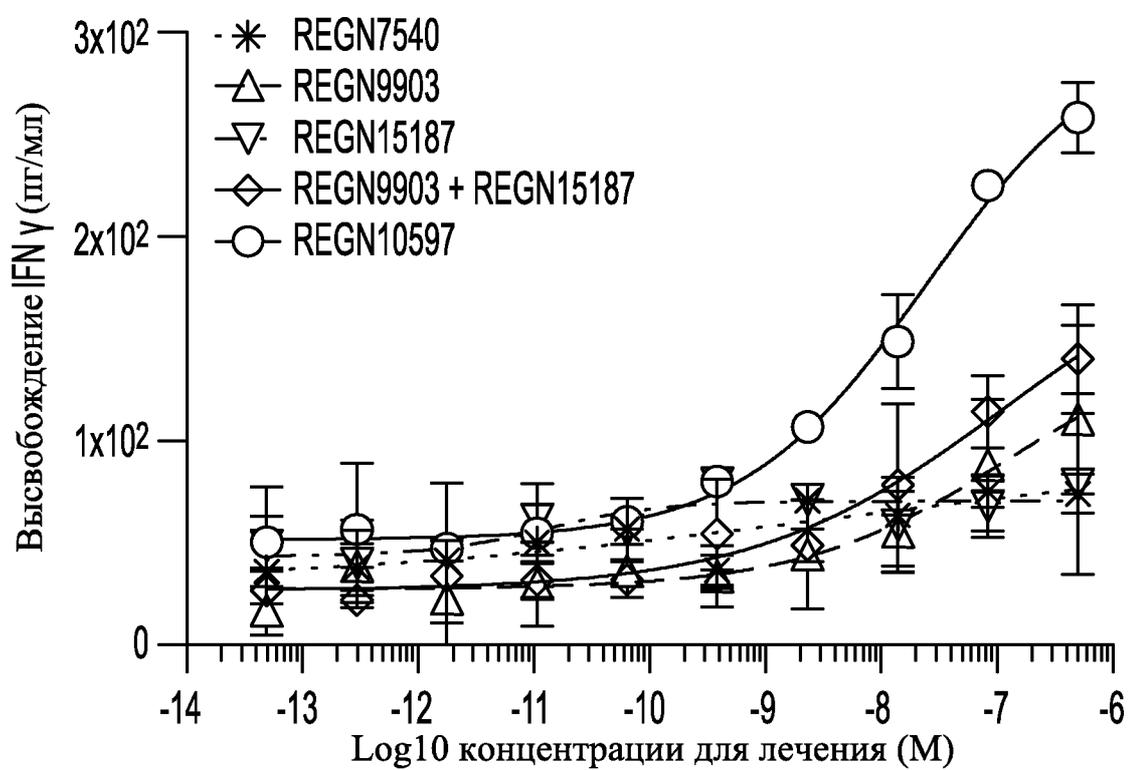
Пролиферация



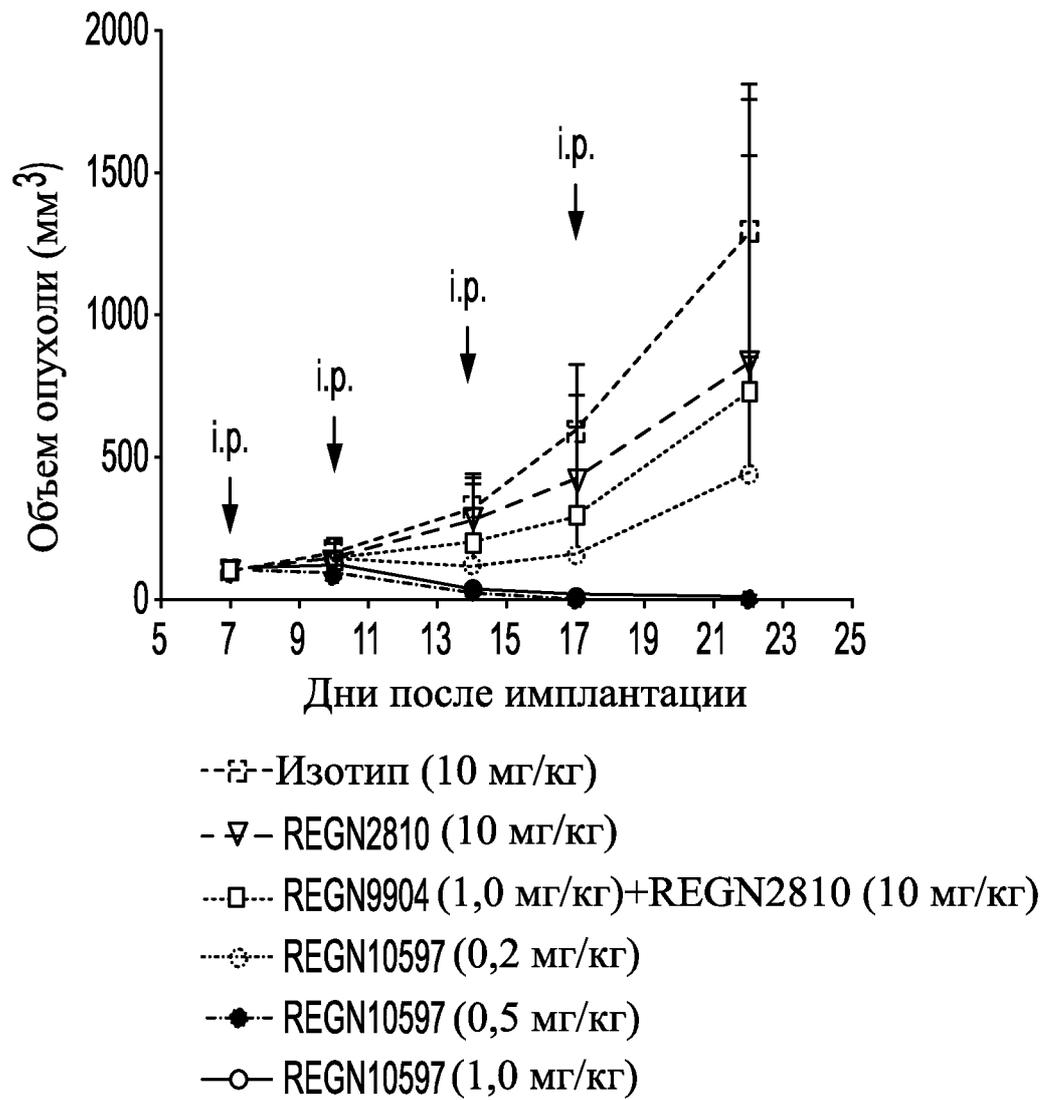
Фиг. 4В



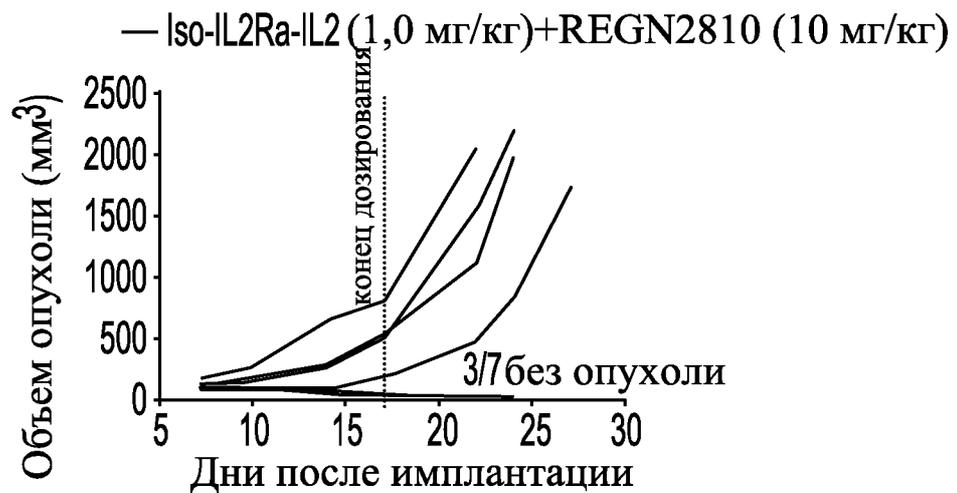
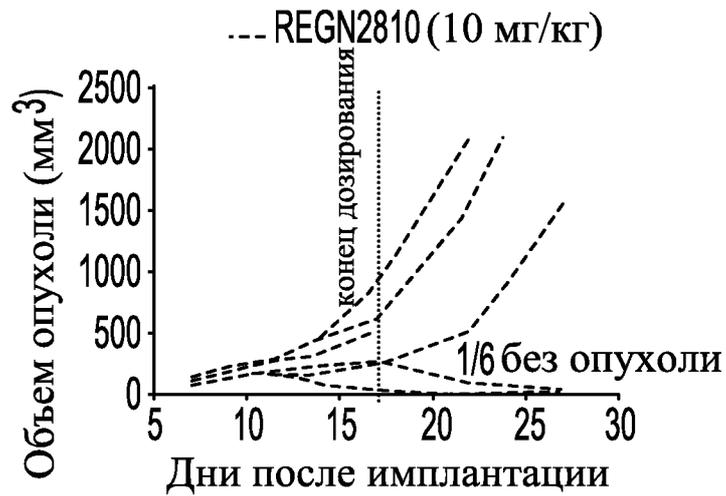
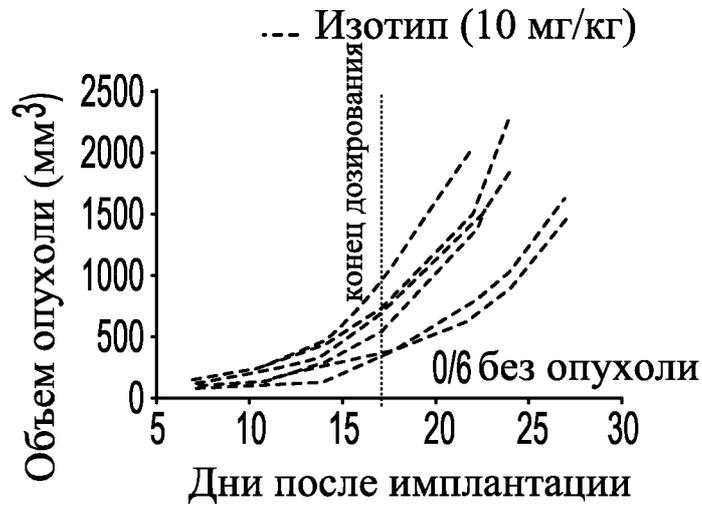
Фиг. 5А



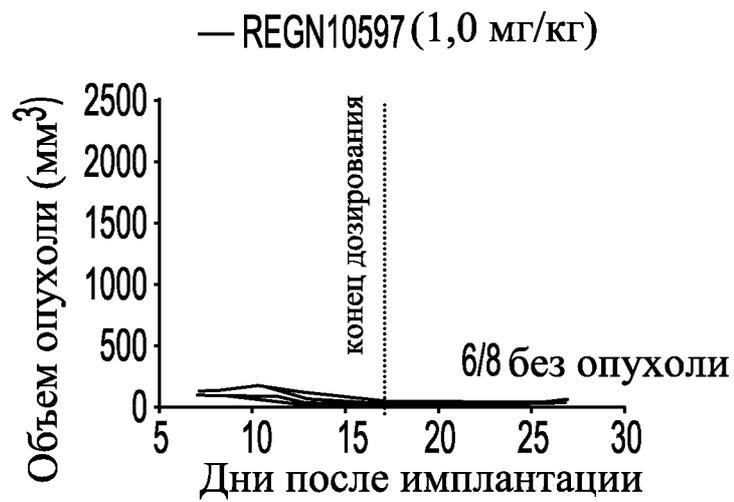
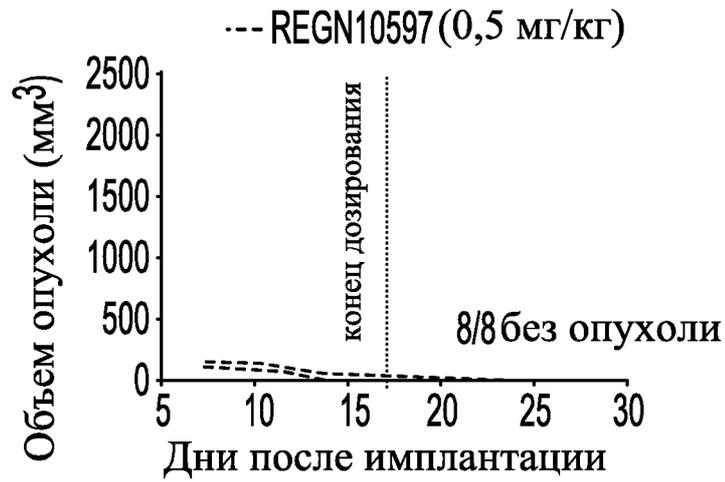
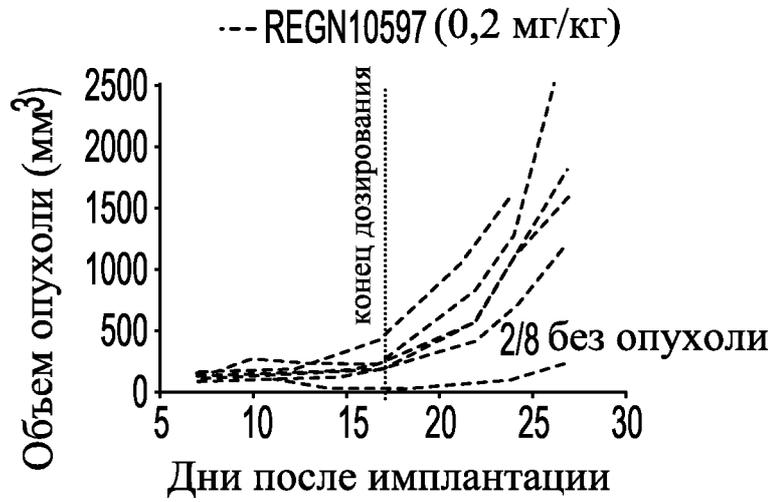
Фиг. 5В



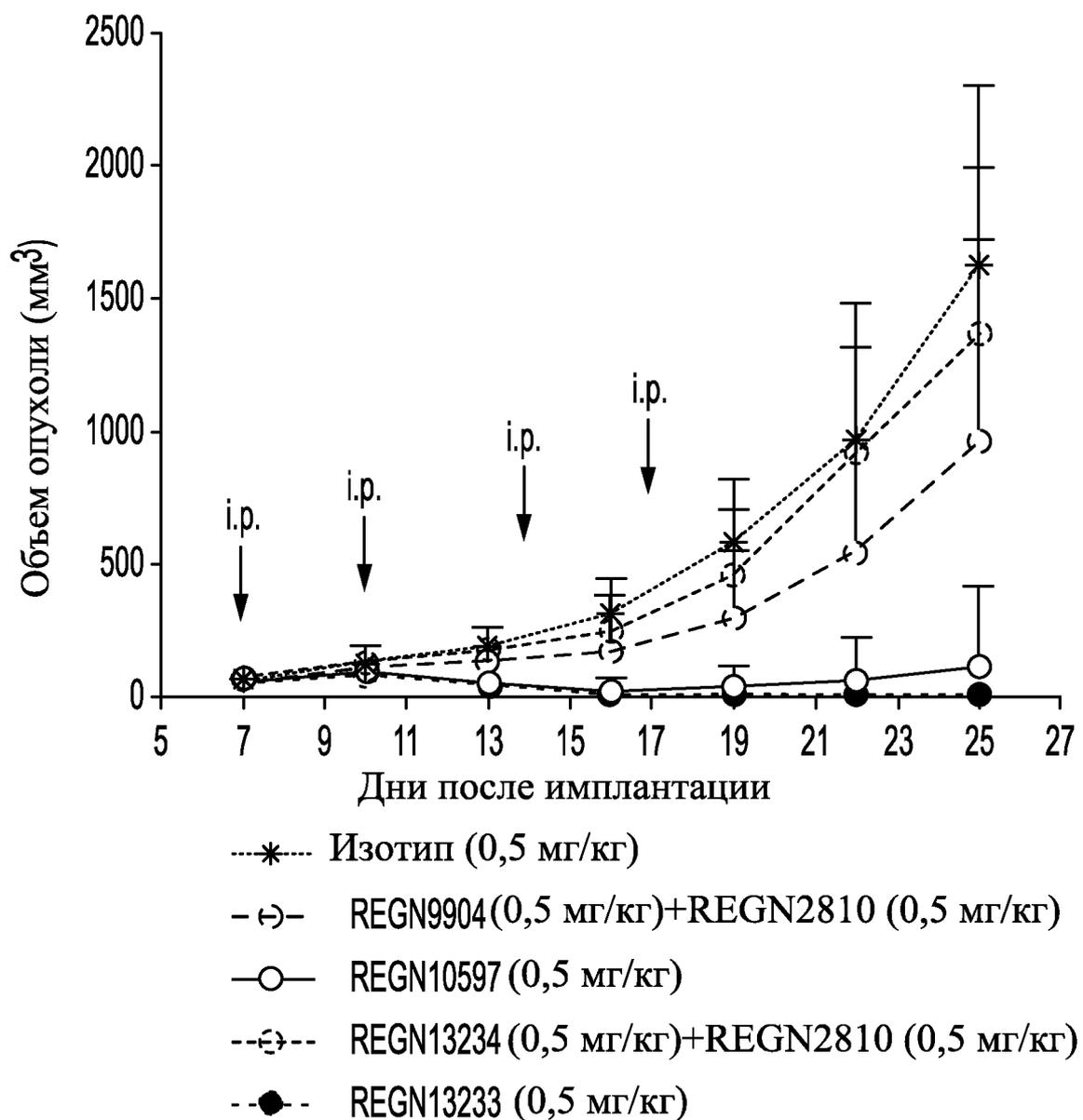
Фиг. 6А



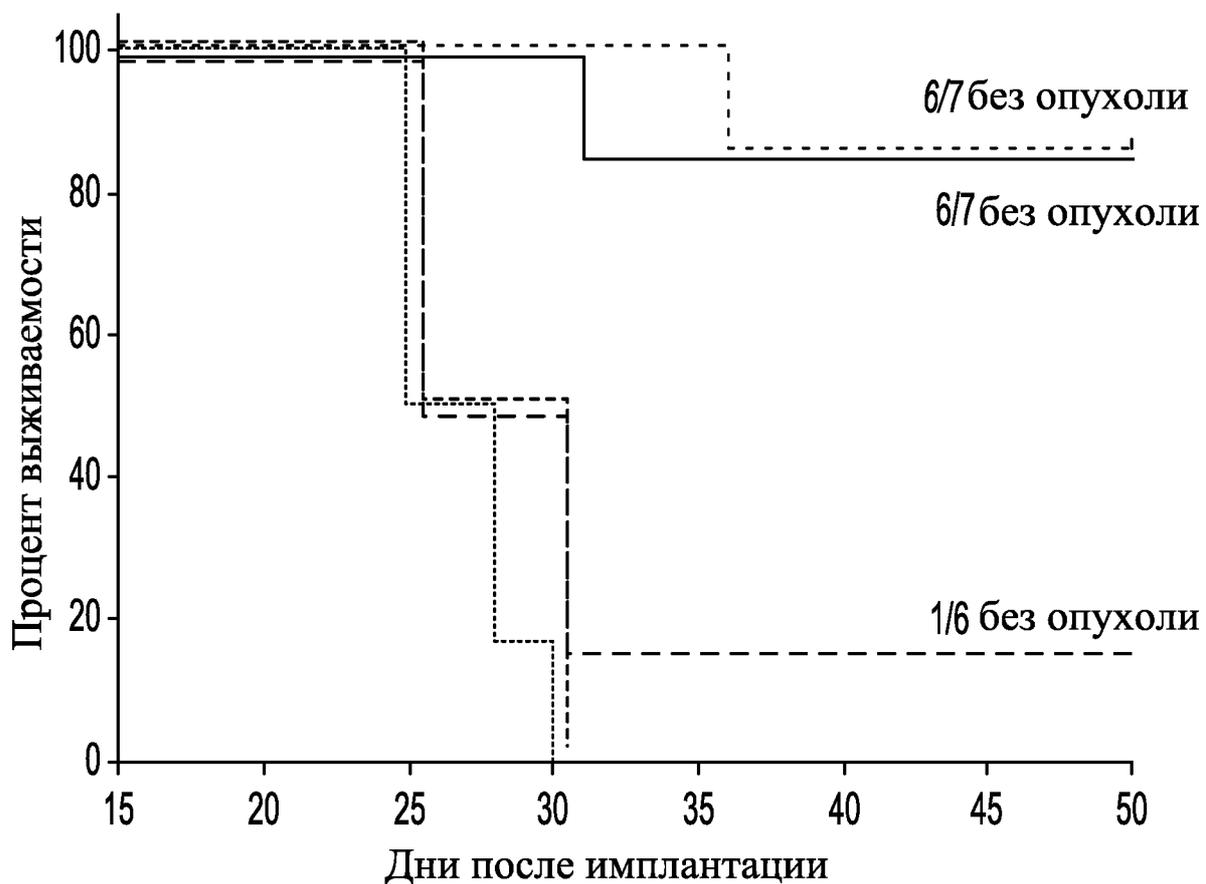
Фиг. 6В



Фиг. 6В (продолжение)

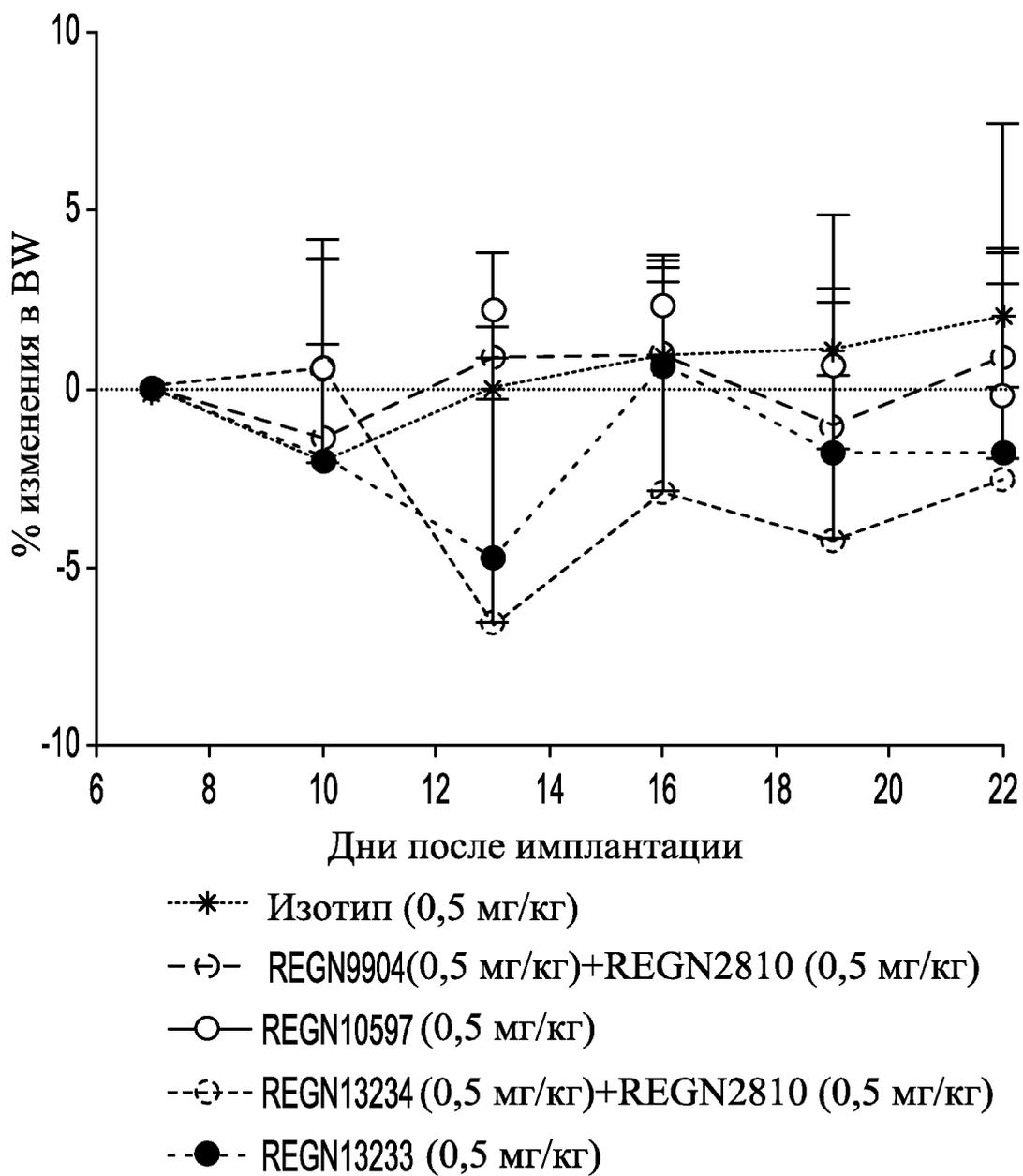


Фиг. 6С

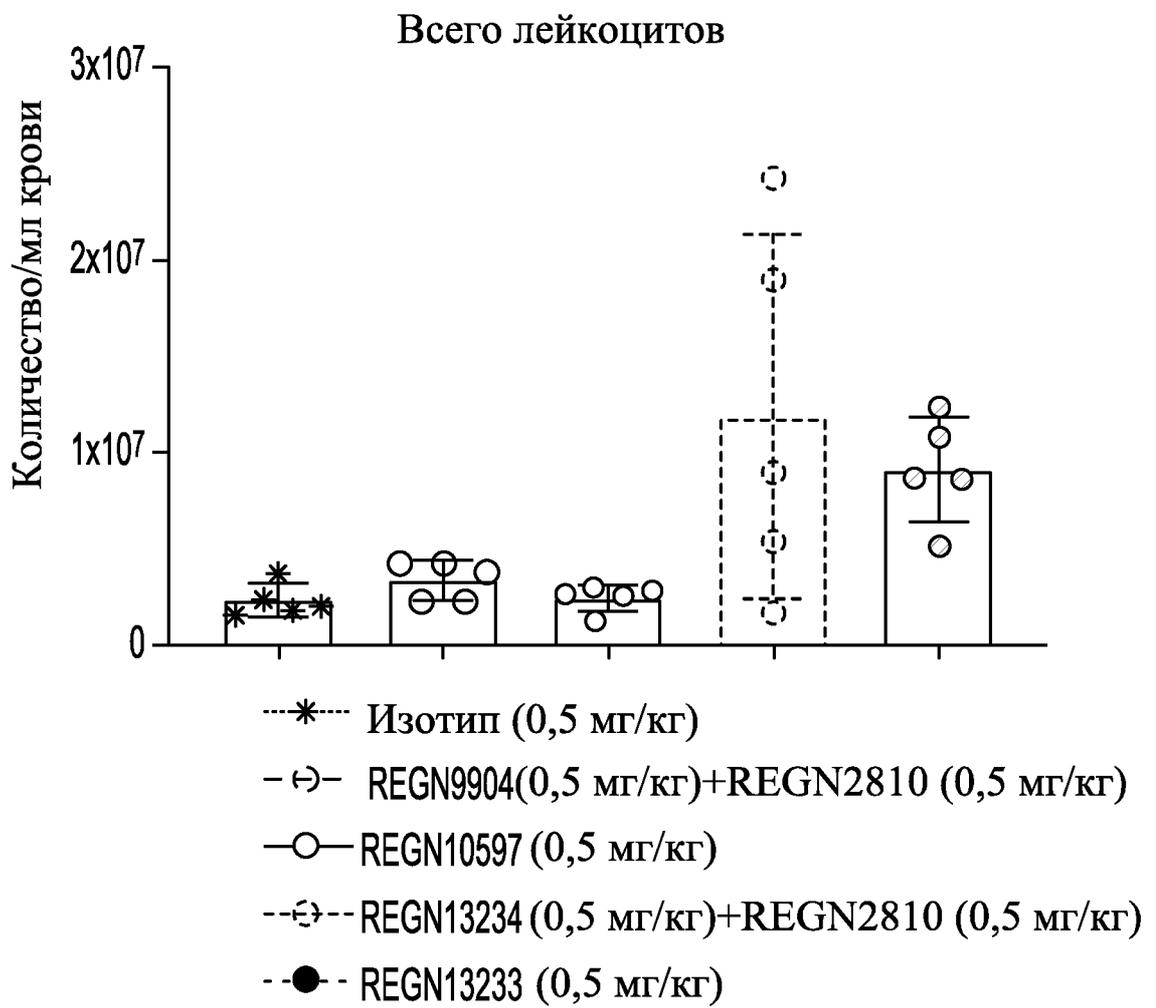


- *--- Изотип (0,5 мг/кг)
- (-)- REGN9904(0,5 мг/кг)+REGN2810 (0,5 мг/кг)
- REGN10597 (0,5 мг/кг)
- (-)-- REGN13234 (0,5 мг/кг)+REGN2810 (0,5 мг/кг)
- REGN13233 (0,5 мг/кг)

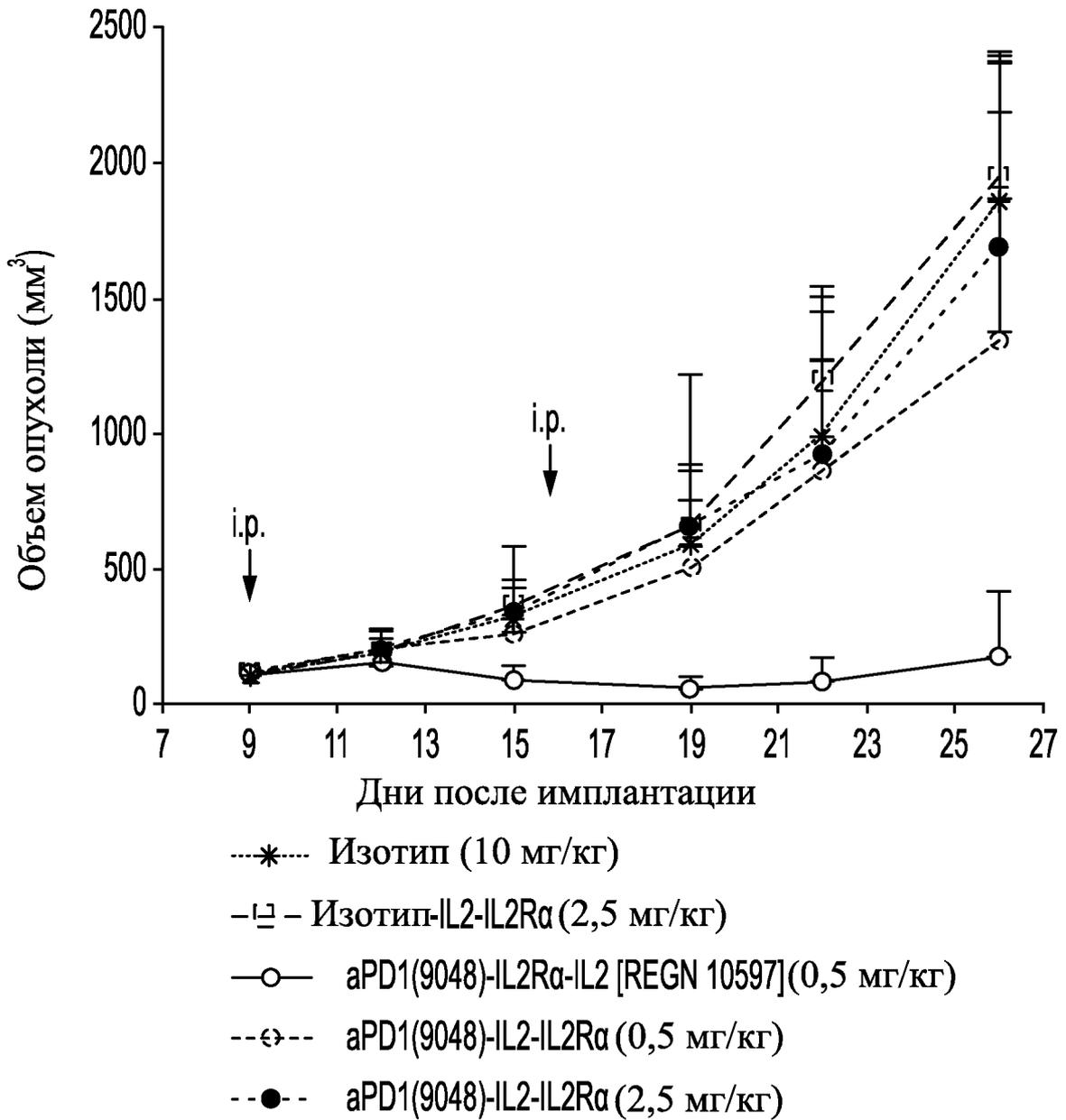
Фиг. 6D



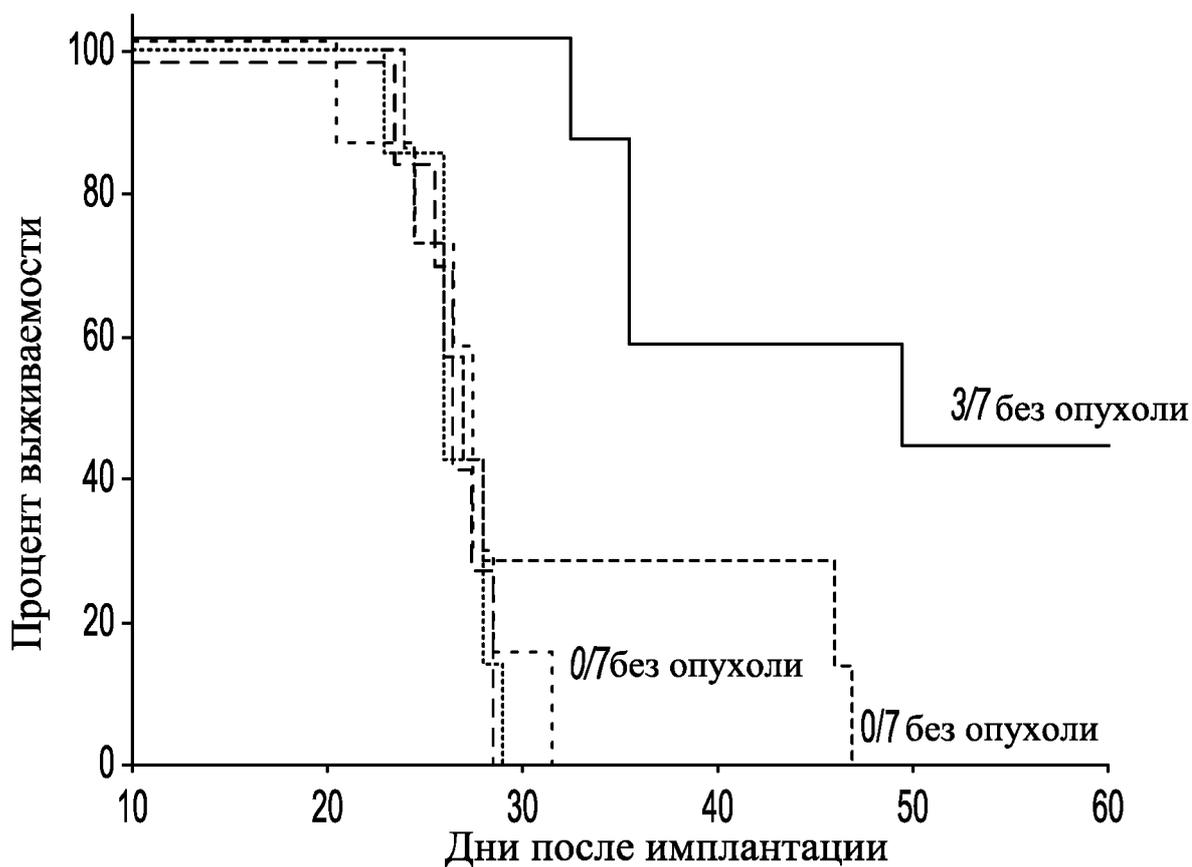
Фиг. 6Е



Фиг. 6F

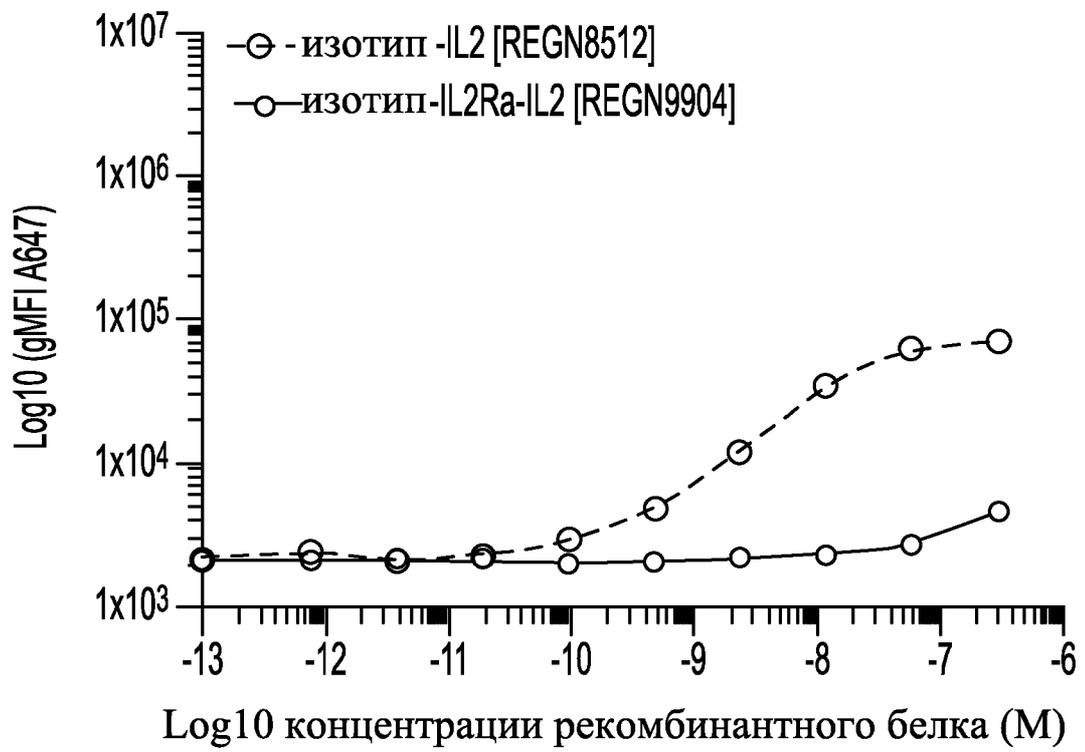


Фиг. 6G

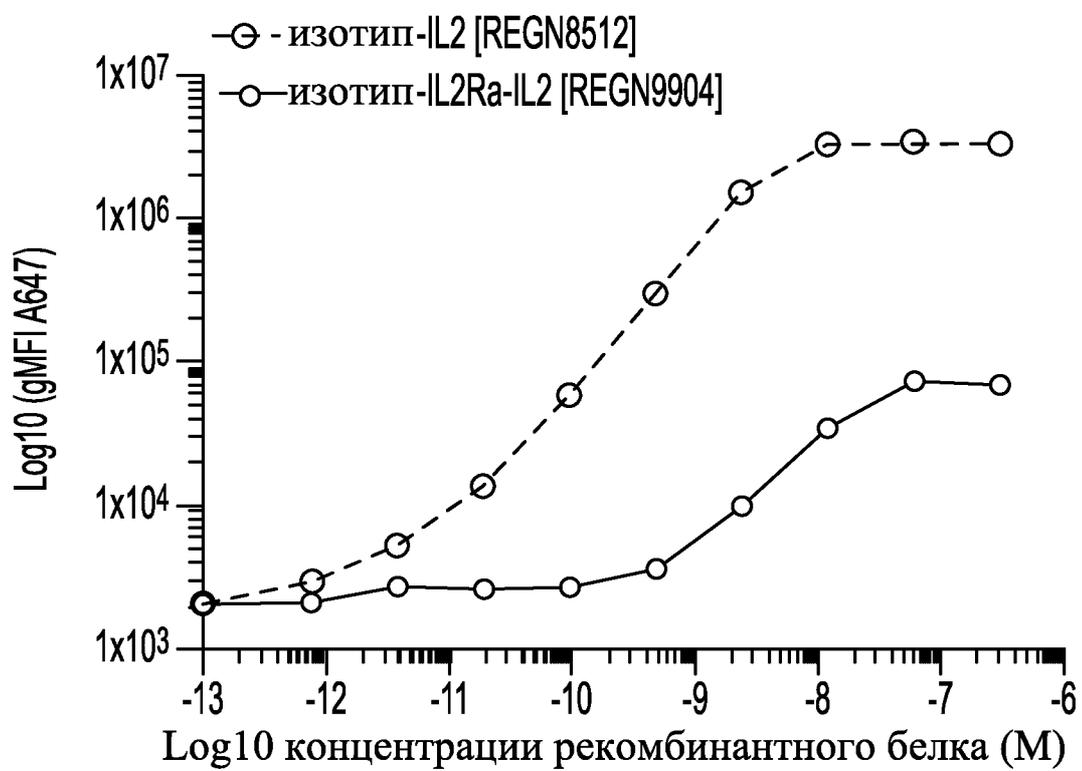


- *--- Изотип (10 мг/кг)
- Изотип-IL2-IL2Rα (2,5 мг/кг)
- aPD1(9048)-IL2Rα-IL2 [REGN 10597] (0,5 мг/кг)
- ◇--- aPD1(9048)-IL2-IL2Rα (0,5 мг/кг)
- ×--- aPD1(9048)-IL2-IL2Rα (2,5 мг/кг)

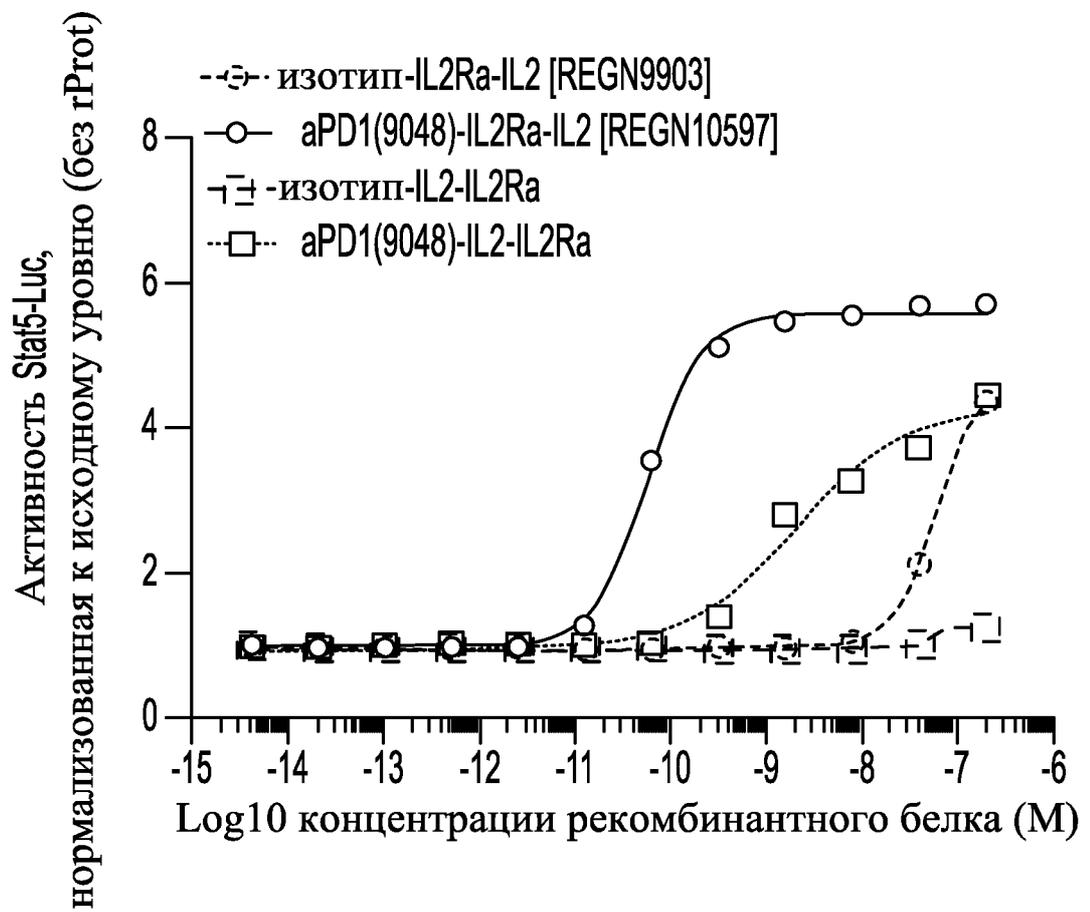
Фиг. 6Н



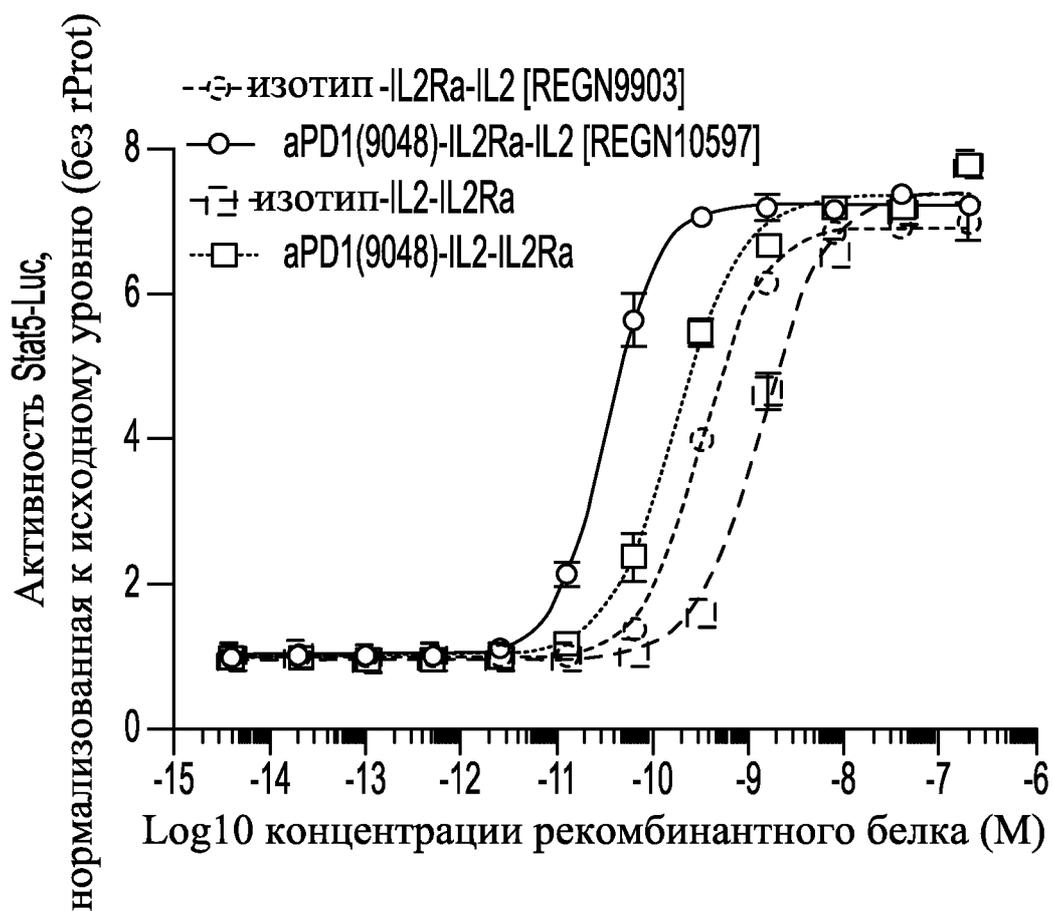
Фиг. 7А



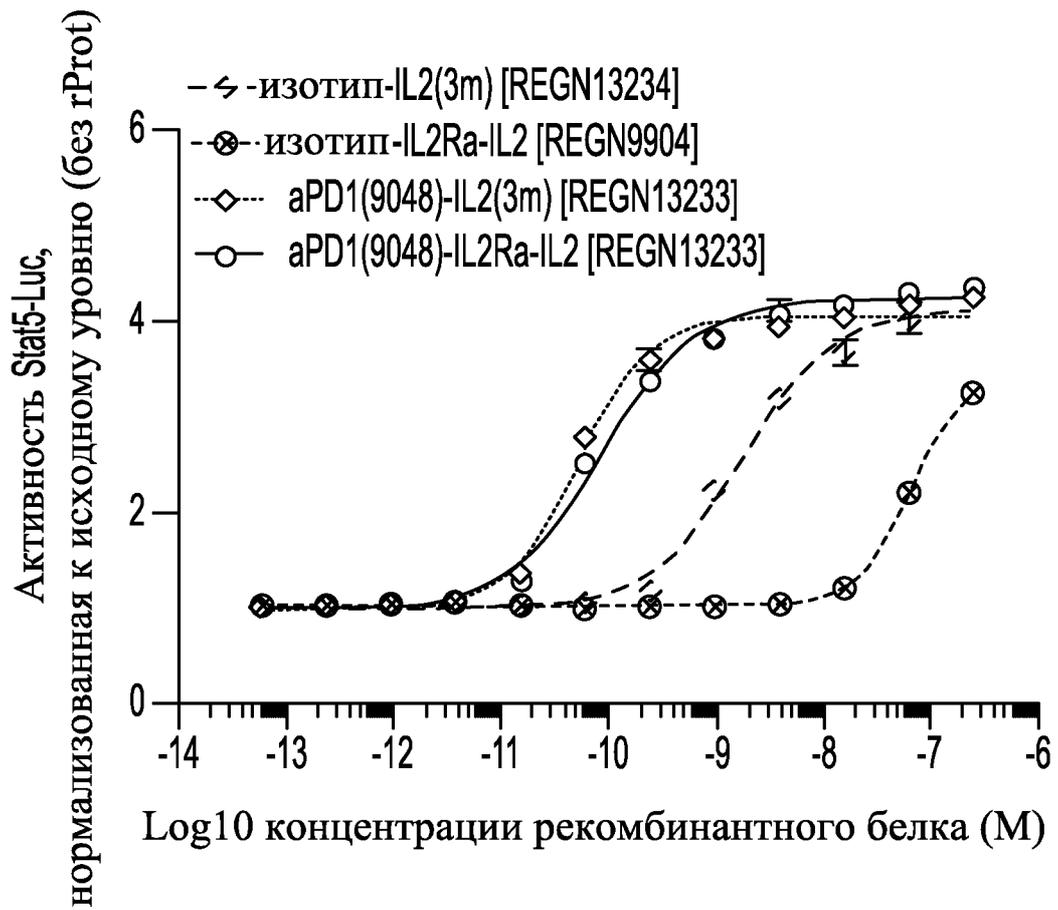
Фиг. 7В



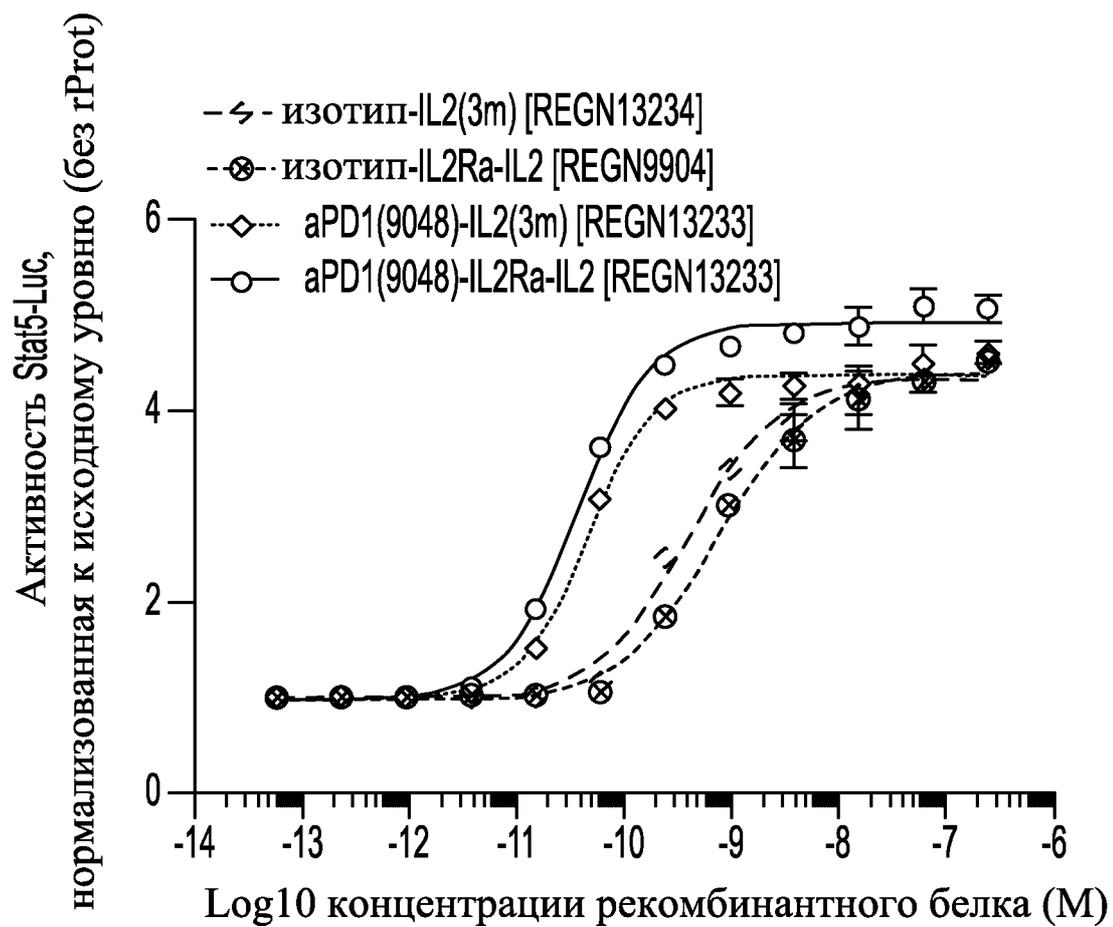
Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 9А



Фиг. 9В