

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047872**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.24

(21) Номер заявки
202391458

(22) Дата подачи заявки
2021.12.10

(51) Int. Cl. **C07K 14/54** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/24 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **ИММУНОЦИТОКИН ДЛЯ АКТИВАЦИИ IL-10R α РЕЦЕПТОРА ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **2020140807**

(32) **2020.12.10**

(33) **RU**

(43) **2024.04.17**

(86) **PCT/RU2021/050432**

(87) **WO 2022/124950 2022.06.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
"БИОКАД" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Кононов Алексей Владимирович,
Евдокимовская Юлия Викторовна,
Смирнова Яна Андреевна, Евдокимов
Станислав Рудольфович, Колосова
Елена Сергеевна, Агеев Сергей
Андреевич, Цымпилов Владимир
Сергеевич, Соловьев Валерий
Владимирович, Яковлев Павел
Андреевич, Морозов Дмитрий
Валентинович (RU)**

(74) Представитель:
Мельчаева О.А. (RU)

(56) **WO-A1-2015117930**

KOOSHKAKI O. et al. Combination of Ipilimumab and Nivolumab in Cancers: From Clinical Practice to Ongoing Clinical Trials. *Int. J. Mol. Sci.*, Published: 22 June 2020, v. 21, 4427, doi: 10.3390/ijms21124427

MURAKAMI S.H. et al. Durvalumab for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, Accepted author version posted online: 29 Nov 2019, v. 19 (12):1009-1016, doi: 10.1080/14737140.2019.1699407

GUNTURI A. et al. Nivolumab for the treatment of cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2015, v. 24 (2):253-260, doi: 10.1517/13543784.2015.991819

US-B2-10040843

JONSON P.H. et al. A critical view on conservative mutations. *Protein Engineering*, 2001, v. 14 (6): 397-402

WANG X. et al. Targeting IL-10 Family Cytokines for the Treatment of Human Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2019, v. 11: a028548 (1-30), doi: 10.1101/cshperspect.a028548, abstract, p. 8-10

(57) Изобретение относится к области биотехнологии и медицины, а именно к иммуноцитокину для активации IL-10R α рецептора человека. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим указанный иммуноцитокин, векторам экспрессии, клеткам-хозяевам и способам их получения, способам получения иммуноцитокина, фармацевтическим композициям, содержащим вышеуказанный иммуноцитокин, фармацевтическим композициям, содержащим вышеуказанный иммуноцитокин и другие терапевтически активные соединения, способам лечения онкологического заболевания и применениям иммуноцитокина или его фармацевтических композиций для лечения онкологического заболевания.

B1**047872****047872****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и медицины, а именно к иммуноцитокину для активации IL-10R α рецептора человека. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим указанный иммуноцитокин, векторам экспрессии, клеткам-хозяевам и способам их получения, способам получения иммуноцитокина, фармацевтическим композициям, содержащим вышеуказанный иммуноцитокин, фармацевтическим композициям, содержащим вышеуказанный иммуноцитокин и другие терапевтически активные соединения, способам лечения онкологического заболевания и применениям иммуноцитокина или его фармацевтических композиций для лечения онкологического заболевания.

Уровень техники

Интерлейкин 10 (или IL-10) является цитокином и до недавнего времени воспринимался как противовоспалительный цитокин. Это гомодимер с молекулярной массой приблизительно 37-39 кДа. Человеческий и мышинный интерлейкин 10 показывают высокую гомологию - порядка 80%.

IL-10 способен подавлять ангиогенез, метастазирование, а также оказывать прямой противоопухолевый эффект (Martin Oft, IL-10: Master Switch from Tumor-Promoting Inflammation to Antitumor Immunity, *Cancer Immunology at the Crossroads: Experimental Immunotherapies*, March 2014, Volume 2, Issue 3, 10.1158/2326-6066.CIR-13-0214).

Было показано, что одним из вероятных противоопухолевых эффектов IL-10 является его активирующее влияние на CD8-лимфоциты, экспрессирующие PD-1. IL-10 приводит к усилению антиапоптотических внутриклеточных каскадов, что способствует выживанию цитотоксических лимфоцитов в опухолевом микроокружении (Martin Oft, Immune regulation and cytotoxic T cell activation of IL-10 agonists - Preclinical and clinical experience, *Seminars in Immunology*, Volume 44, August 2019, DOI: 10.1016/j.smim.2019.101325).

IL-10 характеризуется коротким временем полужизни в плазме из-за небольшого размера приблизительно 37-39 кДа, что приводит к быстрому почечному клиренсу, фактически время его полужизни в системном компартменте составляет 2,5 ч (Braat H. et al., Interleukin-10-based therapy for inflammatory bowel disease, *Expert Opin. Biol. Ther.* 3(5), 2003, p. 725-731). Для повышения времени нахождения в кровотоке, экспозиции, эффективности и для снижения поглощения почками некоторыми авторами применялось пегилирование этого цитокина (Mattos A. et al., PEGylation of interleukin-10 improves the pharmacokinetic profile and enhances the antifibrotic effectivity in CCl₄-induced fibrogenesis in mice, *J. Control Release*? 162, 2012, p. 84-91 и Mumm J.B. et al., IL-10 elicits IFN γ -dependent tumor immune surveillance, *Cancer Cell*? 20(6), 2011, p. 781-796). Однако к недостаткам пегилирования можно отнести такие потенциальные риски, как иммуногенность, снижение биологической активности пегилированной молекулы и неоднородность пегилирования, что может привести к получению терапевтических молекул с различными свойствами (размер, заряд и т.д.), а также формирование гидрофильной оболочки вокруг терапевтической молекулы. Кроме того, использование данного подхода позволяет увеличить время полужизни препарата в кровотоке не более чем до 24 ч.

Другой способ увеличения времени полужизни IL-10 в плазме заключается в использовании слитых белков, содержащих антитело или его фрагмент и IL-10, для направленного переноса цитокина к воспаленным тканям и накопления в них цитокина.

Из уровня техники известны статьи (Zheng, X.X. et al., A noncytolytic IL-10/Fc fusion protein prevents diabetes, blocks autoimmunity, and promotes suppressor phenomena in NOD mice. *J. Immunol.* 1997, 158, 4507-4513 и Zheng, X.X. et al., Administration of noncytolytic IL-10/Fc in murine models of lipopolysaccharide-induced septic shock and allogeneic islet transplantation. *J. Immunol.* 1995, 154, 5590-5600), которые описывают иммуноцитокин на основе IL-10 и Fc-фрагмента.

В международных заявках WO 2012/045334 и WO 2014/023673 также описывается слитый белок, включающий гетеродимерный комплекс на основе IL-10 и Fc-фрагмента.

Международная заявка WO 2015/117930 описывает слитый белок, содержащий антитело IgG-класса и измененную молекулу IL-10, где слитый белок содержит два идентичных полипептида тяжелых цепей и два идентичных полипептида легких цепей и где измененная молекула IL-10 содержит аминокислотную замену, которая снижает аффинность связывания измененной молекулы IL-10 с рецептором IL-10 по сравнению с молекулой IL-10 дикого типа.

Вышеуказанные слитые белки (иммуноцитокины) на основе IL-10 и Fc-фрагмента обладают общим недостатком, а именно недостаточной стабильностью в крови, так как они подвержены расщеплению протеазами сыворотки крови.

В связи с вышесказанным актуальным является разработка слитых белков (иммуноцитокinov) на основе IL-10 и Fc-фрагмента, которые будут показывать увеличенное время полужизни в плазме крови по сравнению с IL-10 и будут стабильны за счет устойчивости к расщеплению протеазами сыворотки крови.

Краткое описание изобретения

Иммуноцитокин, включающий гомодимерный комплекс на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 чело-

века, предлагаемый в настоящем изобретении, как было установлено авторами, обладает увеличенным временем полужизни в плазме крови по сравнению с IL-10 и стабилен за счет устойчивости к расщеплению протеазами сыворотки крови из-за своей уникальной структуры.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к иммуноцитокину для активации IL-10R α рецептора человека, который включает гомодимерный комплекс на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, где мономер на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, которая кодирует вышеуказанный иммуноцитокин.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 4.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, который содержит любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот.

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

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к клетке-хозяину для получения вышеуказанного иммуноцитокина по изобретению, которая содержит любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот.

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

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для активации IL-10R α рецептора человека, которая содержит вышеуказанный иммуноцитокин по изобретению и один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для активации IL-10R α рецептора человека, которая содержит вышеуказанный иммуноцитокин по изобретению и по меньшей мере одно другое терапевтически активное соединение.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция используется для лечения онкологического заболевания.

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

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется другое терапевтически активное соединение, которое представляет собой антитело, химиотерапевтическое средство или средство для гормональной терапии.

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется другое терапевтически активное соединение, которое представляет собой ингибитор контрольных точек иммунитета.

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется ингибитор контрольных точек иммунитета, который выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется ингибитор PD-L1, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется антитело, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб (manelimab).

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется ингибитор PD-1, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется антитело, которое специфиче-

ски связывается с PD-1, и выбрано из группы: пролголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется ингибитор CTLA-4, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с CTLA-4.

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, и представляет собой ипилимумаб.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической комбинации для активации IL-10R α рецептора человека, которая содержит вышеуказанный иммуноцитокин по изобретению и по меньшей мере одно другое терапевтически активное соединение.

В некоторых вариантах фармацевтическая комбинация используется для лечения онкологического заболевания.

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

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется другое терапевтически активное соединение, которое представляет собой антитело, химиотерапевтическое средство или средство для гормональной терапии.

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется другое терапевтически активное соединение, которое представляет собой ингибитор контрольных точек иммунитета.

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется ингибитор контрольных точек иммунитета, который выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется ингибитор PD-L1, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется антитело, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб (manelimab).

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется ингибитор PD-1, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется антитело, которое специфически связывается с PD-1, и выбрано из группы: пролголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется ингибитор CTLA-4, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с CTLA-4.

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, и представляет собой ипилимумаб.

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

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

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу активации IL-10R α рецептора человека у субъекта, нуждающегося в такой активации, который включает введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества вышеуказанного иммуноцитокина по изобретению или любой вышеуказанной фармацевтической композицией в терапевтически эффективном количестве.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению вышеуказанного иммуноци-

токина по изобретению или любой вышеуказанной фармацевтической композиции для лечения онкологического заболевания у субъекта, нуждающегося в таком лечении.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению вышеуказанного иммуноцитокина по изобретению и по меньшей мере одного другого терапевтически активного соединения для лечения у субъекта, нуждающегося в таком лечении, онкологического заболевания.

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

В некоторых вариантах применения используется другое терапевтически активное соединение, которое представляет собой антитело, химиотерапевтическое средство или средство для гормональной терапии.

В некоторых вариантах применения используется другое терапевтически активное соединение, которое представляет собой ингибитор контрольных точек иммунитета.

В некоторых вариантах применения используется ингибитор контрольных точек иммунитета, который выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

В некоторых вариантах применения используется ингибитор PD-L1, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах применения используется антитело, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб (manelimab).

В некоторых вариантах применения используется ингибитор PD-1, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

В некоторых вариантах применения используется антитело, которое специфически связывается с PD-1, выбрано из группы: пролголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

В некоторых вариантах применения используется ингибитор CTLA-4, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с CTLA-4.

В некоторых вариантах применения используется антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, и представляет собой ипилимумаб.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой карту плазмиды pIntA-IL-10Ra-*exc-hum*-EPEA, содержащей последовательность экстраклеточной части альфа субъединицы рецептора IL-10R человека с пришитым на C-конце EPEA тагом:

AmpR - ген, обеспечивающий устойчивость к ампициллину;
 pUC - бактериальный ориджин репликации;
 cmv enhanser - энхансер цитомегаловируса;
 hCMV promoter - эукариотический промотор цитомегаловируса человека;
 Intron A - последовательность интрона A;
 Kozak - консенсусная последовательность Козак для инициации трансляции;
 mIgK Leader - лидерный пептид;
 SalI - сайт рестрикции SalI;
 IL-10Ra-*exc-hum* - экстраклеточная часть альфа субъединицы рецептора IL-10 человека;
 EPEA-tag - последовательность EPEA-таг для очистки белка;
 KpnI - сайт рестрикции KpnI;
 Stop - стоп-кодон;
 SV40_PA term - терминатор транскрипции poly(A) SV40;
 EBV ori - эукариотический ориджин репликации.

Фиг. 2 представляет собой карту плазмиды pIntA-N-Fc-LALA-link-hIL-10, содержащей последовательность N-концевого Fc-фрагмента IgG1 человека с мутациями LALA, del GK и сшитого через линкер с IL-10 человека:

AmpR - ген, обеспечивающий устойчивость к ампициллину;
 pUC - бактериальный ориджин репликации;
 cmv enhanser - энхансер цитомегаловируса;
 hCMV promoter - эукариотический промотор цитомегаловируса человека;
 Intron A - последовательность интрона A;
 Kozak - консенсусная последовательность Козак для инициации трансляции;

mIgK Leader - лидерный пептид;
 SalI - сайт рестрикции SalI;
 Fc-LALA-delGK - последовательность Fc-фрагмента IgG1 человека с LALA-мутацией (L19A, L20A по сквозной нумерации) и deletированными GK (G231, K232 по сквозной нумерации) на C-конце;

Linker - последовательность линкера;

hIL-10 - последовательность IL-10 человека;

XbaI - сайт рестрикции XbaI;

Stop - стоп-кодон;

SV40_PA term - терминатор транскрипции poly(A) SV40;

EBV ori - эукариотический ориджин репликации.

Фиг. 3 представляет собой электрофорез в ПААГ полученных и выделенных из клеток CHO экстракционной части рецепторов IL-10 человека, яванской макаки и кролика:

- 1) маркеры молекулярной массы белков;
- 2) excIL-10Ra человека;
- 3) excIL-10Ra яванской макаки;
- 4) маркеры молекулярной массы белков;
- 5) excIL-10Ra кролика.

Фиг. 4 представляет собой электрофорез в ПААГ полученного и выделенного из клеток CHO рекомбинантного иммуноцитоклина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека по изобретению (IL-10-Fc):

- 1) маркеры молекулярной массы белков;
- 2) IL10-Fc 4,5 мкг в редуцирующих условиях
- 3) IL10-Fc 4,5 мкг в нередуцирующих условиях.

Фиг. 5 представляет собой график, где показана стабильность иммуноцитоклина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека по изобретению (IL-10+Fc) при хранении в сыворотке человека в течение длительного времени при 37°C. По оси X - время хранения, по оси Y - относительное содержание стабильных молекул в сыворотке (процент от исходного образца).

Фиг. 6 представляет собой график, где показана способность иммуноцитоклина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека по изобретению (IL-10+Fc) проявлять пролиферативную активность в сравнение с IL-10. По оси X - концентрация IL-10 (положительный контроль человеческий рекомбинантный IL-10 производства Peprotech), по оси Y - относительная флуоресценция, отражающая количество жизнеспособных клеток. Для контрольного образца полумаксимальная эффективная концентрация составила 91,7 пМ, для IL-10+Fc по изобретению - 53,3 пМ.

Фиг. 7 представляет собой график, где показано влияние иммуноцитоклина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека по изобретению (IL-10+Fc) на цитотоксичность CD8⁺ Т-клеток в отношении клеток-мишеней Raji в сравнении с рекомбинантный человеческий IL-10 производства Peprotech и контролем.

Фиг. 8 представляет собой график, где показано отсутствие CDC активности у исследуемого иммуноцитоклина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека по изобретению (IL-10+Fc) в тесте с клеточной линией Jurkat. Контрольное антитело Ритуксимаб вызывает комплемент-опосредованный лизис клеток-мишеней.

Фиг. 9 представляет собой график, где показано отсутствие антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC-активности) у исследуемого иммуноцитоклина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека по изобретению (IL-10+Fc) в тесте с клетками-мишенями Jurkat. В качестве положительного контроля использовали анти-PD1 антитело.

Фиг. 10 представляет собой гистограмму, на которой показано отсутствие аутоцитотоксичности у иммуноцитоклина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека по изобретению (IL-10+Fc) в отношении субпопуляций клеток периферической крови человека в концентрациях 0,01, 0,1, 1, 10 мкг/мл:

- фиг. 10А: CD4⁺ Т-клеток,
- фиг. 10Б: CD8⁺ Т-клеток,
- фиг. 10В: Т-клетки,
- фиг. 10Г: NK клетки,
- фиг. 10Д: В-клетки.

В качестве положительного контроля использовали анти-CD20 антитело, вызывающее аутоцитотоксичность в отношении Вклеток, и анти-CD47 антитело, вызывающее аутоцитотоксичность в отношении NK клеток.

Фиг. 11 представляет собой гистограмму, отражающую способность иммуноцитоклина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека по изобретению (IL-10-Fc) и комбинации IL-10-Fc по изобретению с анти-mPD1 антителом оказывать противоопухолевую активность у мышей Balb/c с привитой карциномой CT26. В качестве контроля использовали анти-mPD1 антитело.

Фиг. 12 представляет собой гистограмму, отражающую способность иммуноцитоклина (слитого бел-

ка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека по изобретению (IL-10-Fc) и комбинации IL-10-Fc по изобретению с анти-mPD1 антителом оказывать противоопухолевую активность у мышей Balb/c с привитой карциномой CT26. В качестве контроля использовали анти-mPD1 антитело. По оси Y - индекс прироста опухоли (ИПО).

Фиг. 13 представляет собой гистограмму, отражающую способность иммуноцитокина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека по изобретению (IL-10-Fc) и комбинации IL-10-Fc по изобретению с анти-mPD1 антителом оказывать противоопухолевую активность у мышей Balb/c с привитой карциномой CT26, на гистограмме представлен показатель торможения роста опухоли (ТРО). В качестве контроля использовали анти-mPD1 антитело.

Фиг. 14 представляет собой схематичное изображение формата иммуноцитокина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека по изобретению.

Описание изобретения

Определения и общие методы.

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

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

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

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

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

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

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

Иммуноцитокин.

Иммуноцитокин, включающий гомодимерный комплекс на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, предлагаемый в настоящем изобретении, как было неожиданно установлено авторами, обладает увеличенным временем полужизни в плазме крови по сравнению с IL-10 и стабилен за счет устойчивости к расщеплению протеазами сыворотки крови из-за своей уникальной структуры.

Формат вышеуказанного иммуноцитокина представлен на фиг. 14.

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

Под иммуноцитоксином по изобретению подразумевается выделенный иммуноцитокин.

Под иммуноцитокин по изобретению подразумевается слитый белок на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека.

Определение "выделенный" ("изолированный"), применяемое для описания различных иммуноцитокин по данному описанию, означает иммуноцитокин, идентифицированный и выделенный и/или регенерированный из клетки или клеточной культуры, в которой он экспрессируется. Примеси (загрязняющие компоненты) из природной среды представляют собой материалы, которые, как правило, мешают диагностическому или терапевтическому применению полипептида, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Обычно выделенный полипептид получают в результате по меньшей мере одной стадии очистки.

Иммуноцитокин по изобретению является рекомбинантным иммуноцитокин.

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

Кристаллизуемый фрагмент иммуноглобулина (англ. fragment crystallizable region, Fc region, Fc-фрагмент) - это концевая часть молекулы иммуноглобулина, которая взаимодействует с Fc-рецептором на поверхности клетки и с некоторыми белками системы комплемента. Данное свойство позволяет антителам активировать иммунную систему. Fc-участок IgG, IgA и IgD изотипов состоит из двух одинаковых белковых фрагментов, соответственно, второго и третьего константных доменов двух тяжелых цепей; в случае изотипов IgM и IgE Fc содержит три константных домена тяжелых цепей (домены C_H2, C_H3 и C_H4) в каждой полипептидной цепочке.

Рецептор для IL-10 представляет собой гетеротетрамерный комплекс, включающий две молекулы IL-10R α , также называемые IL-10R1, кодируемые геном IL-10ra, и две молекулы IL-10R β , также называемые IL-10R2, кодируемые геном IL-10rb.

Под IL-10R α рецептора человека (или CD210a или IL-10R1) подразумевается субъединица α рецептора интерлейкина 10. Молекулярная масса IL-10Ra составляет 90-120 кДа и служит лигандсвязывающей субъединицей рецепторного комплекса.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к иммуноцитокину для активации IL-10R α рецептора человека, который включает гомодимерный комплекс на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, т.е. димер, который включает два одинаковых мономера на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, где мономер включает аминокислотную последовательность:

```
EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGGPGSGGSPGQGTQSENSCTHFPGNLNPMLRDLRDAF
SRVKTFFQMKDQLDNLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENL
KTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN (SEQ
ID NO:1).
```

В одном из вариантов настоящее изобретение относится к иммуноцитокину для активации IL-10R α рецептора человека, который включает гомодимерный комплекс на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, то есть димер, который включает два одинаковых мономера на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, где мономер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

Иммуноцитокин по изобретению включает мутации L234A и L235A (LALA) в Fc-фрагменте антигена IgG1 человека для обеспечения безэффекторных свойств иммуноцитокина. Данные мутации присутствуют в вышеуказанном иммуноцитокине, который включает аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1.

В одном из вариантов изобретения иммуноцитокин по изобретению включает лидерный пептид.

В одном из вариантов изобретения иммуноцитокин по изобретению с лидерным пептидом, включает гомодимерный комплекс на основе лидерного пептида, IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, то есть димер, который включает два одинаковых мономера на основе лидерного пептида, IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, где мономер имеет аминокислотную последовательность:

```
MMSFVSLLLVGI LFNATQAEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGGPGSGGSPGQGTQSENS
CTHFPGNLNPMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQ
AENQDPDIKAHVNSLGENLKTTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFI
NYIEAYMTMKIRN (SEQ ID NO:2).
```

Обозначения "иммуноцитокин по изобретению", "иммуноцитокин на основе IL-10 и Fc", "слитый белок по изобретению", "IL-10-Fc" и "IL-10+Fc" используются в данном описании равнозначно и обозначают вышеуказанный иммуноцитокин по изобретению.

Нуклеиновая кислота.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, которая кодирует вышеуказанный иммуноцитокин по изобретению.

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

Здесь также следует упомянуть, что данное изобретение не относится к нуклеотидным последовательностям в их природной хромосомной среде, т.е. в природном состоянии. Последовательности данного изобретения были выделены и/или очищены, т.е. были взяты прямо или косвенно, например, путем копирования, при этом их среда была по меньшей мере частично модифицирована. Таким образом, также здесь следует подразумевать изолированные нуклеиновые кислоты, полученные путем генетической рекомбинации, например, с помощью принимающих клеток (клеток-хозяев), или полученные путем химического синтеза.

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

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

В одном из вариантов настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует мономер слитого белка на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, где мономер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В одном из вариантов настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует мономер слитого белка на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, где мономер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

Специалисту в данной области будет очевидно, что слитый белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

Ссылка на нуклеотидную последовательность охватывает его комплемент, если не указано иное. Таким образом, ссылка на нуклеиновую кислоту, имеющую определенную последовательность, следует понимать как охватывающие ее комплементарную цепь с ее комплементарной последовательностью.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует мономер слитого белка на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, где мономер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует мономер слитого белка на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, где мономер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, имеет нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует мономер слитого белка на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, где мономер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует мономер слитого белка на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, где мономер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, имеет нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах нуклеиновая кислота по изобретению кодирует мономер слитого белка на основе лидерного пептида, IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека.

В некоторых вариантах нуклеиновая кислота, которая кодирует мономер слитого белка на основе лидерного пептида, IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, где мономер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, имеет нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах нуклеиновая кислота, которая кодирует мономер слитого белка на основе лидерного пептида, IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, где мономер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, имеет нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 6.

Вышеуказанные молекулы нуклеиновой кислоты могут использоваться для экспрессии иммуноцитокина по изобретению.

Экспрессионный вектор.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, который содержит любую из вышеуказанных нуклеотидных последовательностей. Настоящее изобретение относится к вектору, подходящему для экспрессии любой из нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе.

Термин "вектор" при использовании в настоящем документе означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой плазмиду, т.е. кольцевую двухцепочечную часть ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный сайт инициации репликации и эписомные векторы млекопитающих). В других вариантах осуществления изобретения векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геном хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально соединены. Такие векторы упоминаются в данном документе как "рекомбинантные экспрессирующие векторы" (или просто "экспрессирующие векторы").

Настоящее изобретение относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют аминокислотную последовательность иммуноцитокина (слитого белка) по изобретению, его частей (например, последовательностей IL-10 или последовательностей второго и третьего константного домена Fc-фрагмента) как описано в настоящем документе. Настоящее изобретение далее относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих иммуноцитокин (слитый белок) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека по изобретению или его фрагментам.

Экспрессионные векторы включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирусы табачной мозаики, космиды, YAC, EBV полученные эписомы и т.п. Молекулы ДНК могут быть лигированы в вектор таким образом, что последовательности, контролирующие транскрипцию и трансляцию в векторе, выполняют предусмотренную функцию регуляции транскрипции и трансляции ДНК. Экспрессионный вектор и последовательности контроля экспрессии могут быть выбраны таким образом, чтобы быть совместимыми с используемой экспрессирующей клеткой-хозяином. Молекулы ДНК могут быть введены в экспрессионный вектор стандартными способами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена иммуноцитокина и вектора или лигированием тупых концов, если сайты рестрикции отсутствуют).

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

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

Рекомбинантный экспрессионный вектор также может кодировать сигнальный (лидерный) пептид, который облегчает выработку иммуноцитокина клеткой-хозяином. Ген иммуноцитокина может быть клонирован в вектор таким образом, что сигнальный (лидерный) пептид соединен с рамкой считывания аминоконца цепи иммуноцитокина. Сигнальным (лидерным) пептидом может быть сигнальный (лидерный) пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный (лидерный) пептид белка не иммуноглобулиновой природы).

Рекомбинантная экспрессия векторов по данному изобретению может нести регулирующие последовательности, которые контролируют экспрессию генов иммуноцитокина в клетке-хозяине. Специалистам в этой области будет понятно, что дизайн экспрессионного вектора, включая выбор регулирующих последовательностей, может зависеть от таких факторов, как селекция клетки-хозяина для трансформации, уровень экспрессии желаемого белка, и т.д. Предпочтительные регулирующие последовательности для экспрессирующей клетки-хозяина млекопитающих включают вирусные элементы, обеспечивающие

высокий уровень экспрессии белков в клетках млекопитающих, таких как промоторы и/или энхансеры, полученные из ретровирусной LTR, цитомегаловируса (CMV) (например, CMV промотора/энхансера), обезьяньего вируса 40 (SV40) (например, SV40 промотора/энхансера), аденовируса, (например, большого позднего промотора аденовируса (AdMLP)), вирус полиомы, а также сильных промоторов млекопитающих, таких как промотор нативных иммуноглобулинов или промотор актина. Методы экспрессии полипептидов в бактериальных клетках или клетках грибов, например дрожжевых клетках, также хорошо известны в данной области техники.

В дополнение к генам иммуноцитоклина и регулирующим последовательностям, рекомбинантные векторы экспрессии изобретения могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и гены селективируемого маркера. Ген селективируемого маркера облегчает селекцию клеток-хозяев, в которые был введен вектор.

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

Клетки-хозяева и способ их получения.

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

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к клетке-хозяину для получения иммуноцитоклина по изобретению, которая содержит любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот.

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

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие иммуноцитоклин по изобретению, и векторы, содержащие эти молекулы нуклеиновой кислоты, могут быть использованы для трансфекции подходящего млекопитающего или его клетки, растения или его клетки, бактериальной или дрожжевой клетки-хозяина. Преобразование может происходить любым известным способом для введения полинуклеотидов в клетку хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают декстран опосредованную трансфекцию, трансфекцию комплексом нуклеиновой кислоты и позитивно заряженного полимера, трансфекцию преципитатом нуклеиновой кислоты и фосфата кальция, полибрен опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, трансфекцию инкапсулированными в липосомы полинуклеотидами и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. В дополнение молекулы нуклеиновых кислот могут быть введены в клетки млекопитающих вирусными векторами.

Клеточные линии млекопитающих, используемые в качестве хозяев для трансформации, хорошо известны в данной области и включают множество иммортализованных доступных клеточных линий. К ним относятся, например, клетки яичников китайского хомячка (CHO), NS0 клетки, клетки SP2, НЕК-293Т клетки, 293 Фристейл клетки (Invitrogen), NIH-3T3 клетки, клетки HeLa, клетки почек хомячка (ВНК), клетки почек африканских зеленых марьшшек (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Пер G2), A549 клетки и ряд других клеточных линий. Клеточные линии выбираются путем определения, какие клеточные линии имеют высокие уровни экспрессии и обеспечивают необхо-

димые характеристики продуцируемого белка. Другими клеточными линиями, которые могут быть использованы, являются клеточные линии насекомых, такие как Sf9 или Sf21 клетки. Когда векторы рекомбинантной экспрессии, кодирующие иммуноцитокин по изобретению, вводятся в клетки-хозяева млекопитающих, иммуноцитокин продуцируется путем культивирования клеток-хозяев в течение времени, достаточного для экспрессии иммуноцитокина в клетках-хозяевах или, предпочтительнее, выделения иммуноцитокина в питательную среду, в которой выращиваются клетки-хозяева. Иммуноцитокин по изобретению может быть выделен из питательной среды с использованием стандартных методов очистки белка. Клетки-хозяева растений, например, включают *Nicotiana*, *Arabidopsis*, ячмень, кукурузу, пшеницу, картофель и т.д. Клетки бактерий хозяина включают виды *Escherichia* и *Streptomyces*. Дрожжевые клетки-хозяева включают *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

Кроме того, уровень продукции иммуноцитокина по изобретению из продуцирующей клеточной линии можно усилить с помощью ряда известных методов. Например, система экспрессии гена глутамин синтетазы (система GS) является достаточно распространенной для усиления экспрессии при определенных условиях.

Вполне вероятно, что иммуноцитокин по изобретению различных клеточных линий или трансгенные животные будут отличаться друг от друга профилем гликозилирования. Однако иммуноцитокин по изобретению, кодируемый молекулами нуклеиновой кислоты, описанными в данном документе, или содержащий аминокислотные последовательности, приведенные в настоящем документе, являются частью данного изобретения, независимо от состояния гликозилирования связывающих молекул и в целом, независимо от наличия или отсутствия посттрансляционных модификаций.

Вышеуказанная клетка-хозяин не относится к клетке-хозяину, полученной с использованием человеческих эмбрионов.

Вышеуказанная клетка-хозяин не относится к клетке-хозяину, полученной с модификации генетической целостности клеток зародышевой линии человека.

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

Настоящее изобретение относится к способам получения иммуноцитокина по изобретению. Один вариант осуществления изобретения относится к способу получения иммуноцитокина, как определено в настоящем документе, содержащему получение рекомбинантной клетки-хозяина, способной экспрессировать иммуноцитокин по изобретению, культивированию указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии продукции иммуноцитокина по изобретению, и выделение полученного иммуноцитокина. Иммуноцитокин, полученный такой экспрессией в таких рекомбинантных клетках-хозяевах, упоминается в данном документе как "рекомбинантный иммуноцитокин". Изобретение также относится к потоку клеток таких клеток-хозяев и иммуноцитокину, полученному аналогично.

Фармацевтическая композиция и фармацевтическая комбинация.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для активации IL-10R α рецептора человека, которая содержит иммуноцитокин по изобретению и один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов.

"Фармацевтическая композиция" обозначает композицию, включающую в себя иммуноцитокин по изобретению и по крайней мере один из компонентов, выбранных из группы, состоящей из фармацевтически приемлемых и фармакологически совместимых наполнителей, растворителей, разбавителей, носителей, вспомогательных, распределяющих и воспринимающих средств, средств доставки, таких как консерванты, стабилизаторы, наполнители, измельчители, увлажнители, эмульгаторы, суспендирующие агенты, загустители, подсластители, отдушки, ароматизаторы, антибактериальные агенты, фунгициды, лубриканты, регуляторы пролонгированной доставки, выбор и соотношение которых зависит от природы и способа назначения и дозировки. Примерами суспендирующих агентов являются этоксилированный изостеариловый спирт, полиоксиэтилен, сорбитол и сорбитовый эфир, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, а также смеси этих веществ. Защита от действия микроорганизмов может быть обеспечена с помощью разнообразных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, таких как парабены, хлорбутанол, сорбиновая кислота и подобные им соединения. Композиция может включать также изотонические агенты, например сахара, полиолы, хлористый натрий и им подобные. Пролонгированное действие композиции может быть обеспечено с помощью агентов, замедляющих абсорбцию активного начала, например моностеарат алюминия и желатин. Примерами подходящих носителей, растворителей, разбавителей и средств доставки являются вода, этанол, полиспирты, а также их смеси, растительные масла (такие как оливковое масло) и инъекционные органические сложные эфиры (такие как этилолеат). Примерами наполнителей являются лактоза, молочный сахар, цитрат натрия, карбонат кальция, фосфат кальция и им подобные. Примерами измельчителей и распределяющих средств являются крахмал, альгиновая кислота и ее соли, силикаты. Примерами лубрикантов являются стеарат магния, лаурилсульфат натрия, тальк, а также полиэтиленгликоль с высоким молекулярным весом. Фармацевтическая композиция для перорального, сублингвального, трансдер-

мального, внутриглазного, внутримышечного, внутривенного, подкожного, местного или ректального введения активного начала, одного или в комбинации с другим активным началом, может быть введена животным и людям в стандартной форме введения в виде смеси с традиционными фармацевтическими носителями. Пригодные стандартные формы введения включают пероральные формы, такие как таблетки, желатиновые капсулы, пилюли, порошки, гранулы, жевательные резинки и пероральные растворы или суспензии, сублингвальные и трансбуккальные формы введения, аэрозоли, имплантаты, местные, трансдермальные, подкожные, внутримышечные, внутривенные, интраназальные или внутриглазные формы введения и ректальные формы введения

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

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

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

Термины "тонический агент", "осмолитик" или "осмотический агент" в том виде, как они здесь использованы, относятся к эксципиенту, который может подводить осмотическое давление жидкого препарата иммуноцитокина по изобретению. "Изотоничный" препарат представляет собой препарат, который имеет осмотическое давление, эквивалентное давлению человеческой крови. Изотоничные препараты обычно имеют осмотическое давление от примерно 250 до 350 мОсм/кг. В качестве изотонических агентов могут быть использованы полиолы, моно- и дисахара, аминокислоты, соли металлов, например хлорид натрия, и т.п., но не ограничиваясь ими.

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

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для активации IL-10R α рецептора человека, которая содержит иммуноцитокин по изобретению и по меньшей мере одно другое терапевтически активное соединение.

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется другое терапевтически активное соединение, которое представляет собой антитело, химиотерапевтическое средство или средство для гормональной терапии.

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется другое терапевтически активное соединение, которое представляет собой ингибитор контрольных точек иммунитета.

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется ингибитор контрольных точек иммунитета, который выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется ингибитор PD- L1, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется антитело, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб (manelimab).

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется ингибитор PD-1, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется антитело, которое специфически связывается с PD-1 и выбрано из группы: пролголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется ингибитор CTLA-4, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с CTLA-4.

В некоторых вариантах фармацевтической композиции используется антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 и представляет собой ипилимумаб.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической комбинации для актив-

вазии IL-10R α рецептора человека, которая содержит вышеуказанный иммуноцитокин по изобретению и по меньшей мере одно другое терапевтически активное соединение.

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется другое терапевтически активное соединение, которое представляет собой антитело, химиотерапевтическое средство или средство для гормональной терапии.

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется другое терапевтически активное соединение, которое представляет собой ингибитор контрольных точек иммунитета.

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется ингибитор контрольных точек иммунитета, который выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется ингибитор PD-L1, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется антитело, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб (manelimumab).

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется ингибитор PD-1, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется антитело, которое специфически связывается с PD-1 и выбрано из группы: пролголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется ингибитор CTLA-4, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с CTLA-4.

В некоторых вариантах фармацевтической комбинации используется антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 и представляет собой ипилимумаб.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция или фармацевтическая комбинация используется для лечения онкологического заболевания.

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

Термины "онкологическое заболевание", "рак" или "раковый" относятся к физиологическому состоянию или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым(ой) ростом/пролиферацией клеток. Примеры онкологических заболеваний включают, но без ограничения, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких раковых заболеваний включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшины, печеночноклеточный рак, рак органов ЖКТ, включая рак желудка, рак поджелудочной железы, глиобластому, глиому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия и матки, карциному слюнных желез, рак почки (почечноклеточную карциному), рак предстательной железы (рак простаты), рак наружных женских половых органов, рак щитовидной железы, печеночную карциному, карциному анального канала, карциному пениса, меланому и различные типы рака головы и шеи.

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

Имуноцитокин по изобретению в составе фармацевтической композиции или комбинации находится в терапевтически эффективном количестве.

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

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

Фармацевтические композиции или фармацевтические комбинации по настоящему изобретению и способы их изготовления будут бесспорно очевидными для специалистов в этой области. Производство

фармацевтических композиций или фармацевтических комбинаций предпочтительно должно соответствовать требованиям GMP (надлежащей производственной практики). Композиция или комбинация может включать буферную композицию, тонические агенты, стабилизаторы и солибулизаторы. Пролонгированное действие композиции или комбинации может быть обеспечено с помощью агентов, замедляющих абсорбцию активного фармацевтического ингредиента, например, моностеарат алюминия и желатин. Примерами подходящих носителей, растворителей, разбавителей и средств доставки являются вода, этанол, полиспирты, а также их смеси, масла и инъекционные органические сложные эфиры.

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

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

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

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

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

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

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

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

Способ лечения/Применение для лечения.

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

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

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

В случае опухоли (например, раковой опухоли) терапевтически эффективное количество иммуноцитокина по изобретению может уменьшать число раковых клеток; уменьшать начальный размер опухоли; ингибировать (т.е. до некоторой степени замедлять и предпочтительно прекращать) инфильтрацию раковыми клетками окружающих органов; ингибировать (т.е. до некоторой степени замедлять и предпочтительно прекращать) метастазирование опухоли; ингибировать, до некоторой степени, рост опухоли; и/или облегчать, до некоторой степени, один или более симптомов, обусловленных заболеванием. Иммуноцитокин по изобретению может, до некоторой степени, предупреждать рост и/или убивать имеющиеся раковые клетки, оно может вызывать цитостатический и/или цитотоксический эффект. При терапии рака эффективность *in vivo* можно определять, например оценивая продолжительность жизни, время до прогрессирования заболевания (выживаемость без прогрессирования), частоту ответа опухоли на лечение (400), продолжительность ответа и/или качество жизни.

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

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

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

2) одновременное введение такой комбинации иммуноцитоксина по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы отдельно в разных лекарственных формах, введение которых происходит практически в одно и то же время указанному пациенту, после чего указанные компоненты высвобождаются практически одновременно указанному пациенту;

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

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

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению иммуноцитоксина по изобретению и по меньшей мере одного другого терапевтически активного соединения для лечения у субъекта, нуждающегося в таком лечении, онкологического заболевания.

Иммуноцитоксин по данному изобретению могут комбинировать с терапевтическим агентом, который выбирают из группы, включающей цитотоксическое средство, химиотерапевтическое средство, средство для гормональной терапии или другое терапевтическое антитело.

Термин "цитотоксическое средство" в используемом в настоящем описании смысле относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функционирование клеток и/или вызывает разрушение

клеток. Подразумевается, что термин включает радиоактивные изотопы (например, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические средства и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины, имеющие происхождение из бактерий, грибов, растений или животных, включая их фрагменты и/или варианты.

"Химиотерапевтическим средством" является химическое соединение, применимое для лечения злокачественной опухоли. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбохинон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метилмеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилмеламин; ацетогенины (например, буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (например, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, например калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II (см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)); динемидин, включая динемидин А; эспермицин; а также хромофор неокарциностатина и родственные хромофоры хромопротеинов - энединовые антибиотики, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая ADRIAMICIN®, морфолинодоксорубицин, циано-морфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин, доксорубицино HCl в инъеклируемых липосомах (DOXOL®), липосомный доксорубицин TLC D-99 (MYOCET®), пегилированный липосомный доксорубицин (CAELYX®) и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пурумицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (GEMZAR®), тегафур (UFTORAL®), капецитабин (XELODA®), эпотилон и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флу-дарабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; средства, подавляющие функции надпочечников, такие как аминоклоротетимид, митотан, трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фолиевая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминолевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демекколдин; диазихон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофирин; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (например, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("ага-С"); тиотепа; таксоид, например паклитаксел (TAXOL®), препарат паклитаксела на основе сконструированных связанных с альбумином наночастиц (ABRAXANETM) и доцетаксел (TAXOTERE®); хлорамбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; средства на основе платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; алкалоиды барвинка, которые предотвращают полимеризацию тубулина из образующихся микротрубочек, включая винбластин (VELBAN®), винкристин (ONCOVIN®), виндезин (ELDISINE®, FILDESIN®) и винорелбин (NAVELBINE®); этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; лейковорин; новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота, включая бексаротен (TARGRETIN®); бифосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), этидронат (DIDROCAL®), NE-58095, золедроновую кислоту/золедронат (ЗОМЕТА®), алендронат (FOSAMAX®), памидронат (AREDIA®), тилудронат (SKELID®) или ризендронат (ACTONEL®); троксацитабин (1,3-диоксолановый нуклеозидный аналог цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, например олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию генов в путях передачи сигналов, вовлеченных в пролиферацию аберрантных клеток, таких как, например, PKC-альфа, Raf, H-Ras и рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины,

такие как вакцина THERATOPE® и вакцины для генной терапии, например вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы 1 (например, LURTOTECAN®); gmRH (например, ABARELIX®); BAY439006 (сорафениб; Bayer); SU-11248 (Pfizer); перифосин, ингибитор ЦОГ-2 (например, целекоксиб или эторикоксиб), ингибитор протеосом (например, PS341); бортезомиб (VELCADE®); CCI-779; типифарниб (811577); орафениб, ABT510; ингибитор Vcl-2, такой как облимерсен натрия (GENASENSE®); пиксантрон; ингибиторы EGFR (см. определение ниже); ингибиторы тирозинкиназ (см. определение ниже) и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше средств; а также сочетания двух или более указанных выше средств, такие как CHOP, сокращенное название комбинированной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном, и FOLFOX, сокращенное название схемы лечения оксалиплатином (ELOXATINTM) в сочетании с 5-FU и лейковорином.

Также в указанное определение включены средства для гормональной терапии, которые действуют, регулируя или ингибируя действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены со смешанным профилем агонист/антагонист, включая тамоксифен (NOLVADEX®), 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, торемифен (FARESTON®); идоксифен, дролоксифен, ралоксифен (EVISTA®), триоксифен, кеоксифен и избирательные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), такие как SERM3; чистые антиэстрогены без агонистических свойств, такие как фулвестрант (FASLODEX®) и EM800 (такие средства могут блокировать димеризацию рецепторов эстрогена (ER), ингибировать связывание ДНК, усиливать метаболизм ER и/или снижать уровни ER); ингибиторы ароматазы, включая стероидные ингибиторы ароматазы, такие как форместан и эксместан (AROMASIN®), и нестероидные ингибиторы ароматазы, такие как анастразол (ARIMIDEX®), летрозол (FEMARA®) и аминоклутетимид и другие ингибиторы ароматазы, включая ворозол (RIVISOR®), ацетат мегестрола (MEGASE®), фадрозол, имидазол; агонисты рилизинг-гормона лютеинизирующего гормона, включая лейпролид (LUPRON® и ELIGARD®), гозерелин, бузерелин и триптерелин; половые стероиды, включая прогестины, такие как ацетат мегестрола и ацетат медрон и андрогены/ретиноиды, такие как флуоксиместерон, оксипрогестерона, эстрогены, такие как диэтилстилбестрол и премарилностью трансретиноевая кислота и фенретинид; онапристон; антипрогестероны; понижающие регуляторы рецепторов эстрогенов (ERD); антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид; тестолактон; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше средств; а также сочетания двух или более указанных выше средств.

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

В некоторых вариантах применения используется другое терапевтически активное соединение, которое представляет собой ингибитор контрольных точек иммунитета.

Термин "ингибитор контрольной точки иммунитета" (или "чекпойнт-ингибитор") относится к соединениям, которые подавляют активность контрольных точек иммунитета. Ингибирование включает снижение функции или полную блокаду. Примеры ингибиторных молекул контрольных точек включают B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, KIR, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, TIGIT и VISTA. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом, специфически распознающим белок иммунных контрольных точек. Известен ряд ингибиторов иммунных контрольных точек, и в ближайшем будущем могут быть разработаны альтернативные ингибиторы иммунных контрольных точек по аналогии с этими известными ингибиторами белков иммунных контрольных точек. Ингибиторы иммунных контрольных точек включают в качестве неограничивающих примеров пептиды, антитела, молекулы нуклеиновой кислоты и низкомолекулярные соединения.

В некоторых вариантах применения используется ингибитор контрольных точек иммунитета, который выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

В некоторых вариантах применения используется ингибитор PD-L1, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах применения используется антитело, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб (manelimab).

В некоторых вариантах применения используется ингибитор PD-1, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-1.

В некоторых вариантах применения используется антитело, которое специфически связывается с PD-1, выбрано из группы: пролголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

В некоторых вариантах применения используется ингибитор CTLA-4, который представляет собой антитело, которое специфически связывается с CTLA-4.

В некоторых вариантах применения используется антитело, которое специфически связывается с CTLA-4 и представляет собой ипилимумаб.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу активации IL-10R α рецептора человека у субъекта, нуждающегося в такой активации, который включает введение субъекту эффективного количества иммуноцитокина по изобретению или любой вышеуказанной фармацевтической композиции по изобретению, нуждающемуся в таком лечении, в терапевтически эффективном количестве.

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

Дозы и пути введения.

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

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

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

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

Примеры подходящих способов введения предусмотрены выше.

Предполагается, что подходящая доза иммуноцитокина по данному изобретению будет в диапазоне от 0,007-200 мг/кг, предпочтительно 0,007-100 мг/кг, в том числе около 0,5-50 мг/кг, например около 1-20 мг/кг. Иммуноцитокин по данному изобретению может быть введен, например, в дозе по меньшей мере 0,25 мг/кг, например, по меньшей мере 0,5 мг/кг, в том числе не менее 1 мг/кг, например, по меньшей мере 1,5 мг/кг, например, не менее 2 мг/кг, например, по меньшей мере 3 мг/кг, в том числе по меньшей мере 4 мг/кг, например, по меньшей мере 5 мг/кг и, например, вплоть до максимально 50 мг/кг, в том числе вплоть до максимально 30 мг/кг, например, вплоть до максимально 20 мг/кг, в том числе

вплоть до максимально 15 мг/кг. Введение будет повторяться обычно в подходящие промежутки времени, например один раз в неделю, один раз в две недели, один раз каждые три недели или один раз каждые четыре недели, и так долго, как будет сочтено целесообразным ответственным врачом, который может в некоторых случаях увеличить или уменьшить дозу при необходимости.

Осуществление изобретения

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

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

Материалы и общие методы.

Общая информация, касающаяся нуклеотидных последовательностей легких и тяжелых цепей человеческого иммуноглобулина, представлена у: Kabat E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Аминокислоты цепей антител пронумерованы согласно нумерации EU (Edelman G.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63, 1969, ee. 78-85; Kabat E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

Методы рекомбинантной ДНК.

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

Синтез генов.

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

Определение последовательностей ДНК.

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования по Сэнгеру.

Анализ последовательностей ДНК и белков и обработка данных о последовательностях.

Применяли пакет программ фирмы Infomax's Vector NT1 Advance suite, версия 8.0 для создания, картирования, анализа, аннотирования и иллюстрации последовательностей.

Экспрессионные векторы.

Для экспрессии описанных антител и антигенов применяли варианты экспрессионных плазмид, предназначенных для экспрессии в клетках прокариот (*E.coli*) кратковременной экспрессии в клетках эукариот (например, в клетках СНО). Помимо кассеты экспрессии антитела векторы содержали: сайт инициации репликации, обеспечивающий репликацию указанной плазмиды в *E.coli*, гены, придающие устойчивость в *E.coli* к различным антибиотикам (например, к ампициллину и канамицину).

Слияние генов, содержащих описанные цепи антитела, как указано ниже, осуществляли с помощью ПЦР и/или синтеза и сборки генов с использованием известных методов и процедур рекомбинации путем соединения соответствующих сегментов нуклеиновых кислот, например, с использованием уникальных сайтов рестрикции в соответствующих векторах. Субклонированные нуклеотидные последовательности подтверждали секвенированием ДНК. Для кратковременных трансфекций создавали большие количества плазмид посредством получения плазмид из трансформированных культур *E. coli*.

Пример 1.

Получение последовательностей генов human IL-10R α , а также ортологичных генов IL-10R α *Mascasa cynomolgus* (*fascicularis*) и IL-10R α *Oryctolagus cuniculus* (*Rabbit*).

Для клонирования последовательностей экстраклеточных частей рецепторов human IL-10R α (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q13651>) и IL-10R α *Mascasa cynomolgus* (<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A2K5WJ66>) синтезировали олигонуклеотиды по 60 нуклеотидов каждый, образующие полностью перекрывающуюся последовательность гена. Сборку каждого гена производили методом двухраундовой ПЦР, в результате чего получали фрагмент длиной 642 п.о. Далее клонировали экстраклеточную часть рецептора в вектор для транзientной экспрессии pIntA с EPEA-тагом для аффинной очистки белка.

Для клонирования последовательности экстраклеточной части рецептора IL-10R α *Oryctolagus cuniculus* из клеток периферической крови кролика была выделена суммарная РНК и наработана кДНК. Продукты обратной транскрипции использовали в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции для

получения гена рецептора, фланкированного сайтами рестрикции. Далее клонировали ген рецептора в вектор для транзientной экспрессии pIntA с EPEA-тагом (фиг. 1) для аффинной очистки белка. Клонированные нуклеотидные последовательности подтверждали секвенированием ДНК.

Пример 2.

Получение последовательности слитого белка IL-10 человека и Fc-фрагмента, а также слитого белка IL-10 кролика и Fc-фрагмента.

Для клонирования гена, содержащего последовательность IL-10 человека/кролика и Fc-фрагмента IgG1 человека, осуществляли слияние генов с помощью ПЦР и/или синтеза и сборки генов с использованием известных методов и процедур рекомбинации путем соединения соответствующих сегментов нуклеиновых кислот, например, с использованием SOE-PCR (Splicing by overlap extension). Далее клонировали ген слитого белка в вектор для транзientной экспрессии pIntA (фиг. 2). Клонированные нуклеотидные последовательности подтверждали секвенированием ДНК.

Пример 3.

Выделение и очистка рецепторов IL-10R α человека, макаки и кролика из суспензионной культуры клеток млекопитающих.

Рекомбинантные белки (рецепторы IL-10R α кролика, человека и обезьяны, IL-10 кролика) нарабатывали в среде роста клеток CHO-C. После трансфекции клеток экспрессионными векторами проводили орбитальное feed-batch культивирование в бессывороточной среде в течение 5-10 дней. По окончании культивирования среду центрифугировали при 2000 g в течение 20 мин и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Целевые белки выделяли из культуральной жидкости с помощью аффинной хроматографии на хроматографической системе Akta Pure 25, используя колонку XK 16 (GE Healthcare) с 5 мл CaptureSelect C-tag Affinity Matrix (Thermo Scientific) и Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare). Культуральную жидкость наносили на колонку с CaptureSelect C-tag Affinity Matrix, после чего отмыли колонку 20 mM Tris HCl, pH 7 с 150 mM NaCl и элюировали белок 2 M раствором MgCl₂ в 20 mM Tris HCl, pH 7 с 150 mM NaCl. Далее белок переводили в 20 mM Tris HCl, pH 7 с 150 mM NaCl с помощью диализа, после чего концентрировали препарат до 1 мл и наносили на колонку GE Superdex 200 Increase 10/300 GL, уравновешенную раствором 20 mM Tris HCl, pH 7 с 150 mM NaCl. Собрали целевой пик и профильтровали полученный раствор (0,22 мкм). Препараты хранили при -70°C. Чистоту полученного раствора белка оценивали с помощью SDS-гель-электрофореза (фиг. 3).

Пример 4.

Выделение и очистка иммуноцитокина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека (IL-10-Fc) из суспензионной культуры клеток млекопитающих.

Рекомбинантный белок IL-10-Fc по изобретению нарабатывали в среде роста клеток CHO-C. После трансфекции клеток экспрессионным векторам проводили орбитальное feed-batch культивирование в бессывороточной среде в течение 5-10 дней. Контроль секреции исследуемого иммуноцитокина проводили с использованием системы анализа молекулярных взаимодействий Pall ForteBio Octet RED96 на биосенсорах proteinA.

По окончании культивирования среду центрифугировали при 2000 g в течение 20 мин и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Целевые белки выделяли из культуральной жидкости с помощью аффинной хроматографии на хроматографической системе Akta Pure 25, используя колонки HiTrap rProtein A FF, 5 мл и HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare). Культуральную жидкость наносили на колонку HiTrap rProtein A FF, после чего отмыли колонку PBS и элюировали белок раствором 100 mM цитратного буфера pH 3, после чего нейтрализовали раствор белка добавлением 2 M ацетатного буфера pH 6 в отношении 1/10 v/v. Далее белок переводили в 20 mM ацетатный буфер pH 6 с помощью диализа, после чего концентрировали препарат и наносили на колонку HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR, уравновешенную раствором 200 mM ацетатного буфера pH 6. Собрали целевой пик и профильтровали полученный раствор (0,22 мкм). Препарат хранили при -70°C. Чистоту полученного раствора белка оценивали с помощью SDS-гель-электрофореза (фиг. 4).

Пример 5.

Кинетические исследования аффинности и специфичности взаимодействия иммуноцитокина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека (IL-10-Fc) с рецепторами IL-10R α человека, яванской макаки, мыши и кролика с помощью Forte Bio OctetRed96.

Оценку связывания IL-10-Fc человека по изобретению с рецептором IL-10 человека, а также рецепторами IL-10R α яванской макаки, мыши и кролика провели методом биослойной интерферометрии на приборе OctetRed96 (Pall). На сенсоры AR2G связали IL-10-Fc согласно инструкции производителя для подготовки и иммобилизации AR2G сенсоров. Затем сенсоры с иммобилизованным IL-10 погружали в лунки с рецептором IL-10R α человека, макаки, мыши или кролика. После ассоциации интерлейкина и рецептора сенсоры погружались в рабочий раствор для последующей стадии диссоциации. Полученные сенсограммы с вычетом базового сигнала анализировали с помощью программы Octet Data Analysis (версия 8.0) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1. Согласно полученным данным (табл. 1) IL-10-Fc по изобретению связывается с IL-10 рецепторами человека, яванской

макаки, мыши.

Таблица 1

Константы аффинности взаимодействия IL-10-Fc по изобретению с рецепторами IL-10 человека, яванской макаки, мыши и кролика.

	Константа аффинности (KD), M			
	Рецептор IL-10 человека, M	Рецептор IL-10 яванской макаки, M	Рецептор IL-10 мыши, M	Рецептор IL-10 кролика, M
IL-10-Fc	5.1±0.3	3.7±0.4	2.1±0.2	2.03E-08

Пример 6.

Анализ термостабильности иммуноцитоклина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека (IL-10-Fc).

Рекомбинантный белок IL10-Fc по изобретению в 20 mM ацетатном буфере pH6 нагревали с помощью амплификатора в пластиковой пробирке при 50°C в течение 48 ч с последующим переходом на 4°C. После окончания программы анализировали пробы до и после прогрева с помощью аналитической гель-хроматографии на колонке TSK Gel G3000 SWxl. Сравнили площади целевых пиков образцов до и после прогрева. Изменение в 7% площади пика димера после нагрева в течение 48 ч свидетельствует о стабильности препарата и возможности длительного хранения (табл. 2).

Таблица 2

Сравнение соотношения площади пиков на хроматограммах препарата IL-10-Fc по изобретению до и после прогрева

Образец	% соотношение пиков		
	Σ агрегатов, %	димер, %	Σ фрагментов, %
До прогрева	1,80	97,25	0,96
После прогрева	7,99	89,97	2,05

Пример 7.

Анализ стабильности иммуноцитоклина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека (IL-10-Fc) при длительном хранении в сыворотке человека при 37°C.

IL-10 имеет относительно короткий период полувыведения из организма. Например, период полураспада у мышей, измеренный с помощью биоанализа *in vitro* или по эффективности в системе моделирования септического шока [см. Smith et al., Cellular Immunology, 173:207-214 (1996)], составляет примерно от 2 до 6 ч. В настоящем исследовании под стабильностью понимали снижение концентрации полноразмерных молекул кандидатов IL-10 после хранения в сыворотке человека при 37°C *in vitro*. Для определения стабильности иммуноцитоклина IL-10-Fc разводили в сыворотке человека до концентрации 5 мкг/мл и хранили при 37°C в термостате от 24 ч до 14 дней. В аналогичных условиях хранились образцы чистой сыворотки человека для последующего определения фонового значения концентраций исследуемых образцов. После хранения концентрацию образцов определяли методом иммуноферментного анализа. Обсчет данных и построение графиков выполняли с помощью программного пакета MS Excel (фиг. 5).

Таким образом, IL-10+Fc по изобретению обладает высокой стабильностью в сыворотке крови за счет устойчивости к расщеплению протеазами сыворотки, которая обеспечивается особенностью структуры данного слитого белка, указанной в SEQ ID NO: 1.

Пример 8.

Определение пролиферативной активности иммуноцитоклина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека (IL-10-Fc) в клеточном тесте на MC/9 тучных клетках мыши.

Необходимый этап реализации функции цитокина - это взаимодействие цитокина с его рецептором. Анализ активации рецептора IL-10Rα исследуемыми кандидатами проводили на клеточной линии MC/9 в стандартном пролиферативном тесте в присутствии костимулирующего цитокина IL-4. В литературе показано, что IL-10 стимулирует пролиферацию мышинных тучных клеток MC/9 в присутствии IL-4 (Thompson-Snipes L. et al. J. Exp. Med. 1991, doi: 10.1084/jem.173.2.507 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2118779/>). Этот тест используется как стандартный для оценки биологической активности коммерчески доступных препаратов рекомбинантного IL-10 человека. Контрольный препарат (IL-10 рекомбинантный человеческий) имеет активность ≤2.0 нг/мл в пролиферативном тесте на линии MC/9, заявленную производителем (Peprotech).

Тест проводили в культуральном 96-луночном планшете для работы с суспензионными культурами клеток. Суспензия в каждой лунке содержала 10000 клеток MC/9 и исследуемые кандидаты (IL-10 ре-

комбинантный человеческий Reprotech каталожный номер 200-10 и IL-10+Fc по изобретению) в указанной на графике концентрации. Конечный объем суспензии в лунке составлял 150 мкл. Все компоненты суспензии готовили в среде RPMI-1640, содержащей 2 mM глутамина, 10 мкг/мл гентамицина, 10% инактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) и 10 пг/мл IL-4. После добавления всех компонентов планшет инкубировали в течение 72 ч при 37°C во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂. По окончании инкубационного периода вносили в лунки 17 мкл красителя Alamar Blue и инкубировали планшет в течение 3-6 ч при 37°C во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂ до развития розовой окраски. Измерение флуоресценции проводили при помощи планшетного ридера при длине волны 495/590 нм.

Таким образом, IL-10-Fc по изобретению активирует рецептор IL-10R α , что подтверждено в пролиферативном клеточном тесте на клетках линии MC/9 (фиг. 6). Полумаксимальная эффективная концентрация (EC50) исследуемого иммуноцитокина IL-10+Fc по изобретению составила 53,3 пМ в данном клеточном тесте, тогда как EC50 контрольного образца рекомбинантного человеческого IL-10 производства Reprotech - 91,7 пМ. Полученные данные свидетельствуют о более высокой активности IL-10+Fc по изобретению по сравнению с коммерчески доступным IL-10.

Пример 9.

Тест для определения функциональной активности иммуноцитокина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека (IL-10-Fc) по выбросу IFN- γ CD8⁺ Т-клетками человека.

Антигеннезависимая активация TCR и CD28 на CD8⁺ Т-лимфоцитах *in vitro* (через анти-CD3 и анти-CD28 антитела) вызывает экспрессию PD1 на поверхности клеток, что приводит к подавлению активности цитотоксических лимфоцитов и впоследствии к их истощению. Одновременно с этим происходит экспрессия на клеточной поверхности рецептора IL-10R α , активация которого при взаимодействии с IL-10 оказывает антиапоптотический эффект, что способствует выживанию в микроокружении опухоли цитотоксических Т клеток, продуцирующих различные цитокины, в том числе IFN- γ .

Периферические мононуклеарные клетки крови человека (PBMCs) были изолированы из цельной крови здорового донора путем центрифугирования в градиенте плотности фикола. Далее из суспензии клеток PBMCs выделяли CD8⁺ Т-клетки на магнитной колонке с помощью коммерческого набора.

Тест проводили в 96-луночном планшете с предварительно иммобилизованными в лунках анти-CD3 антителами (1 мкг/мл). Суспензия в каждой лунке содержала 30000 CD8⁺ Т-клеток, а также анти-CD28 антитело в концентрации 1 мкг/мл. Конечный объем клеточной суспензии и антител в лунке составлял 200 мкл, все компоненты суспензии готовили в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS. Планшет инкубировали в течение 3 дней при 37°C, 5% CO₂. На 4-й день инкубации клетки собирали и отмывали от анти-CD28 антитела центрифугированием. Полученный клеточный осадок суспендировали в среде RPMI-1640 с 10% FBS в концентрации 0,3 \times 10⁶ клеток/мл. В лунки нового заранее подготовленного 96-луночного планшета для ИФА с иммобилизованным на пластик анти-CD3 антителом (1 мкг/мл) вносили по 100 мкл отмывтых клеток и 100 мкл антител-кандидатов в указанной на графике концентрации. Планшет инкубировали в течение 3-х дней при 37°C, 5% CO₂. На 4-й день инкубации из лунок отбирали аликвоты культуральной жидкости и определяли концентрацию

Таким образом, IL-10+Fc по изобретению показывает способность вызывать продукцию цитокина IFN- γ активированными цитотоксическими CD8⁺ Т-клетками человека. Полумаксимальная эффективная концентрация IL-10-Fc по изобретению в разработанном клеточном тесте на активированных CD8⁺ Т-клетках человека составляет 0,2 нг/мл.

Пример 10.

Тест на определение влияния иммуноцитокина (слитого белка) на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека (IL-10-Fc) на цитотоксичность CD8⁺ Т-клеток человека в отношении клеток-мишеней Raji.

Периферические мононуклеарные клетки крови человека (PBMCs) были изолированы из цельной крови здорового донора путем центрифугирования в градиенте плотности фикола. Далее из суспензии клеток PBMCs выделяли CD8⁺ Т-клетки на магнитной колонке.

В 96-луночный планшет с предварительно иммобилизованными в лунках анти-CD3 антителами (1 мкг/мл) вносили 200 мкл суспензии, содержащей 30 000 CD8⁺ Т-клеток и 1 мкг/мл анти-CD28 антитела, и инкубировали в течение 3 дней при 37°C, 5% CO₂. Далее клетки собирали, отмывали центрифугированием, суспендировали в среде RPMI-1640 с 10% FBS и вносили по 30000 в лунки нового заранее подготовленного 96-луночного планшета для ИФА с иммобилизованным на пластик анти-CD3 антителом (1 мкг/мл) и растворов антител-кандидатов в указанной на графике концентрации. Планшет инкубировали в течение 3 дней при 37°C, 5% CO₂. Далее из лунок планшета отбирали клетки, отмывали их центрифугированием и суспендировали осадки в среде RPMI-1640 10% в концентрации 0,3 \times 10⁶ клеток/мл.

К 2 \times 10⁶ клеток Raji внесли 6,5 мкл раствора кальцеин-AM. Инкубировали клетки с кальцеином 30 мин при 37°C в CO₂ инкубаторе. По окончании инкубации клетки дважды отмывали от кальцеина центрифугированием. Приготовили суспензию с концентрацией 0,3 \times 10⁶ клеток/мл.

Тест проводили в культуральном 96-луночном планшете. Суспензия в каждой лунке содержала 30000 CD8⁺ Т-клеток, 30000 клеток Raji, меченных кальцеином-AM, а также анти-CD3/CD20 антитело в

конечной концентрации 50 нг/мл. Планшет инкубировали 2,5 ч в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂.

За 30 мин до окончания инкубации в лунки с контролем максимального лизиса внесли раствор лизирующего буфера. Измеряли показания флуоресценции на планшетном ридере при 485/538 нм.

Показано, что культивирование CD8⁺ Т-лимфоцитов в присутствии IL-10+Fc по изобретению усиливает их цитотоксическую активность в отношении клеток-мишеней Raji в 7 раз по сравнению с контролем (фиг. 7).

Пример 11.

Тест на определение CDC-активности.

В тесте на определение CDC использовали клеточную линию Jurkat. Тест проводили в культуральном 96-луночном планшете. Суспензия в каждой лунке содержала по 50000 клеток Jurkat, а также IL-10+Fc по изобретению в указанной концентрации и комплемент сыворотки крови человека, разведенный 1:4. Конечный объем клеточной суспензии в лунке составлял 150 мкл, все компоненты суспензии готовили в среде RPMI-1640, содержащей 0,1% BSA. Далее планшет инкубировали в течение 4 ч при 37°C, 5% CO₂. В каждую лунку вносили по 15 мкл реактива аламар синий и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ 16 ч. В качестве положительного контроля использовали антитело с CDC-активностью Ритуксимаб (CO83031118R) производства ЗАО "Биокад" и клетки-мишени Raji, в той же концентрации, что и клетки Jurkat. Величину флуоресценции оценивали при длине волны возбуждения 544 нм, длине волны испускания - 590 нм, используя планшетный ридер.

Показано, что IL-10+Fc по изобретению не вызывает опосредованный комплементом лизис (CDC) клеточной линии Jurkat (фиг. 8).

Пример 12.

Тест на определение ADCC-активности.

В тесте использовали репортерную клеточную линию Jurkat-NFAT-Luc-CD16, созданную на основе клеточной линии Jurkat, стабильно экспрессирующую на поверхности CD16 и содержащую ген, кодирующий люциферазу светляка, под контролем NFAT-промотора; в качестве клеток мишеней использовали Jurkat-PD1 клон 43. Тест проводили с целью подтверждения отсутствия эффекторных свойств у исследуемого иммуноцитокина IL-10+Fc по изобретению.

Тест проводили в белом культуральном 96-луночном планшете для работы с люминесценцией. Суспензия в каждой лунке содержала 25000 клеток-эффекторов Jurkat-NFAT-Luc-CD16, 25000 клеток-мишеней Jurkat-PD1, а также IL-10-Fc по изобретению в указанной на графике концентрации. В качестве положительного контроля использовали эффекторное антитело анти-PD1 производства ЗАО "Биокад". Конечный объем клеточной суспензии и иммуноцитокина (IL-10+Fc по изобретению) в лунке составлял 75 мкл, все компоненты суспензии готовили в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS. После добавления всех компонентов планшеты инкубировали в течение 5 ч при 37°C, 5% CO₂ и далее с помощью набора для оценки люциферы One-Glo (Promega) измеряли интенсивность люминесценции в лунках. Люминесценцию измеряли на планшетном ридере.

Показано, что IL-10+Fc по изобретению не обладает антителозависимой клеточной цитотоксичностью в тесте на репортерной клеточной линии Jurkat-NFAT-Luc-CD16-V176 (фиг. 9).

Пример 13.

Тест на определение аутоцитотоксичности.

Тест позволяет *in vitro* оценить вызываемое антителом истощение основных субпопуляций лейкоцитов в крови, что, в свою очередь, позволяет еще до *in vivo* исследований оценить безопасность разрабатываемых терапевтических молекул.

Тест проводили в культуральном 96-луночном планшете для работы с суспензионными культурами. Суспензия в каждой лунке содержала 300000 свежeweделенных клеток PBMCs здоровых доноров и IL-10+Fc по изобретению в указанной концентрации, конечный объем клеточной суспензии в лунке составлял 150 мкл. В качестве положительного контроля использовали Obinutuzumab (aCD20) и анти-CD47 антитело. Все компоненты суспензии готовили в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональную бычью сыворотку. После смешивания PBMCs и антител планшет инкубировали в течение 16 ч при 37°C, 5% CO₂. Далее оценивали в суспензиях долю CD45⁺, CD56⁺, CD19⁺, CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляций PBMCs с помощью прямого окрашивания суспензий флуоресцентно-мечеными антителами против соответствующих CD и последующего анализа клеток на проточном цитофлуориметре. Для CD56⁺, CD19⁺, CD3⁺ клеток на графиках приведена доля от CD45⁺ клеток анализируемой суспензии, для CD4⁺, CD8⁺ - доля от CD45⁺CD3⁺ клеток.

В *in vitro* тесте на аутоцитотоксичность IL-10+Fc по изобретению не вызывает существенного истощения популяций NK, В и Т клеток PBMCs человека (фиг. 10А-10Д). При этом контрольное антитело Obinutuzumab (aCD20) показало практически полную деплецию популяции CD20⁺ В-клеток, а анти-CD47 антитело - истощение NK клеток почти на 50%.

Пример 14.

Исследование противоопухолевой активности *in vivo*.

Исследование проводили на мышах Balb/c (самцы в возрасте 4-6 недель, массой тела 18-24 г).

Взвесь опухолевых клеток СТ26 в объеме 0,1 мл вводили подкожно в правый бок мышей в количестве 2×10^5 клеток. Когда опухоли достигли приблизительного объема ($V=LW^2/2$) в 70 мм^3 , животные были распределены на группы так, чтобы средний объем опухоли в группах не отличался более чем на 10%. Введение всех препаратов проводили внутрибрюшинно (i.p.) дважды в неделю в течение 3 недель. Во всех случаях IL-10-Fc по изобретению вводили в дозе 0,1 мг/кг, amPD-1 вводили в дозе 10 мг/кг. Введение amPD-1 в группах с комбинацией IL-10-Fc по изобретению осуществляли на следующий день после введения IL-10-Fc по изобретению. Животным из группы "контроль роста опухоли" вводили буфер. Оценку линейных размеров опухолевого узла осуществляли дважды в неделю. ИПО (индекс прироста опухоли) рассчитывали как отношение объема опухоли в день измерения (1-19) к объему опухоли в день начала лечения.

Показано, что IL-10+Fc по изобретению обладает противоопухолевой активностью в монотерапии, при этом комбинация IL-10+Fc по изобретению с анти-PD1 антителом обладает выраженной синергией в противоопухолевой активности по сравнению с монотерапией как иммуноцитокина IL-10+Fc по изобретению, так и анти-PD-1 антителом (фиг. 11-13).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный иммуноцитокин для активации IL-10R α рецептора человека, включающий гомодимерный комплекс на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека, где мономер на основе IL-10 и Fc-фрагмента IgG1 человека включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.
2. Выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует иммуноцитокин по п.1.
3. Выделенная нуклеиновая кислота по п.2, где нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.
4. Выделенная нуклеиновая кислота по п.2, где нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 3.
5. Выделенная нуклеиновая кислота по п.2, где нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 4.
6. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.2-5.
7. Способ получения клетки-хозяина для получения иммуноцитокина по п.1, включающий трансформирование клетки вектором по п.6.
8. Клетка-хозяин для получения иммуноцитокина по п.1, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп.2-5.
9. Способ получения иммуноцитокина по п.1, включающий культивирование клетки-хозяина по п.8 в культуральной среде в условиях, достаточных для получения указанного иммуноцитокина, при необходимости, с последующим выделением и очисткой полученного иммуноцитокина.
10. Фармацевтическая композиция для активации IL-10R α рецептора человека, содержащая иммуноцитокин по п.1 и один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов.
11. Фармацевтическая композиция по п.1, в которой указанная фармацевтическая композиция предназначена для активации рецептора IL-10R α человека.
12. Фармацевтическая композиция по п.10 для лечения онкологического заболевания.
13. Фармацевтическая композиция по п.12, где онкологическое заболевание выбирают из группы: ПРГШ (плоскоклеточный рак головы и шеи), рак шейки матки, рак без выявленного первоисточника, глиобластома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, ТНРМЖ (трижды негативный рак молочной железы), КРР (колоректальный рак), гепатоцеллюлярная карцинома, меланома, НМРЛ (немелкоклеточный рак легкого), рак почки, рак яичника, колоректальный рак с высокой микросателлитной нестабильностью, лейкоз (острый или миелобластный), лимфома, множественная миелома, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, саркома, гепатоцеллюлярная карцинома, глиобластома, лимфома Ходжкина, Т- и В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, мелкоклеточный рак легкого, рефрактерная В-клеточная неходжкинская лимфома, фолликулярная лимфома, В-клеточная лимфома маргинальной зоны, крупноклеточная В-клеточная диффузная лимфома, рак поджелудочной железы, рак яичника, миелодиспластический синдром высокого риска.
14. Фармацевтическая композиция для активации IL-10R α рецептора человека, содержащая иммуноцитокин по п.1 и по меньшей мере одно другое терапевтически активное соединение.
15. Фармацевтическая композиция по п.14 для лечения онкологического заболевания.
16. Фармацевтическая композиция по п.15, где онкологическое заболевание выбирают из группы: ПРГШ (плоскоклеточный рак головы и шеи), рак шейки матки, рак без выявленного первоисточника, глиобластома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, ТНРМЖ (трижды негативный рак молочной железы), КРР (колоректальный рак), гепатоцеллюлярная карцинома, меланома, НМРЛ (немелкоклеточный рак легкого), рак почки, рак яичника, колоректальный рак с высокой микросателлитной нестабильностью, лейкоз (острый или миелобластный), лимфома, множественная миелома, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, саркома, гепатоцеллюлярная карцинома, глиобластома, лимфома Ходжкина, Т- и В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, мелкоклеточный рак легкого, рефрактерная В-клеточная неходжкинская лимфома, фолликулярная лимфома, В-клеточная лимфома

маргинальной зоны, крупноклеточная В-клеточная диффузная лимфома, рак поджелудочной железы, рак яичника, миелодиспластический синдром высокого риска.

17. Фармацевтическая композиция по любому из пп.14, 15, где другое терапевтически активное соединение представляет собой антитело, химиотерапевтическое средство или средство для гормональной терапии.

18. Фармацевтическая композиция по любому из пп.14, 15, где другое терапевтически активное соединение представляет собой ингибитор контрольных точек иммунитета.

19. Фармацевтическая композиция по п.18, где ингибитор контрольных точек иммунитета выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

20. Фармацевтическая композиция по п.19, где антитело, которое специфически связывается с PD-1, выбрано из группы: пролголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

21. Фармацевтическая композиция по п.19, где антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, представляет собой ипилимумаб.

22. Применение по п.19, где антитело, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб.

23. Способ лечения онкологического заболевания, включающий введение субъекту иммуноцитокина по п.1 или фармацевтической композиции по любому из пп.10, 14, нуждающемуся в таком лечении, в терапевтически эффективном количестве.

24. Способ лечения по п.23, где онкологическое заболевание выбирают из группы: ПРГШ (плоскоклеточный рак головы и шеи), рак шейки матки, рак без выявленного первоисточника, глиобластома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, ТНРМЖ (трижды негативный рак молочной железы), КРР (колоректальный рак), гепатоцеллюлярная карцинома, меланома, НМРЛ (немелкоклеточный рак легкого), рак почки, рак яичника, колоректальный рак с высокой микросателлитной нестабильностью, лейкоз (острый или миелобластный), лимфома, множественная миелома, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, саркома, гепатоцеллюлярная карцинома, глиобластома, лимфома Ходжкина, Т- и В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, мелкоклеточный рак легкого, рефрактерная В-клеточная неходжкинская лимфома, фолликулярная лимфома, В-клеточная лимфома маргинальной зоны, крупноклеточная В-клеточная диффузная лимфома, рак поджелудочной железы, рак яичника, миелодиспластический синдром высокого риска.

25. Способ активации IL-10R α рецептора человека у субъекта, нуждающегося в такой активации, включающий введение субъекту эффективного количества иммуноцитокина по п.1 или фармацевтической композиции по любому из пп.10, 14.

26. Применение иммуноцитокина по п.1 или фармацевтической композиции по любому из пп.10, 14 для лечения у субъекта, нуждающегося в таком лечении, онкологического заболевания.

27. Применение по п.26, где онкологическое заболевание выбирают из группы: ПРГШ (плоскоклеточный рак головы и шеи), рак шейки матки, рак без выявленного первоисточника, глиобластома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, ТНРМЖ (трижды негативный рак молочной железы), КРР (колоректальный рак), гепатоцеллюлярная карцинома, меланома, НМРЛ (немелкоклеточный рак легкого), рак почки, рак яичника, колоректальный рак с высокой микросателлитной нестабильностью, лейкоз (острый или миелобластный), лимфома, множественная миелома, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, саркома, гепатоцеллюлярная карцинома, глиобластома, лимфома Ходжкина, Т- и В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, мелкоклеточный рак легкого, рефрактерная В-клеточная неходжкинская лимфома, фолликулярная лимфома, В-клеточная лимфома маргинальной зоны, крупноклеточная В-клеточная диффузная лимфома, рак поджелудочной железы, рак яичника, миелодиспластический синдром высокого риска.

28. Применение иммуноцитокина по п.1 и по меньшей мере одного другого терапевтически активного соединения для лечения у субъекта, нуждающегося в таком лечении, онкологического заболевания.

29. Применение по п.28, где онкологическое заболевание выбирают из группы: ПРГШ (плоскоклеточный рак головы и шеи), рак шейки матки, рак без выявленного первоисточника, глиобластома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, ТНРМЖ (трижды негативный рак молочной железы), КРР (колоректальный рак), гепатоцеллюлярная карцинома, меланома, НМРЛ (немелкоклеточный рак легкого), рак почки, рак яичника, колоректальный рак с высокой микросателлитной нестабильностью, лейкоз (острый или миелобластный), лимфома, множественная миелома, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, саркома, гепатоцеллюлярная карцинома, глиобластома, лимфома Ходжкина, Т- и В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, мелкоклеточный рак легкого, рефрактерная В-клеточная неходжкинская лимфома, фолликулярная лимфома, В-клеточная лимфома маргинальной зоны, крупноклеточная В-клеточная диффузная лимфома, рак поджелудочной железы, рак яичника, миелодиспластический синдром высокого риска.

30. Применение по любому из пп.28, 29, где другое терапевтически активное соединение представляет собой антитело, химиотерапевтическое средство или средство для гормональной терапии.

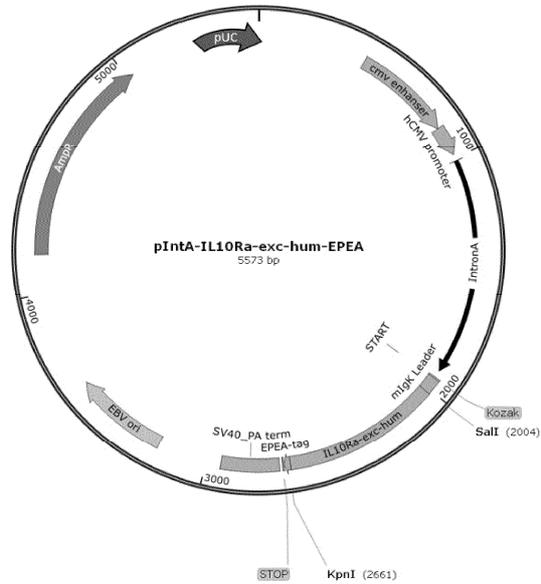
31. Применение по любому из пп.28, 29, где другое терапевтически активное соединение представляет собой ингибитор контрольных точек иммунитета.

32. Применение по п.31, где ингибитор контрольных точек иммунитета выбран из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 или ингибитора CTLA-4.

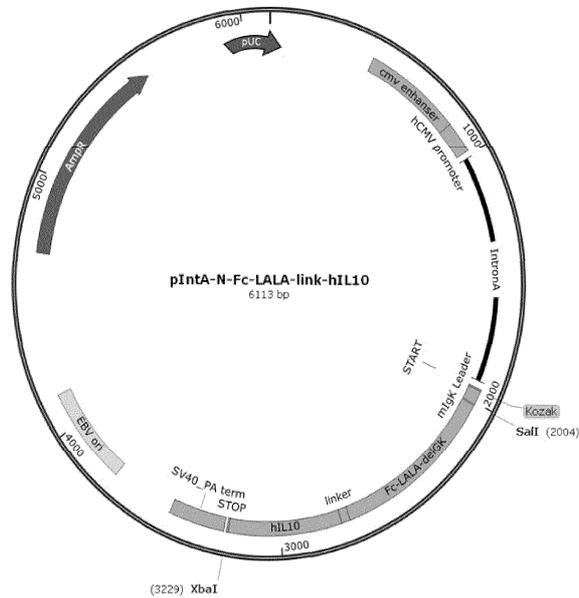
33. Применение по п.32, где антитело, которое специфически связывается с PD-1, выбрано из группы: пролголимаб, пембролизумаб, ниволумаб.

34. Применение по п.32, где антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, представляет собой ипилимумаб.

35. Применение по п.32, где антитело, которое специфически связывается с PD-L1, выбрано из группы: дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, манелимаб.

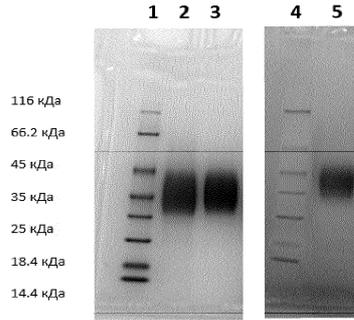


Фиг. 1



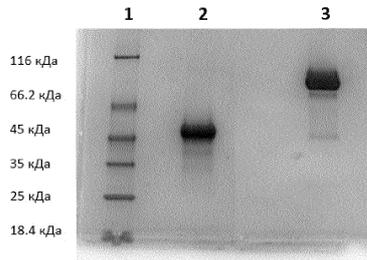
Фиг. 2

047872



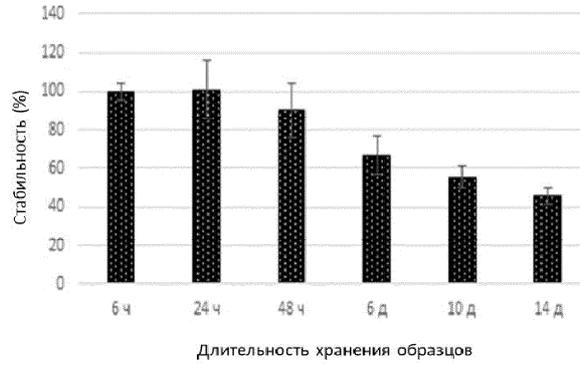
- 1) Маркеры молекулярной массы белков
- 2) IL10Ra экс-EPEA человека
- 3) IL10Ra экс-EPEA яванской макаки
- 4) Маркеры молекулярной массы белков
- 5) IL10Ra экс-EPEA кролика

Фиг. 3

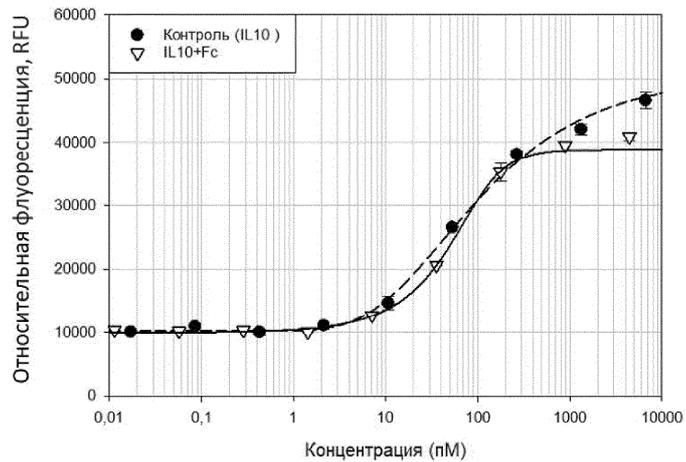


- 1) Маркеры молекулярной массы белков
- 2) IL10-Fc 4,5 мкг в редуцирующих условиях
- 3) IL10-Fc 4,5 мкг в нередуцирующих условиях

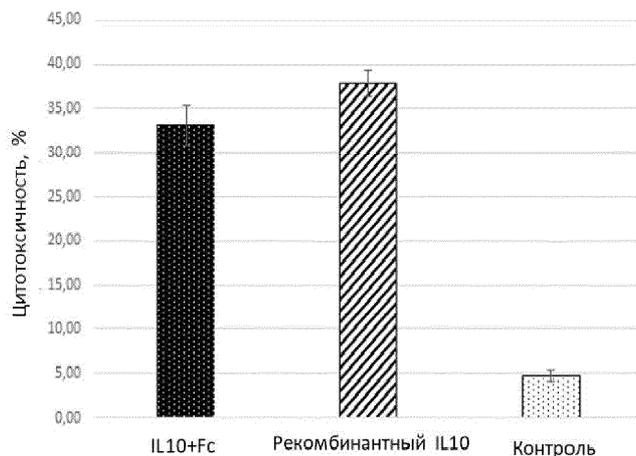
Фиг. 4



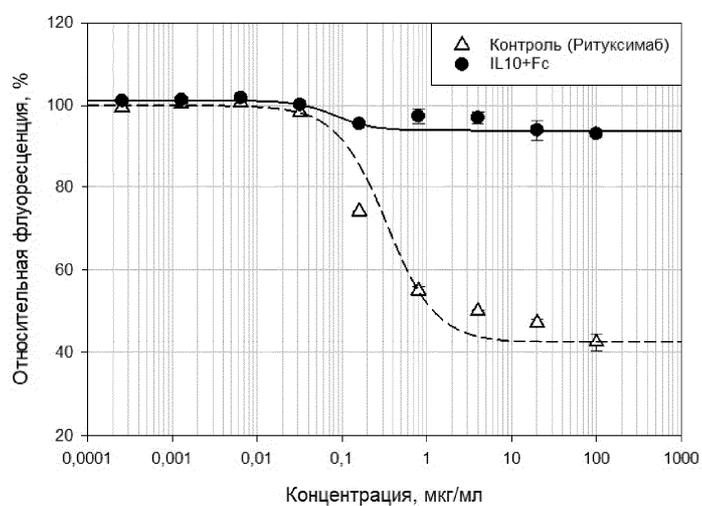
Фиг. 5



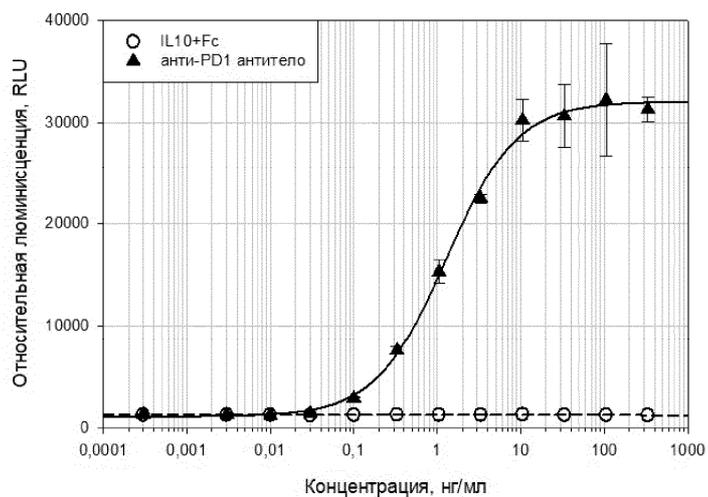
Фиг. 6



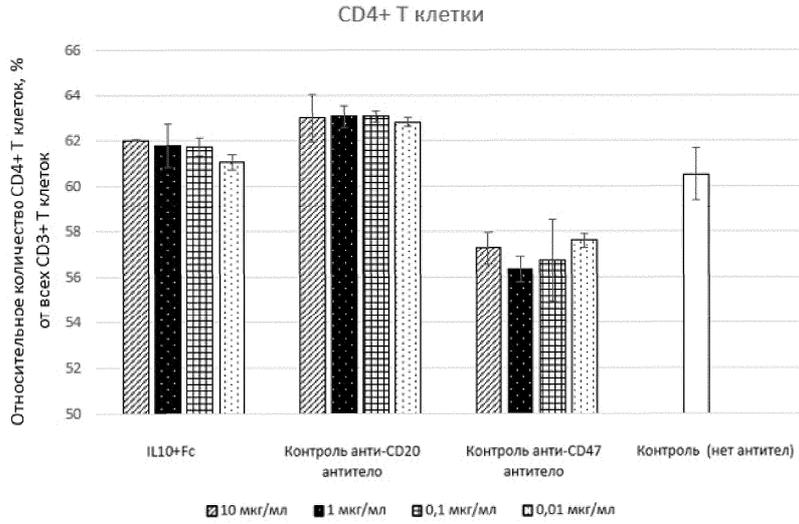
Фиг. 7



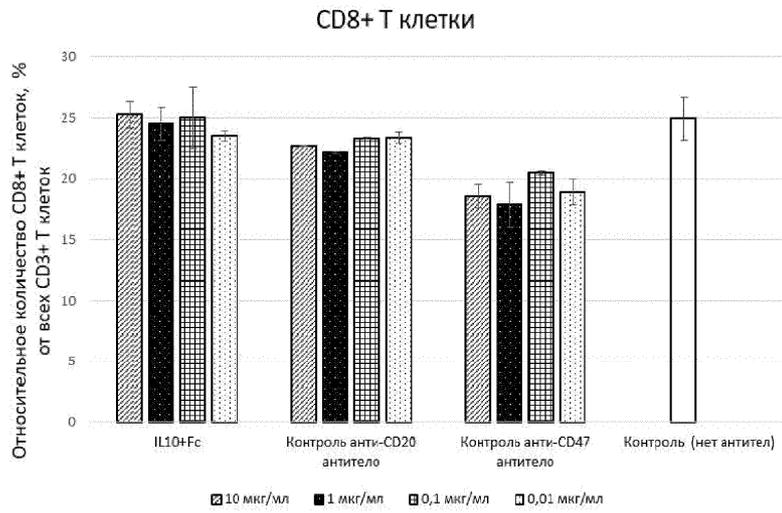
Фиг. 8



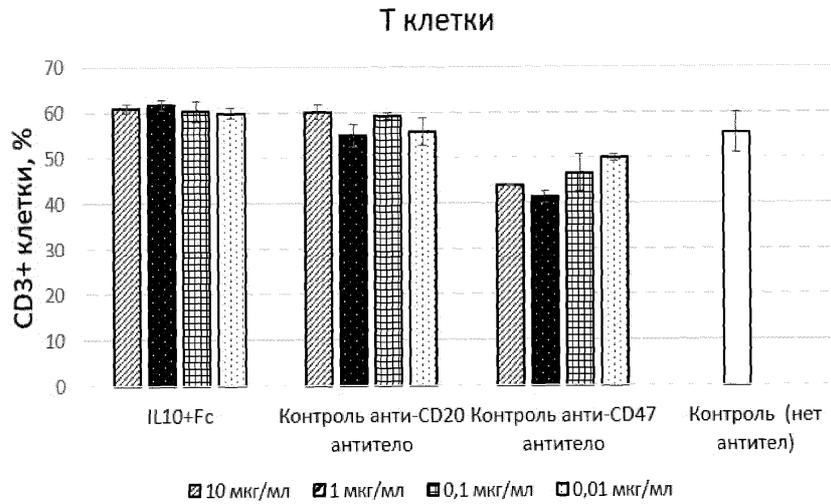
Фиг. 9



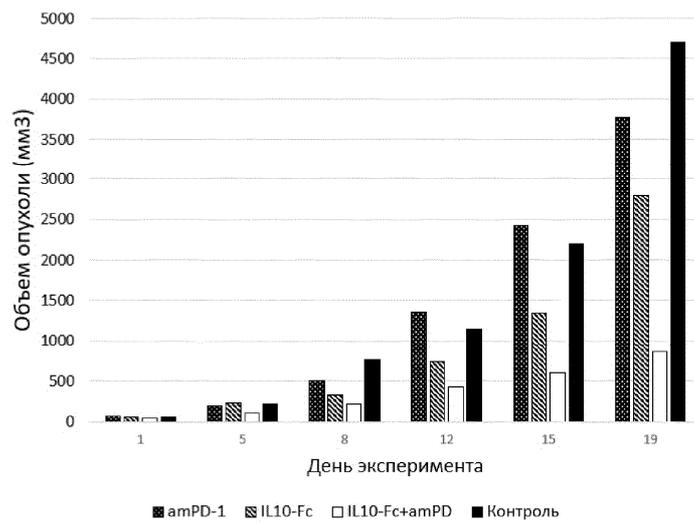
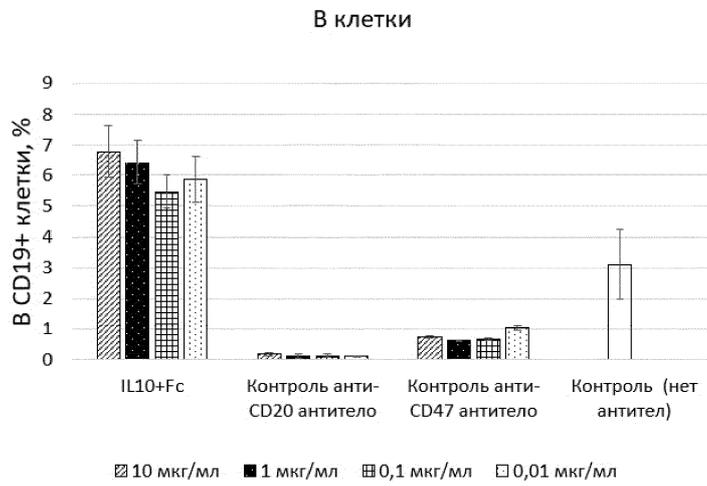
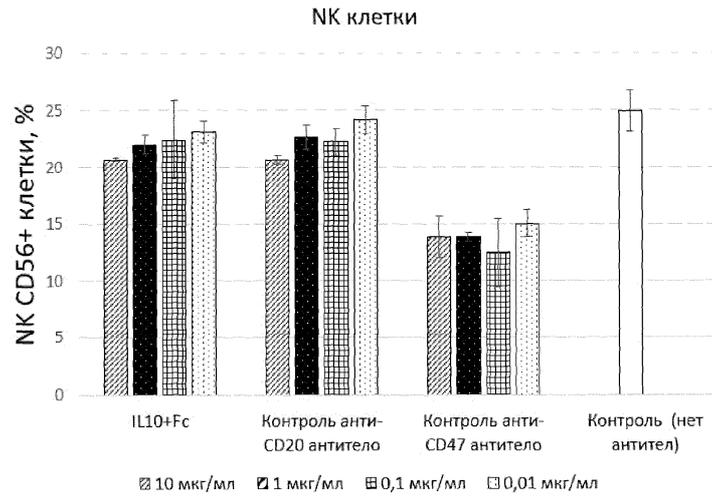
Фиг. 10А

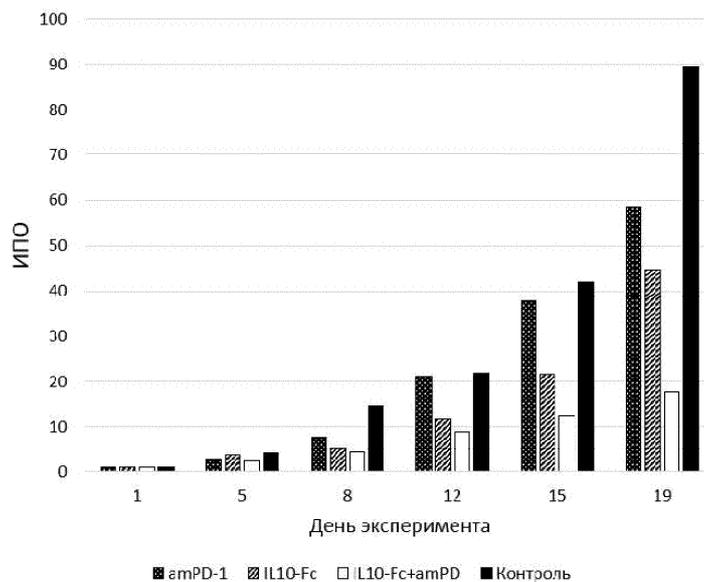


Фиг. 10Б

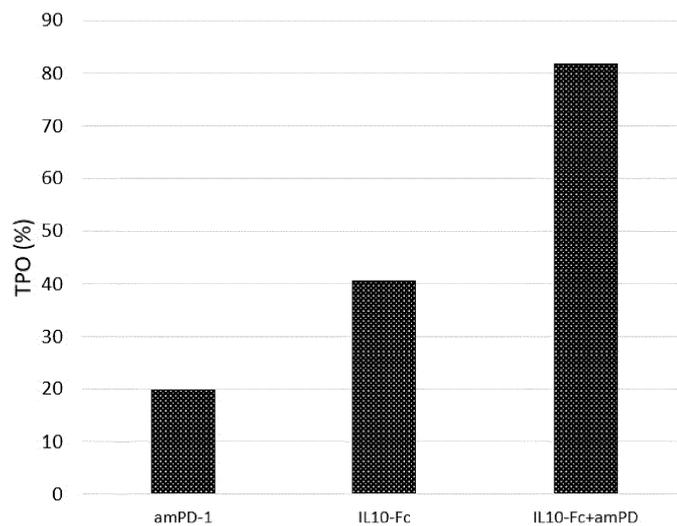


Фиг. 10В

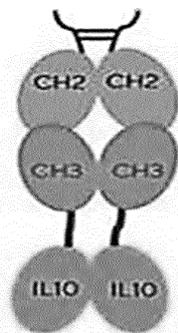




Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

