

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392780** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.02.23**

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2022.04.29**

(54) **КОМПОЗИЦИИ К SIGLEC И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **63/182,271**

(32) **2021.04.30**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/027006**

(87) **WO 2022/232558 2022.11.03**

(71) Заявитель:

**ОнкоСи4, ИНК.; ЮНИВЕРСИТИ ОФ  
МЭРИЛЕНД, БАЛТИМОР (US)**

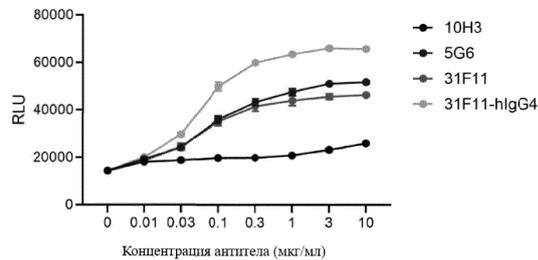
(72) Изобретатель:

**Лю Ян, Чжэн Пань, Девенпорт  
Мартин, Лю Миньюэ (US)**

(74) Представитель:

**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,  
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к антителам к Siglec-10 и применению таких антител в терапии рака.



**A1**

**202392780**

**202392780**

**A1**

## КОМПОЗИЦИИ К SIGLEC И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к антителам к Siglec-10, которые селективно связывают Siglec-10 человека, и к применению таких антител в терапии рака.

### ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] CD24 представляет собой небольшой сильно гликозилированный муцин-подобный гликозилфосфатидилинозитол (GPI), связанный с белком клеточной поверхности. CD24 экспрессируется на более высоком уровне на гемопоэтических клетках, включая В-клетки, Т-клетки, нейтрофилы, эозинофилы, дендритные клетки и макрофаги, а также негемопоэтические клетки, включая нервные клетки, ганглиозные клетки, эпителиальные клетки, кератиноциты, мышечные клетки, клетки поджелудочной железы и эпителиальные стволовые клетки. Как правило, CD24 имеет тенденцию экспрессироваться на более высоких уровнях в клетках-предшественниках и метаболически активных клетках и в меньшей степени в терминально дифференцированных клетках. Функция CD24 неясна в большинстве типов клеток, но сообщалось о различных иммунологических функциях CD24.

[0003] CD24 взаимодействует с Siglec-10 на врожденных иммунных клетках для отрицательной регуляции реакции хозяина на клеточное повреждение, связанное с воспалением, и по меньшей мере два перекрывающихся механизма могут объяснить эту активность. Во-первых, CD24 связывается с несколькими молекулярными паттернами, связанными с повреждением (DAMP), включая HSP70, 90, HMGB1 и нуклеолин, и подавляет ответ хозяина на эти DAMP. Предполагается, что CD24 может улавливать воспалительные стимулы, чтобы предотвратить их взаимодействие с TLR или RAGE. Во-вторых, посредством взаимодействия со своим рецептором, Siglec G (мышинный гомолог Siglec-10), CD24 обеспечивает мощную отрицательную регуляцию реакции хозяина на повреждения тканей. Для достижения этой активности CD24 может связывать и стимулировать передачу сигналов с помощью Siglec G, где SHP1, ассоциированный с Siglec G, запускает отрицательную регуляцию. Оба механизма могут действовать согласованно, поскольку мыши с направленной мутацией любого гена демонстрируют гораздо более сильный воспалительный ответ.

[0004] Siglec представляют собой трансмембранные белки I типа, где NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-конец находится во внеклеточном пространстве, а COO<sup>-</sup>-конец является цитозольным. Внеклеточный домен Siglec-10 содержит N-концевой домен иммуноглобулина V-типа (домен

Ig), который действует как рецептор, связывающий сиаловую кислоту, и пять доменов Ig C2-типа, которые не обладают связывающей активностью, но удлиняют Ig-связывающий домен V-типа от поверхности клетки. Цитоплазматические домены большинства Siglec, включая Siglec-10, имеют иммунорецепторные ингибирующие мотивы на основе тирозина (ITIM) и сигнализируют отрицательно посредством рекрутинга тирозинфосфатаз, таких как домен SH2, содержащий протеинтирозинфосфатазы SHP1 и SHP2. Основная функция Siglecs заключается в связывании гликанов, содержащих сиаловые кислоты. Эти взаимодействия рецептор-гликан могут быть использованы в клеточной адгезии, клеточной сигнализации и других функциях, которые часто ограничиваются их клеточным распределением. Siglec-10 человека является функциональным ортологом мышинного Siglec G и связывает CD24 мыши и человека.

[0005] Многие виды рака избегают клиренса иммунной системой посредством сверхэкспрессии антифагоцитарных поверхностных белков, называемых сигналами "не ешь меня". Примеры таких белков включают PD-L1 и CD47, которые связываются с PD-1 и сигнально-регуляторным белком  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) на иммунных клетках, соответственно, которые ингибируют активность макрофагов. Соответственно, антитела, которые блокируют или выступают антагонистами этим путям "не ешь меня", были разработаны в качестве иммуноонкологических препаратов. Было продемонстрировано, что CD24 представляет собой еще один такой сигнал "не ешь меня" посредством его взаимодействия с Siglec-10, и, хотя CD24 обнаруживается во многих нормальных тканях и типах клеток, CD24 сверхэкспрессируется почти в 70% случаев рака человека и является одним из наиболее сверхэкспрессируемых белков в раковых клетках. Экспрессия CD24 повышается во время онкогенеза, что указывает на его роль в прогрессировании опухоли и метастазировании. Сверхэкспрессия CD24 при раке также была идентифицирована как маркер, указывающий на плохой прогноз и более агрессивное течение заболевания у онкологических больных.

[0006] Соответственно, в данной области техники существует потребность в новых иммунотерапиях, которые нацелены на ось "не ешь меня" CD24:Siglec-10 для лечения рака.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В данном изобретении предложено антитело к Siglec-10, которое может содержать (a) переменную область тяжелой цепи, содержащую одну или более из определяющих комплементарность областей (CDR) 1, содержащей последовательность SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащей последовательность SEQ ID NO: 4, и CDR3, содержащей последовательность SEQ ID NO: 5; и (b) переменную область легкой цепи, содержащую одну

или более из CDR1, содержащей последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащей последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащей последовательность SEQ ID NO: 8. Варибельная область тяжелой цепи может содержать последовательность SEQ ID NO: 1, а варибельная область легкой цепи может содержать последовательность SEQ ID NO: 2. Антитело может представлять собой химерное антитело.

[0008] Варибельная область тяжелой цепи антитела к Siglec-10 может содержать последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO: 9-13, и варибельная область легкой цепи может содержать последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO: 14-18. Варибельная область тяжелой цепи может содержать последовательность SEQ ID NO: 9, 10 или 11; и варибельная область легкой цепи может содержать последовательность SEQ ID NO: 15. Варибельная область тяжелой цепи антитела к Siglec-10 может содержать последовательность SEQ ID NO: 10 или 12; и варибельная область легкой цепи может содержать последовательность SEQ ID NO: 17. Варибельная область тяжелой цепи антитела к Siglec-10 может содержать последовательность SEQ ID NO: 10 или 12; и варибельная область легкой цепи может содержать последовательность SEQ ID NO: 16. Антитело может содержать варибельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 9, и варибельную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15. Антитело может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 25, и может дополнительно содержать легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 27. Антитело может содержать варибельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 10, и варибельную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15 или 16. Антитело может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 27. Антитело может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 34.

[0009] В настоящем документе также предложен способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, который может включать введение пациенту антитела к Siglec-10. Дополнительно предложено антитело к Siglec-10 для применения при лечении рака и применение антитела к Siglec-10 при изготовлении лекарственного средства для лечения рака. Также предложена композиция, содержащая антитело к Siglec-10 для лечения рака. Композиция может представлять собой фармацевтическую композицию.

[0010] Антитело к Siglec-10 может быть введено в комбинации со второй противораковой терапией или может быть предназначено для применения в комбинации со второй противораковой терапией. Вторая противораковая терапия может представлять собой иммунотерапию, нацеленную на рак, или иммунотерапию, нацеленную на иммунные клетки. Вторая противораковая терапия может представлять собой антитело к CTLA-4.

[0011] Рак может представлять собой распространенную солидную опухоль, гематологический рак или рак, который включает инфильтрирующие клетки, связывающиеся с антителом к Siglec-10. Рак может представлять собой распространенную солидную опухоль, которая может представлять собой аденокарциному легкого (LUAD), кожную меланому-метастаз (SKCM-TM), плоскоклеточную карциному легкого (LUSC), инвазивную карциному молочной железы-базальную карциному, инвазивную карциному молочной железы-Her2, аденокарциному поджелудочной железы, плоскоклеточную карциному головы и шеи, почечную светлоклеточную карциному, аденокарциному желудка, мультиформную глиобластому, инвазивную карциному молочной железы-LumB или инвазивную карциному молочной железы-LumA, немелкоклеточный рак легкого, глиобластому, меланому, глиому низкой степени злокачественности, рак почки, базальный тип рака молочной железы, Her2+ рак молочной железы, рак поджелудочной железы или рак яичников. Аденокарцинома легкого может представлять собой немелкоклеточную аденокарциному легкого. Гематологический рак может представлять собой лейкоз, синдром миелоидной дисплазии, В-клеточную лимфому или множественную миелому.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0012] На фиг. 1 показана антагонистическая активность антител к Siglec-10 в репортерном анализе антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Градиентные дозы 4 различных антител к Siglec-10 сравнивали по их способности восстанавливать ADCC, подавленную Siglec-10, эктопически экспрессируемую в эффекторных клетках Jurkat ADCC. Мишень: клон 9 CHO-CTLA4-OFP ( $2 \times 10^4$ ). Эффектор: Jurkat-PWPI-Siglec10 ( $2 \times 10^4$ ). Антитело, запускающее ADCC: mAb (моноклональное антитело) к CTLA4 (0,1 г/мл).

[0013] На фиг. 2 показана специфичность связывания mAb 31F11 к Siglec-10, определенная с помощью ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ). Слитые белки Siglec наносили на планшет и добавляли биотинилированный 31F11. Связанное антитело обнаруживали с помощью конъюгированного с пероксидазами хрена стрептавидина.

[0014] На фиг. 3 показана специфичность связывания mAb 31F11 к Siglec-10, определенная с помощью проточной цитометрии. Клетки 293Т трансфицировали кДНК Siglec, конъюгированных с GFP (зеленый флуоресцентный белок). Клетки окрашивали 31F11 и анализировали с помощью цитометра Canto II.

[0015] На фиг. 4А-В показано, что mAb 31F11 к Siglec-10 демонстрирует сильное ингибирование связывания Siglec-10Fc с клетками селезенки мыши. Фиг. 4А. Блок-схема экспериментального протокола. Фиг. 4В. Процент ингибирования связывания Siglec-10Fc (S10) с клетками селезенки.

[0016] На фиг. 5 показано, что mAb 31F11 к Siglec-10 способствует фагоцитозу раковых клеток макрофагами. Моноциты человека, выделенные из периферической крови, стимулировали средой RPMI-1640 с добавлением 40 нг/мл M-CSF в течение 5-7 дней. Затем макрофаги M2 индуцировали 50 нг/мл TGF $\beta$ 1 и IL10 в течение 24 часов. Клетки MCF-7 метили красителем CELLTRACE™ Violet BMO и совместно культивировали с донорскими макрофагами M2 в присутствии mAb к Siglec-10, 5G6, 10H3 и 31F11 (mFc - мышинный Fc; hFc - человеческий Fc), указанной концентрации в течение 2 часов. Клетки окрашивали антителом к CD11b, конъюгированным с APC, и фагоцитоз (%) определяли с помощью проточной цитометрии на основе процента CD11b+ клеток с фиолетовым красителем среди общего количества CD11b+ клеток. Показанные данные представляют собой средние значения и стандартные ошибки процента макрофагов, которые поглотили раковые клетки, как определено с помощью проточной цитометрии.

[0017] На фиг. 6А-В показана синергетическая противоопухолевая активность антител к CD24 и к Siglec-10.  $1 \times 10^6$  клеток MC38-hCD24 инокулировали подкожно химерным мышам BM, состоящим из клеток костного мозга трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий Siglec-10 (n равно 4-5). Мышей обрабатывали 100 мкг hIgFc,  $\alpha$ -hCD24, 31F11 ( $\alpha$ -S10) или  $\alpha$ -hCD24+ 31F11 Abs на 7, 10, 13 и 16 день после трансплантации опухоли. Фиг. 6А. Кинетика роста опухоли. Фиг. 6В. Процент мышей, несущих опухоль, с течением времени.

[0018] На фиг. 7 показана характеристика гуманизированных клонов 31F11 для их связывания с клеточной поверхностью Siglec-10, эктопически экспрессируемой на клетках Jurkat. Показанные данные представляют собой процент максимального связывания относительно градиентных доз антител.

[0019] На фиг. 8 показана термическая стабильность гуманизированных клонов 31F11. Данные по каждому из них приведены в таблице 1.

Таблица 1. Tm гуманизированного клона 31F11

	Tm1			Tm2		
Химерное	65,8	65,8	65,8			
#21	63,6	63,7	63,7	78,6	78,5	78,5
#22	63,7	63,8	63,8	78,5	78,5	78,5
#23	64	64	63,9	80,6	80,7	80,6
#32	67	66,6	67			
#34	64,5	64,4	64,4	71,6	71,7	71,7
#52	66,7	66,6	66,6			
#54	69,2	68,9	69,2			

[0020] На фиг. 9 показана антагонистическая активность гуманизированных клонов 31F11, основанная на их активности в анализе репортерной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).  $5 \times 10^4$  клеток Jurkat-PWPI-S10 и  $5 \times 10^4$  клеток CHO-hCTLA4 совместно культивировали с 0,1 мкг/мл антител к hCTLA4 и антител к siglec 10 указанных концентраций. Через 16-24 часа инкубации во все тестовые лунки добавляли реагент для анализа люциферазы Bio-Glo™ и измеряли люминесценцию с помощью планшет-ридера с возможностями люминесцентного считывания свечения. Показанные данные представляют собой процент максимальной активности ADCC относительно градиента доз антител.

[0021] На фиг. 10А-В показана передача сигналов Siglec-10, подавляющая репортерную активность ADCC. Фиг. 10А. Диаграмма репортерного анализа. Репортерные клетки Jurkat активируют экспрессию NFAT при активации FcγR1A в присутствии клетки-мишени, экспрессирующей CTLA-4, и различной концентрации mAb к CTLA-4, ипилимумаба. Фиг. 10В. Репортерная активность репортерных клеток Jurkat, экспрессирующих векторный контроль (ADCC3-p), белок WT Siglec-10 (ADCC3-10) или мутантный Siglec-10 с мутацией Y в А в положении 667 домена ITIM, которые частично предотвращают отрицательную передачу сигналов Siglec-10 (ADCC3-10-667).

[0022] На фиг. 11 показана превосходная активность 31F11 в усилении активности ADCC. В качестве репортерных клеток использовали репортерные клетки Jurkat, экспрессирующие Siglec-10, ADCC3-10. В качестве клеток-мишеней использовали клетки

СНО, экспрессирующие CTLA-4. Клетки совместно культивировали в присутствии 0,1 мкг/мл mAb ONC-392 к CTLA-4 и серийно разведенных mAb 10H3, 5G6 и 31F11 к Siglec-10. Конструкция анализа показана на фиг. 10А. Сравнивали полученные дозы трех mAb к Siglec-10.

[0023] На фиг. 12 показана схема того, как ONC-841, как полагают, блокирует сигналы "не ешь меня" (DNEMS) с помощью CD24-Siglec-10 для стимулирования фагоцитоза опухолевых клеток.

[0024] На фиг. 13 показан механизм ONC-841 в комбинированной терапии с ONC-392. ONC-392 вызывает отторжение опухоли путем селективного истощения Treg в микроокружении опухоли, тем самым усиливая внутриопухолевый Т-клеточный ответ; в то время как ONC-841 усиливает ADCC/ACDP-опосредованное истощение Treg путем антагонистического подавления, опосредованного Siglec-10.

[0025] На фиг. 14А-В показано связывание ONC-841 с рекомбинантными белками семейства Siglec. Фиг. 14А. Специфичность ONC-841 к His-меченому или Fc-меченому Siglec. Фиг. 14В. ONC-841 продемонстрировал связывание с IgG1Fc человека в высокой концентрации аналогично Siglec-5Fc, Siglec-6Fc, Siglec-11Fc и Siglec-14Fc, предполагая, что связывание ONC-841 с Siglec-5Fc, Siglec-6Fc, Siglec-11Fc и Siglec-14Fc обусловлено неспецифическим связыванием с Fc-меткой, а не специфическим связыванием с рекомбинантными белками Siglec.

[0026] На фиг. 15 показано, что ONC-841 блокирует связывание Siglec-10Fc с клетками Jurkat-CTLA4. Siglec-10 Fc-биотин предварительно объединяли со стрептавидином-PE и инкубировали с повышающимися концентрациями ONC-841 в течение 5 минут перед инкубацией с клетками Jurkat-CTLA4 в течение 1 часа.

[0027] На фиг. 16А-В показано влияние ONC-841 на связывание Siglec-10Fc с Treg. Фиг. 16А. Репрезентативные данные, демонстрирующие связывание Siglec-10-биотин плюс стрептавидин-PE с Treg с (светло-серый) или без (темно-серый) 100 мкг/мл ONC-841. Стрептавидин-PE показан серым цветом в качестве отрицательного контроля. Фиг. 16В. Нелинейный регрессионный анализ блокады ONC-841 связывания Siglec-10Fc-биотин плюс стрептавидин-PE с Treg.

[0028] На фиг. 17А-С показан эффект ONC-841 в антителозависимом репортерном анализе ADCC. Фиг. 17А. ONC-841 способствует ADCC, зависимой от антитела к CD20, против клеток Raji. Фиг. 17В. ONC-841 способствует ADCC, зависимой от цетуксимаба, против клеток В16, экспрессирующих EGFR. Фиг. 17С. ONC-841 способствует ONC-392-

зависимой ADCC против CTLA-4-экспрессирующих клеток CHO. Показанные данные нормализованы, чтобы показать кратное увеличение активности ADCC по сравнению с исходным уровнем.

[0029] На фиг. 18А-С показано действие ONC-841 в ADCC и независимое от антител уничтожение лейкозных клеток НК-клетками человека. Фиг. 18А. Без ONC-392. Фиг. 18В. С ONC-392. Фиг. 18С. Процент усиления ONC-392-опосредованной ADCC с помощью ONC-841.

[0030] На фиг. 19 показано влияние ONC-841 на антителонезависимое уничтожение лейкозных клеток МКПК (моноклеарные клетки периферической крови) человека. ONC-841 способствует уничтожению МКПК клеток Jurkat-CTLA-4 в отсутствие антитела, нацеленного на раковые клетки.

[0031] На фиг. 20 показана терапевтическая активность ONC-841 в солидных опухолях. Использовали клеточную линию B16F10, экспрессирующую EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) человека. Через 6 дней после заражения опухолевыми клетками мышей, несущих опухоль, обрабатывали контрольным IgG, ONC-841 или ONC-841 с цетуксимабом, и рост опухоли измеряли в слепом режиме. B16-EGFR, несущие опухоль (п/к), Siglec10TG<sup>+/+</sup>; Siglec<sup>-/-</sup> мышей (n равно 4-5), обрабатывали внутрибрюшинно (в/б) 200 мкг контрольного hIgGFc или ONC-841 и внутриопухолево (в/о) 10 мкг контрольного hIgGFc или цетуксимаба каждые три дня в течение четырех инъекций, начиная с 6 дня после инокуляции опухоли.

[0032] На фиг. 21А-В показан дозозависимый эффект ONC-841 при комбинированной терапии. Фиг. 21А. Кинетика роста опухоли. Фиг. 21В. Линейный регрессионный анализ для определения EC<sub>50</sub> с использованием данных из последней временной точки на фиг. 21А.

[0033] На фиг. 22 показана комбинация ONC-841 и антитела 9D9 к CTLA-4, вызывающая отторжение клеток меланомы B16F10. B16-F10, несущих опухоль C57BL/6 SIGLEC10TG<sup>+/+</sup>; мышей Siglec<sup>-/-</sup> (n равно 5-6) внутрибрюшинно обрабатывали 200 мкг 9D9 или/и 400 мкг ONC-841 на 8, 11, 14 и 17 день. Объемы опухолей измеряли каждые 3 дня. Показанные данные представляют собой средние значения и SEM (стандартная ошибка среднего).

[0034] На фиг. 23 показан колориметрический анализ ELISA для обнаружения связывания ONC-841 с His-меченным Siglec-10 / Siglec-G от разных видов.

[0035] На фиг. 24 показана оценка проточной цитометрией связывания ONC-841 с ортологами Siglec-10, экспрессируемыми на epr1293. Живые клетки окрашивали с использованием красителя Zombie, и оценивали связывание ONC-841 (более темные серые линии) и сравнивали с поликлональными антителами к Siglec-10 (более светлые серые линии).

В качестве отрицательного контроля использовали fluorescent-minus-one (FMO, серый). Числа в легендах каждой гистограммы показывают среднюю интенсивность флуоресценции для каждого образца.

[0036] На фиг. 25 показана оценка методом проточной цитометрии связывания ONC-841 с моноцитами и В-клетками человека и яванского макака. Живые клетки гейтировали с использованием красителя Zombie, и оценивали связывание ONC-841 (более темные серые линии) и сравнивали с fluorescent-minus-one (FMO, серый) в качестве отрицательного контроля. Чтобы проверить, является ли связывание специфичным, в некоторые пробирки добавляли избыток человеческого IgG (более светлые серые линии) перед окрашиванием. Числа в легендах каждой гистограммы показывают среднюю интенсивность флуоресценции для каждого образца.

[0037] На фиг. 26А-С показано связывание ONC-841 с трансгенными мышами Siglec10 и МКПК человека. Фиг. 26А. Слева: анализ крови мышей F1 от скрещивания трансгенных мышей Siglec10 человека с мышами с нокаутом SiglecG. Мыши экспрессируют как человеческий Siglec-10, так и Siglec G. Справа, анализ крови скрещивающихся мышей F1 и фенотип мышей, которые были отобраны для получения трансгенной колонии. Мышей F2 с окрашиванием только Siglec-10 человека отбирали для дальнейшего разведения. Кровь мыши окрашивали коммерчески доступными антителами. Фиг. 26В. Дополнительное окрашивание наборов крови мышей: NK-клеток, В-клеток, дендритных клеток (DC), нейтрофилов, моноцитов и Т-клеток. Окрашивание Siglec-10 показано на оси X, а для каждого подтипа клеток окрашивание не трансгенной мыши показано на левом графике, а окрашивание трансгенной мыши Siglec-10 человека показано на правом графике. Фиг. 26С. Типичное окрашивание МКПК человека. ONC-841 на оси Y (светло-серый), коммерчески доступное антитело 5G6 к Siglec-10 mAb на оси X (темно-серый), каждый график имеет смежную гистограмму, показывающую окрашивание каждого антитела в отдельности. Процент положительных клеток показан для В-клеток и моноцитов, которые были положительными для Siglec-10.

[0038] На фиг. 27 показано иммуногистохимическое окрашивание замороженных срезов из разных органов мышей Siglec10TG<sup>+/+</sup>; Siglecg<sup>-/-</sup>. В верхнем ряду показано положительное и отрицательное окрашивание экспрессирующих Siglec-10 (слева) и отрицательных по Siglec-10 (справа) клеточных гранул. Коричневый демонстрирует связывание ONC-841, синий представляет собой ядерное окрашивание (гематоксилин). Все сечения показаны в 20× увеличении.

[0039] На фиг. 28 показана схема стратегии ранжирования рака человека по его чувствительности к лечению антителами к CTLA-4. Авторы впервые идентифицировали компоненты, влияющие на терапевтический ответ антител к CTLA-4, на основе базы данных ответов CTLA-4, принимая во внимание недавно идентифицированный механизм действия антител к CTLA-4 и анализ, проведенный другой группой на полиморфизм FCGR3A и чувствительность к ипилимумабу. Типы рака человека ранжировали на основе медианного значения каждого компонента. Эти компоненты были взвешены поровну и сгруппированы в 5 категорий и ранжированы по каждой категории. Затем рейтинги пяти категорий были взвешены, чтобы получить окончательный рейтинг.

[0040] На фиг. 29 показано, что ONC-841 не индуцирует синдром высвобождения цитокинов (CRS). Показаны репрезентативные данные от одного из 4 доноров. Анализ проводили в двух повторностях.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0041] Иммунная система может распознавать и устранять раковые заболевания в экспериментальных модельных системах и у пациентов. В результате иммунотерапия рака становится одним из наиболее перспективных направлений терапии рака. Активная иммунотерапия рака включает агенты, которые усиливают естественные иммунные ответы путем блокирования иммунных контрольных точек или сигналов "не ешь меня" (включая антитела к PD-1, PD-L1, CTLA-4 и CD47).

[0042] В настоящем документе предложены антитела к Siglec-10, композиции, содержащие его, и его антигенсвязывающие фрагменты. Молекула антитела может представлять собой моноклональное антитело, антитело человека, химерное антитело или гуманизованное антитело. Антитело может быть моноспецифическим, биспецифическим, триспецифическим или мультиспецифическим. Связывающая Siglec-10 молекула может содержать антигенсвязывающий фрагмент антитела, которое иммуноспецифически связывается с Siglec-10, и, в частности, с человеческим Siglec-10, который, в частности, может быть экспрессирован на поверхности живой клетки в эндогенной или трансфицированной концентрации. Также предложены молекулы антител, антигенсвязывающий фрагмент которых связывается с Siglec-10. Антитело может быть мечено детектируемым образом или содержать конъюгированный токсин, лекарственное средство, рецептор, фермент или рецепторный лиганд.

[0043] Восприимчивость различных типов опухолей и пациентов варьируется, что означает, что различные ингибирующие пути могут иметь отношение к различным типам опухолей или различным популяциям. Таким образом, идентификация дополнительных сигналов "не ешь меня" может привести к разработке новых методов лечения, которые являются более эффективными для определенных типов опухолей или пациентов, либо отдельно, либо, возможно, в комбинации. Молекулы антител, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения рака путем введения антитела к Siglec-10, как описано в настоящем документе, отдельно или в комбинации с другими видами терапии.

[0044] Авторы изобретения обнаружили антитела к Siglec-10, которые демонстрируют неожиданно сильное связывание с Siglec-10, в частности, на поверхности клетки. Антитела также усиливают сильную активность ADCC путем ингибирования мощного сигнала "не ешь меня".

#### 1. Определения

[0045] Терминология, используемая в данном документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не является ограничивающей. При использовании в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают описание совокупности объектов, если в контексте явным образом не указано иное. Слово "около" в сочетании с числовым значением обозначает разумное приближение этого значения. В некоторых случаях "около" может быть истолковано как находящееся в пределах 10% от конкретного значения, с которым оно связано. Например, фраза "около 100" будет охватывать любое значение от 90 до 110.

[0046] Для перечисления числовых диапазонов в настоящем документе явно предусмотрено каждое промежуточное число между ними с одинаковой степенью точности. Например, для диапазона 6-9 числа 7 и 8 рассматриваются в дополнение к 6 и 9, а для диапазона 6,0-7,0 явно рассматриваются числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

[0047] "Лечение" или "обработка", когда речь идет о защите животного от заболевания, означает предотвращение, подавление, подавление или полное устранение заболевания. Предотвращение заболевания включает введение композиции согласно настоящему изобретению животному до начала заболевания. Подавление заболевания включает введение композиции согласно настоящему изобретению животному после индукции заболевания, но до его клинического проявления. Подавление заболевания включает введение композиции согласно настоящему изобретению животному после клинического проявления заболевания.

[0048] В данном контексте термин "антитело" предназначен для обозначения молекулы иммуноглобулина, которая обладает "вариабельной областью" распознавания сайта антигена. Термин "вариабельная область" предназначен для отличия такого домена иммуноглобулина от доменов, которые широко распространены среди антител (таких как Fc-домен антитела). Вариабельная область содержит "гипервариабельную область", остатки которой отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области" или "CDR" (то есть, как правило, приблизительно в остатках 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и приблизительно в остатках 27-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи) и/или эти остатки из "гипервариабельной петли" (то есть, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи). Остатки "каркасной области" или "FR" представляют собой остатки вариабельного домена, отличные от остатков гипервариабельной области, как определено в настоящем документе. Термин "антитело" включает моноклональные антитела, мультиспецифические антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, синтетические антитела, химерные антитела, верблюжьи антитела, одноцепочечные антитела, дисульфид-связанные Fv (sdFv), интратела и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id и анти-Id антитела к антителам, описанным в настоящем документе). В частности, такие антитела включают молекулы иммуноглобулина любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub>) или подкласса.

[0049] В данном контексте термин "антигенсвязывающий фрагмент" антитела относится к одной или более частям антитела, которые содержат CDR антитела и необязательно каркасные остатки, которые содержат сайт распознавания антигена "вариабельной области" антитела и демонстрируют способность иммуноспецифически связывать антиген. Такие фрагменты включают Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, одноцепочечный (ScFv) и его мутанты, природные варианты и слитые белки, содержащие сайт распознавания антигена "вариабельной области" антитела и гетерологичный белок (например, токсин, сайт распознавания антигена для другого антигена, фермент, рецептор или рецепторный лиганд и т. д.). В данном контексте термин "фрагмент" относится к пептиду или полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность из по меньшей мере 5 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 10 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 15 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 20 смежных

аминокислотных остатков, по меньшей мере 25 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 40 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 50 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 60 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 70 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 80 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 90 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 100 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 125 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 150 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 175 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 200 смежных аминокислотных остатков или по меньшей мере 250 смежных аминокислотных остатков.

[0050] Человеческие, химерные или гуманизированные антитела особенно предпочтительны для применения *in vivo* у людей, однако мышинные антитела или антитела других видов могут быть преимущественно использованы для многих применений (например, анализы обнаружения *in vitro* или *in situ*, применение в острый период *in vivo* и т. д.).

[0051] "Химерное антитело" представляет собой молекулу, в которой различные части антитела получены из различных молекул иммуноглобулина, таких как антитела, имеющие переменную область, полученную из нечеловеческого антитела и константной области иммуноглобулина человека. Химерные антитела, содержащие одну или более CDR из нечеловеческих видов и каркасных областей из молекулы иммуноглобулина человека, могут быть получены с использованием различных методик, известных в данной области техники, включая, например, CDR-трансплантацию (EP 239,400; Международная публикация № WO 91/09967; и патенте США № № 5225539, 5530101 и 5585089, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ), рекомбинацию поверхностных остатков или перекладку (EP 592106; EP 519596, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки) и перетасовку цепей (патент США № 5565332, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0052] В настоящем документе также рассматриваются "гуманизированные антитела". В данном контексте термин "гуманизированное антитело" относится к иммуноглобулину, содержащему каркасную область человека и одну или более CDR из нечеловеческого (обычно мышинового или крысиного) иммуноглобулина. Иммуноглобулин нечеловеческого происхождения, обеспечивающий CDR, называется "донором", а иммуноглобулин человека, обеспечивающий каркас, называется "акцептором". Константные области не обязательно должны присутствовать, но в случае, если они присутствуют, они должны быть по существу идентичны человеческим константным областям, то есть, идентичны им по меньшей мере

приблизительно на 85-90%, предпочтительно приблизительно на 95% или более. Следовательно, все части гуманизированного иммуноглобулина, за исключением, возможно, CDR, по существу идентичны соответствующим частям последовательностей природного человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело представляет собой антитело, содержащее гуманизированную легкую цепь и гуманизированный иммуноглобулин тяжелой цепи. Например, гуманизированное антитело не будет охватывать типичное химерное антитело, поскольку, например, вся переменная область химерного антитела является нечеловеческой. Донорское антитело можно назвать "гуманизированным" путем процесса "гуманизации", поскольку ожидается, что получаемое гуманизированное антитело связывается с тем же антигеном, что и донорское антитело, которое обеспечивает CDR. По большей части гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки гипервариабельной области реципиента заменены остатками гипервариабельной области нечеловеческого вида (донорское антитело), такого как мыши, крысы, кролики или нечеловеческие приматы, имеющие желаемую специфичность, аффинность и активность. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменяют соответствующими нечеловеческими остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаружены в реципиентном антителе или в донорском антителе. Эти модификации сделаны для дополнительного улучшения характеристик антител. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные области соответствуют таким участкам иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, и все или по существу все из FR областей соответствуют таким участкам последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека, который иммуноспецифически связывается с полипептидом Fc $\gamma$ RIIB, который был изменен путем введения замен, делеций или добавлений аминокислотных остатков (т.е. мутаций).

## 2. Композиции антител к Siglec-10

[0053] В данном изобретении предложено антитело к Siglec-10 или его антигенсвязывающий фрагмент. Следует понимать, что еще один признак антител, описанных в настоящем документе, также может быть включен в антигенсвязывающий фрагмент. Антитело к Siglec-10 может связываться с опухолеассоциированными макрофагами и может ингибировать связывание или передачу сигналов с CD24, экспрессируемым на раковых

клетках, тем самым ингибируя антифагоцитарный сигнал от раковых клеток. Антитело к Siglec-10 может представлять собой моноклональное антитело, одноцепочечное антитело, биспецифическое антитело, триспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело или химерное антитело.

[0054] Антитело к Siglec-10 может содержать одну или более последовательностей антитела 31F11, которое содержит переменные области тяжелой и легкой цепей, содержащие последовательности SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно. Антитело может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 2. Переменная область тяжелой цепи антитела к Siglec-10 может содержать одну или более из: CDR1, содержащей последовательность SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащей последовательность SEQ ID NO: 4, и CDR3, содержащей последовательность SEQ ID NO: 5. Переменная область легкой цепи антитела к Siglec-10 может содержать еще одну из: CDR1, содержащей последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащей последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащей последовательность SEQ ID NO: 8. В одном примере антитело представляет собой химерное антитело, содержащее переменные домены 31F11, присоединенные к Fc-домену человека.

[0055] В одном варианте осуществления переменная область тяжелой цепи содержит CDR1-3, имеющие SEQ ID NO: 3-5, соответственно. В другом варианте осуществления переменная область легкой цепи содержит CDR1-3, имеющие SEQ ID NO: 6-8, соответственно. В дополнительном примере антитело к Siglec-10 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 3-5, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 6-8.

[0056] Одна или более тяжелых и легких цепей антитела к Siglec-10 также могут быть гуманизированы по сравнению с 31F11. Антитело к Siglec-10 может содержать одну или более переменных областей тяжелой цепи, каждая из которых содержит последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 и 13 (называемых Hu-VHv1, VHv2, VHv3, VHv4 и VHv5, соответственно). Антитело к Siglec-10 может содержать одну или более переменных областей легкой цепи, каждая из которых содержит последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO: 14-18 (называемую Hu-VLv1, VLv2, VLv3, VLv4 и VLv5, соответственно).

[0057] Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей 31F11 представлены ниже.

[0058] Вариабельная область тяжелой цепи 31F11

[0059] QVTLKESGPGILQSSQTL~~SL~~TCSFSGFSLSTSGMGLSWIRQPSGKGLEWLAHIY  
WDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCVRGLYGNWFFDVWGAGT  
TVT~~V~~SS (SEQ ID NO: 1)

[0060] Вариабельная область легкой цепи 31F11

[0061] DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITYKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSA  
SNRYTGV~~PDR~~FTGSGSGTDFTLTISNMQSENLAN~~YFC~~QQYSSYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID  
NO: 2)

[0062] Последовательности гуманизированных вариабельных областей тяжелой цепи 31F11 представлены ниже (CDR подчеркнуты).

[0063] Hu-31F11-VHv1

[0064] QVTLKESGPalvkptQTLtLTCtFSGFSLSTSGMGLSWIRQPpGKaLEWLAHIYWD  
DDKRYNPSLKSRLTISKDTskNQVvLtmTnmDpvDTATYYCVRGLYGNWFFDVWGqGTTVT  
VSS (SEQ ID NO: 9)

[0065] Hu-31F11-VHv2

[0066] QVTLKESGPalvkptQTLtLTCtFSGFSLSTSGMGLSWIRQPpGKaLEWLAHIYWD  
DDKRYNPSLKSRLTISKDTskNQVvLtmTnmDpvDTATYYCVRGLYGNWFFDVWGAGTTVT  
VSS (SEQ ID NO: 10)

[0067] Hu-31F11-VHv3

[0068] QVTLKESGPalvkptQTLtLTCtFSGFSLSTSGMGLSWIRQPpGKaLEWLAHIYWD  
DDKRYNPSLKSRLTISKDTskNQVvLtmTnmDpvDTATYYCaRGLYGNWFFDVWGqGTTVTV  
SS (SEQ ID NO: 11)

[0069] Hu-31F11-VHv4

[0070] QVTLKESGPalvkptQTLtLTCtFSGFSLSTSGMGLSWIRQPpGKaLEWLAHIYWD  
DDKRYNPSLKSRLTISKDTskNQVvLtmTnmDpvDTATYYCaRGLYGNWFFDVWGAGTTVT  
VSS (SEQ ID NO: 12)

[0071] Hu-31F11-VHv5

[0072] QVTLKESGPalvkptQTLtLTCtFSGFSLSTSGMGLSWIRQPpGKaLEWLAHIYWD  
DDKRYNPSLKSRLTISKDTskNQVvLtmTnmDpvDTATYYCaRGLYGNWFFDVWGqGTIVTV  
SS (SEQ ID NO: 13)

[0073] Последовательности гуманизированных вариабельных областей легкой цепи 31F11 представлены ниже (CDR подчеркнуты).

[0074] Hu 31F11-VLv1

[0075] eIVMTQSpatlSvSpGeRatlscKASQNVGTAVAWYQQKPGQaPrLLIYSASNRYTG  
VPaRFsGSGSGTEFTLTISslQSEdfAvYyCQQYSSYPLTFGgGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)

[0076] Hu 31F11-VL<sub>v2</sub>

[0077] DIVMTQSpatlSvSpGeRatlscKASQNVGTAVAWYQQKPGQaPrLLIYSASNRYTG  
VPaRFsGSGSGTEFTLTISslQSEdfAvYFCQQYSSYPLTFGgGTKVEIK (SEQ ID NO: 15)

[0078] Hu 31F11-VL<sub>v2</sub> – полная легкая цепь

**DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVGTAVAWYQQKPGQAP**  
**RLLIYSASNRYTGVPARFSGSGSGTEFTLTISslQSEDFAVYFCQQ**  
**YSSYPLTFGGG**TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN  
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSK  
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 27)

[0079]

[0080] Hu 31F11-VL<sub>v2</sub> – полная легкая цепь плюс сигнальный пептид

**METDILLWVLLWVPGSTGDIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKAS**  
**QNVGTAVAWYQQKPGQAPRLLIYSASNRYTGVPARFSGSGSGTEF**  
**TLTISslQSEDFAVYFCQQYSSYPLTFGGG**TKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
DSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0081] (SEQ ID NO: 28)

[0082] Hu 31F11-VL<sub>v3</sub>

[0083] eIVMTQSpatlSvSpGeRatlsYKASQNVGTAVAWYQQKPGQaPrLLIYSASNRYTG  
VPaRFsGSGSGTEFTLTISslQSEdfAvYyCQQYSSYPLTFGgGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)

[0084] Hu 31F11-VL<sub>v3</sub> – полная легкая цепь

**EIVMTQSPATLSVSPGERATLSYKASQNVGTAVAWYQQKPGQAPRLLIYA**  
**SNRYTGVPARFSGSGSGTEFTLTISslQSEDFAVYYCQQYSSYPLTFGGG**TK  
**VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQ**  
**GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF**  
**NRGEC** (SEQ ID NO: 34)

[0085]

[0086] Hu 31F11-VL<sub>v3</sub> – полная легкая цепь плюс сигнальный пептид

**METDILLWVLLWVPGSTGEIVMTQSPATLSVSPGERATLSYKASQNV**  
**GTAVAWYQQKPGQAPRLLIYSASNRYTGVPARFSGSGSGTEFTLTISsl**  
**QSEDFAVYYCQQYSSYPLTFGGG**TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG  
TASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS  
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 35)

[0087]

[0088] Hu 31F11-VL<sub>v4</sub>

[0089] DIVMTQSpatlSvSpGeRatlsYKASQNVGTAVAWYQQKPGQaPrLLIYSASNRYT  
GVPaRFsGSGSGTEFTLTISslQSEdfAvYFCQQYSSYPLTFGgGTKVEIK (SEQ ID NO: 17)

[0090] Hu 31F11-VL<sub>v5</sub>

[0091] DIVMTQSpatlSvSpGeRatlTYKASQNVGTAVAWYQQKPGQaPrLLIYSASNRYT  
GVPaRFsGSGSGTEFTLTISslQSEdfAvYFCQQYSSYPLTFGgGTKVEIK (SEQ ID NO: 18)

[0092] В одном примере антитело к Siglec-10 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 9, или тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 25, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15, или легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 27. Антитело к Siglec-10 может содержать hu-VHv1VLv2.

[0093] В другом примере антитело к Siglec-10 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 10, или тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15, или легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 27. Антитело к Siglec-10 может содержать hu-VHv2VLv2.

[0094] В еще одном примере антитело к Siglec-10 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 10, или тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 16, или легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 34. Антитело к Siglec-10 может содержать hu-VHv2VLv3.

[0095] Антитело к Siglec-10 может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 9, 10 или 11; и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15, 27, 16 или 34.

[0096] В другом примере антитело к Siglec-10 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 17. Антитело к Siglec-10 может содержать hu-VHv2VLv4. В дополнительном примере антитело к Siglec-10 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 12, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 17. Антитело к Siglec-10 может содержать hu-VHv4VLv4. Антитело к Siglec-10 может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 10 или 12; и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 17.

[0097] В другом примере антитело к Siglec-10 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 12, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 16 или 34. Антитело к Siglec-10 может содержать hu-VHv4VLv3.

[0098] В другом примере антитело к Siglec-10 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15 или 17. В дополнительном примере антитело к Siglec-10 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 12, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 16, 34 или 17.

[0099] Антитело к Siglec-10 может содержать полипептид IgG человека. В одном примере IgG имеет последовательность SEQ ID NO: 19. Антитело к Siglec-10 может содержать полипептид IgG человека, который может представлять собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 или IgA2. В одном примере IgG представляет собой IgG4, который может иметь последовательность SEQ ID NO: 20. В другом примере IgG4 может содержать мутацию S228P, которая может иметь следующую последовательность.

[0100] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 24)

[0101] В другом примере антитело к Siglec-10 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 9, и IgG4, мутантный по S228P, содержащий последовательность SEQ ID NO: 24. Тяжелая цепь (VHv1) может содержать последовательность, указанную ниже.

[0102] QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGLSWIRQPPGKALEWLAHI  
YWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVL TMTNMDPVDTATYYCVRGLYGNWFFDVWG  
QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 25)

[0103] Тяжелая цепь (VHv1), имеющая последовательность SEQ ID NO: 25, может дополнительно содержать сигнальный пептид и может иметь последовательность, представленную ниже.

**MGWSCILFLVATATGVHSQVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLST**  
**SGMGLSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSK**  
**NQVVLMTNMDPVDIATYYCVRGLYGNWFFDVWGQGTTVTVSSAS**  
 TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT  
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY  
 GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV  
 QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
 CKVSNKGLPSSIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG  
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 26)

[0104]

[0105] Тяжелая цепь (VHv2) может содержать следующую последовательность:

**QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGLSWIRQPPGKALEWL**  
**AHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDIATYYCVR**  
**GLYGNWFFDVWGAGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK**  
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTC  
 NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT  
 EVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT  
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT  
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV  
 DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 32)

[0106]

[0107] Тяжелая цепь (VHv2) может также содержать следующую последовательность:

**MGWSCILFLVATATGVHSQVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTS**  
**GMGLSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSKNQV**  
**VLMTNMDPVDIATYYCVRGLYGNWFFDVWGAGTTTVTVSSASTKGPS**  
 VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA  
 PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG  
 VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI  
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
 GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN  
 NYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 33)

[0108]

[0109] Антитело к Siglec-10 может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 9 или 25, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15 или 27 (VHv1VLv2). В одном примере антитело к Siglec-10 может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 27. Антитело к Siglec-10 может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 10 или 32, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15 или 27 (VHv2VLv2). В одном примере антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 27. Антитело к Siglec-10 может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 10 или 32, и легкую цепь, содержащую

последовательность SEQ ID NO: 16 или 34 (VHv2VLv3). В одном примере антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 34.

### 3. Композиции биспецифических антител

[0110] В настоящем документе также предложено биспецифическое антитело, содержащее антитело, которое связывается с Siglec-10, соединенное мостиком с антителом, которое связывается с другими иммуностимулирующими молекулами, молекулами, нацеленными на иммунные клетки, или молекулами, нацеленными на рак. В конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит антитело к Siglec-10 или его антигенсвязывающий фрагмент и нацеленное на рак антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Такая молекула была бы обогащена в микроокружении опухоли. Антитело, нацеленное на рак, может включать специфический Т-антиген, TN-антиген, дифференциально гликозилированный муцин, CD24, her-2 или PMSA (простат-специфический мембранный антиген).

[0111] В другом варианте реализации биспецифическое антитело к Siglec-10 может содержать второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое нацелено на комплементарный противоопухолевый путь или механизм. В одном варианте реализации изобретения композиции антител к Siglec-10, описанные в настоящем документе, могут быть объединены с антителом для иммунотерапии рака, которое усиливает естественные иммунные ответы. Примеры таких антител для иммунотерапии рака включают антитела к PD-1, CTLA-4, PD-L1, B7-H3, B7-H4, LIGHT, LAG3, TIM3, TIM4, CD40, OX40, GITR, BTLA, CD27, CD47, ICOS или 4-1BB. Такие антитела можно применять для лечения рака.

[0112] В данной области техники известно много различных технологий биспецифических антител. Большинство из них требуют, чтобы двухкомпонентные антитела находились в одноцепочечном формате, так что две части могут быть экспрессированы в одной конструкции. Предпочтительным способом является экспрессия антител в виде одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv). Неограничивающие примеры технологий биспецифических антител включают BiTE (для привлекающего Т-клетки биспецифического активатора), DART (для переориентирующегося антитела с двойной аффинностью), иммуноглобулин в тандеме с Fab (FIT-Ig) и выступы-во-впадины.

#### [0113] Способы лечения

[0114] В настоящем документе предложены применения композиций антител, раскрытых в настоящем документе, и их фармацевтических композиций для лечения рака. В

данном контексте термин "рак" относится к новообразованию или опухоли, возникающей в результате аномального неконтролируемого роста клеток. В данном контексте рак явно включает лейкемию и лимфомы. Термин относится к заболеванию, включающему клетки, которые могут метастазировать в отдаленные участки.

[0115] В данном изобретении предложен способ лечения рака или аномального пролиферативного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, который может включать введение указанной композиции антитела субъекту. Субъект может представлять собой млекопитающее, такое как собака, кошка, свинья, лошадь, корова, обезьяна, обезьяна или человек. В одном примере субъект представляет собой пациента-человека. Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая композицию антитела, для применения при лечении рака или аномального пролиферативного заболевания. Дополнительно предложено применение композиции антитела при изготовлении лекарственного средства для лечения рака или аномального пролиферативного заболевания. В одном примере композицию антитела применяют в качестве монотерапии, которая может способствовать фагоцитозу раковых клеток одним или более макрофагами, ADCC и антителозависимым клеточным фагоцитозом (ADCP).

[0116] Рак может представлять собой одну или более из следующих (но не ограничиваясь ими): карцинома, включая карциному мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, почки, печени, легкого, яичника, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы и кожи; включая плоскоклеточный рак; гемопозитические опухоли лимфоидного происхождения, включая лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, лимфому Беркетса; гемопозитические опухоли миелоидного происхождения, включая острый и хронический миелогенный лейкоз и промиелоцитарный лейкоз; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; другие опухоли, включая меланому, семиному, тетратокарциному, нейробластому и глиому; опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, нейробластому, глиому и шванному; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая меланому, пигментную ксенодерму, кератоактантому, семиному, фолликулярный рак щитовидной железы и тератокарциному. В частности, рак может представлять собой рак молочной железы, тройной негативный рак молочной железы, рак яичников или лейкоз, описанный в настоящем документе. Рак может включать инфильтрирующие клетки, которые связываются с антителом к Siglec-10.

[0117] Рак может представлять собой распространенную солидную опухоль. Распространенная солидная опухоль может прогрессировать после стандартной системной терапии. Рак может представлять собой аденокарциному легкого (LUAD), кожную меланому-метастаз (SKCM-TM), плоскоклеточную карциному легкого (LUSC), инвазивную карциному молочной железы-базальную карциному, инвазивную карциному молочной железы-Her2, аденокарциному поджелудочной железы, плоскоклеточную карциному головы и шеи, почечную светлоклеточную карциному, аденокарциному желудка, мультиформную глиобластому, инвазивную карциному молочной железы-LumB или инвазивную карциному молочной железы-LumA, немелкоклеточный рак легкого, глиобластому, меланому, глиому низкой степени злокачественности, рак почки, базальный тип рака молочной железы, Her2+ рак молочной железы, рак поджелудочной железы или рак яичников. В одном примере рак представляет собой LUAD, SKCM-TM или LUSC. В частности, рак может представлять собой немелкоклеточную аденокарциному легкого. Рак также может представлять собой гематологическое злокачественное новообразование, которое может представлять собой лейкемию, синдром миелоидной дисплазии, В-клеточную лимфому или множественную миелому.

[0118] Рак может быть вызван абберациями при апоптозе, а также может лечиться способами и композициями, описанными в настоящем документе. Рак может представлять собой одну или более из (но не ограничиваясь ими): фолликулярной лимфомы, карциномы с мутациями p53, гормонозависимой опухоли молочной железы, предстательной железы или яичника и предракового поражения, такого как семейный аденоматозный полипоз или миелодиспластический синдром. В конкретных вариантах осуществления злокачественные новообразования или диспролиферативные изменения (такие как метаплазии и дисплазии) или гиперпролиферативные расстройства лечат или предотвращают с помощью способов и композиций по настоящему изобретению в яичнике, мочевом пузыре, молочной железе, толстой кишке, легком, коже, поджелудочной железе или матке. В других конкретных вариантах реализации изобретения одну или более из саркомы, меланомы и лейкоза лечат или предотвращают с помощью способов и композиций, описанных в настоящем документе.

[0119] В другом варианте реализации изобретения композицию антитела применяют в комбинации с одной или более другими противоопухолевыми терапиями, включая, но не ограничиваясь ими, текущую стандартную и экспериментальную химиотерапию, гормональную терапию, биологическую терапию, иммунотерапию, лучевую терапию или хирургическое вмешательство. В некоторых вариантах осуществления композицию антитела

вводят в комбинации с терапевтически или профилактически эффективным количеством одного или более агентов, терапевтических антител или других агентов, известных специалистам в данной области техники, для лечения и/или предотвращения рака, аутоиммунного заболевания, инфекционного заболевания или интоксикации. Такие агенты включают, например, любой из описанных выше модификаторов биологического ответа, цитотоксины, антиметаболиты, алкилирующие агенты, антибиотики или антимиотические агенты, а также иммунотерапевтические средства.

[0120] В предпочтительном варианте осуществления изобретения композицию антитела применяют с одной или более противоопухолевыми иммуноterapiaми. Противоопухолевая иммунотерапия может представлять собой молекулу, которая разрушает или усиливает один или более альтернативных иммуномодулирующих путей (таких как TIM3, TIM4, OX40, CD40, GITR, 4-1-BB, PD-L1, PD-1, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, LIGHT, VTLA, ICOS, CD27, CD47, TIGIT или LAG3) или модулирует активность молекул-эффекторов, таких как цитокины (например, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, GF-бета, IFNg, Flt3, BLys) и хемокины (например, CCL21), для усиления иммуномодулирующих эффектов. В еще одном варианте осуществления композицию антитела вводят в комбинации с одной или более молекулами, которые активируют различные стадии или аспекты иммунного ответа, для достижения более широкого иммунного ответа. В более предпочтительном варианте осуществления композицию антитела комбинируют с антителами к PD-1 или к 4-1BB, без усугубления аутоиммунных побочных эффектов.

[0121] Композиция антитела может быть использована с антителом, нацеленным на опухоль. Антитело, нацеленное на опухоль, может быть любым, которое вызывает один или более из ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность) или ADCP (антителозависимый клеточный фагоцитоз). Антитело, нацеленное на опухоль, может представлять собой цетуксимаб (эрбитукс), ритуксимаб (ритуксан), трастузумаб (герпещин) или даратумумаб (дарзалекс). Композиция антитела также может быть использована с иммунотерапевтическим средством, нацеленным на клетки-хозяева, которое может представлять собой антитело к CTLA-4. Антитела к CTLA-4 известны в данной области техники. Антитело к CTLA-4 может быть раскрыто в патенте США № 10618960, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном примере антитело к CTLA-4 имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 22. Легкая цепь антитела к CTLA-4 может дополнительно содержать константную область, содержащую SEQ ID NO: 29,

и тяжелая цепь может дополнительно содержать константную область, содержащую SEQ ID NO: 30 или 31. В другом примере антитело к CTLA-4 имеет тяжелую цепь, содержащую переменную область, содержащую SEQ ID NO: 21, и константную область, содержащую SEQ ID NO: 31; и легкую цепь, содержащую переменную область, содержащую SEQ ID NO: 22, и константную область, содержащую SEQ ID NO: 29.

[0122] Получение

[0123] Антитела к Siglec-10, описанные в настоящем документе, могут быть получены с использованием эукариотической системы экспрессии. Система экспрессии может включать экспрессию из вектора в клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомяка (CHO). Система также может представлять собой вирусный вектор, такой как дефектный по репликации ретровирусный вектор, который может быть использован для инфицирования эукариотических клеток. Антитела также могут быть получены из стабильной клеточной линии, которая экспрессирует антитело из вектора или части вектора, интегрированного в клеточный геном. Стабильная клеточная линия может экспрессировать антитело из интегрированного репликационно-дефектного ретровирусного вектора.

[0124] Антитело к Siglec-10, описанное в настоящем документе, или его антигенсвязывающий фрагмент можно очистить, используя, например, хроматографические способы, такие как аффинная хроматография, ионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, ионообмен DEAE (диэтиламиноэтил), гель-фильтрация и хроматография с гидроксилпатитом. В некоторых вариантах осуществления слитые белки могут быть сконструированы таким образом, чтобы содержать дополнительный домен, содержащий аминокислотную последовательность, которая позволяет захватывать полипептиды в аффинную матрицу. Например, антитела, описанные в настоящем документе, содержащие Fc-область домена иммуноглобулина, могут быть выделены из супернатанта клеточной культуры или цитоплазматического экстракта с использованием колонки с белком А. Кроме того, для содействия очистке полипептидов можно использовать метку, такую как с-тус, гемагглютинин, полигистидин или Flag™ (Kodak). Такие метки могут быть вставлены в любом месте полипептида, в том числе на карбоксильном или аминоконце. Другие встраивания, которые могут быть полезны, включают ферменты, которые помогают в обнаружении полипептида, такие как щелочная фосфатаза. Иммуноаффинная хроматография также может быть использована для очистки полипептидов.

[0125] Фармацевтические композиции

[0126] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество одного или более антител и композиций к Siglec-10, описанных в настоящем документе, и физиологически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Фармацевтическая композиция может содержать профилактически или терапевтически эффективное количество антитела к Siglec-10 и фармацевтически приемлемый носитель

[0127] В конкретном варианте осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у людей. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту (например, адьюванту Фрейнда (полному и неполному), вспомогательному веществу или носителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Вода является предпочтительным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Физиологические растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и тому подобное. Композиция, при необходимости, также может содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или pH-буферных агентов. Эти композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и тому подобного.

[0128] Обычно ингредиенты фармацевтической композиции поставляются либо по отдельности, либо в виде смеси в составе стандартной лекарственной формы, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Если композицию вводят путем инфузии, она может быть помещена, например, в инфузионную бутылку, содержащую стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. Если композицию вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула

со стерильной водой для инъекций или с физиологическим раствором, так что ингредиенты могут быть смешаны перед введением.

[0129] Фармацевтическая композиция может быть составлена в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничены ими, соли, образованные с анионами, такими как соли, полученные с соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислотой и т. д., и соли, образованные с катионами, такими как соли, полученные с натрием, калием, аммонием, кальцием, гидроксидами железа (III), изопропиламином, триэтиламином, 2-этиламиноэтанолом, гистидином, прокаином и т. д.

[0130] Фармацевтическая композиция может содержать один или более или все из гистидинового буфера, сахарозы и полисорбата 80 (PS80). В одном примере фармацевтическая композиция содержит около 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 мМ гистидинового буфера. В частности, концентрация гистидинового буфера может составлять 20 мМ. Фармацевтическая композиция может содержать около 6, 7, 8, 9 или 10% мас./об. сахарозы. В одном примере фармацевтическая композиция содержит 8% сахарозы. Фармацевтическая композиция может содержать около 0,01, 0,02 или 0,03% PS80. В одном примере концентрация PS80 составляет 0,02%. В одном примере фармацевтическая композиция содержит 20 мМ гистидинового буфера, 8% сахарозы и 0,02% мас./об. PS80. Фармацевтическая композиция может иметь pH около 5, 5,5 или 6,0. В одном примере pH составляет 5,5. Фармацевтическую композицию можно разбавлять 0,9% раствором хлорида натрия или 5% раствором декстрозы перед введением субъекту.

[0131] Антитело к Siglec-10, которое может представлять собой ONC-841, может присутствовать в фармацевтической композиции в концентрации около 10, 15, 20, 25 или 30 мг/мл. Антитело к Siglec-10 можно вводить в дозе около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 мг/кг. Доза может составлять менее 10 мг/кг. В одном примере доза составляет 3-9 мг/кг. В другом примере доза составляет 3 мг/кг. Последующая доза может быть скорректирована в сторону уменьшения по сравнению с предыдущей дозой, если субъект страдает от нежелательных явлений, связанных с введением композиции антитела. Последующая доза может быть скорректирована в сторону повышения по сравнению с предыдущей дозой, если композиция антитела не оказывает достаточно сильного эффекта против злокачественного новообразования.

[0132] Способы введения

[0133] Способы введения композиций антитела к Siglec-10 и их фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими,

парентеральное введение (например, внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и слизистое введение (например, интраназальным и пероральным путями). В конкретном варианте осуществления данного изобретения антитела по данному изобретению вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композиции могут быть введены любым удобным способом, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.) и могут быть введены вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным.

#### ПРИМЕРЫ

[0134] Раскрытие изобретения имеет множество аспектов, проиллюстрированных следующими неограничивающими примерами.

##### Пример 1

##### Получение моноклональных антител к Siglec-10

[0135] Для получения антагониста мышей иммунизировали мышными линиями клеток, трансфицированных Siglec-10, после трех иммунизаций собирали клетки селезенки для получения гибридомы. Гибридомные супернатанты подвергали скринингу на предмет их активности в отношении ингибирующего эффекта Siglec-10 в ADCC, который измеряли с использованием эффекторных клеток, экспрессирующих FcR3a человека. Было обнаружено, что из более чем 20000 клонов один (31F11) наиболее эффективен в отношении ингибирования Siglec-10 (фиг. 1). По сравнению с другими антителами к Siglec-10 (10H3 и 5G6), 31F11 сильнее антагонизирует действие Siglec-10.

[0136] Для подтверждения специфичности 31F11 авторы покрыли планшеты слитыми белками, состоящими из внеклеточных доменов Siglecs 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10 и 11, и протестировали связывание 31F11 с этими Siglecs. Как показано на фиг. 2, только Siglec-10 продемонстрировал заметное связывание с 31F11. В качестве альтернативного подхода авторы трансфицировали клеточную линию 293T GFP-мечеными Siglec 2, 3, 5, 9, 10, 12 и 15. Как показано на фиг. 3, 31F11 специфически связывается с клетками, экспрессирующими Siglec-10, но не другие протестированные Siglec. Взятые вместе, данные на фиг. 2 и 3 демонстрируют, что 31F11 связывается с Siglec-10, но не с Siglec 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 12 и 15.

##### Пример 2

Антитела к Siglec-10 блокируют связывание Siglec-10-Fc со спленоцитами

[0137] Чтобы подтвердить, блокирует ли 31F11 связывание Siglec-10 с его лигандами, авторы исследовали влияние 31F11 на связывание Siglec-10-Fc с клетками селезенки мыши. Как показано на фиг. 4, 31F11 более эффективно, чем другие антитела к Siglec-10 (5G6 и 10H3), блокирует связывание Siglec-10-Fc с клетками селезенки.

Пример 3

Анализ фагоцитоза антител к Siglec-10

[0138] Чтобы проверить, способствует ли антитело к Siglec-10 фагоцитозу раковых клеток макрофагами, моноциты человека, выделенные из периферической крови, стимулировали средой RPMI-1640 с добавлением 40 нг/мл M-CSF в течение 5-7 дней. Затем макрофаги M2 индуцировали 50 нг/мл TGF $\beta$ 1 и IL10 в течение 24 часов. Клетки MCF-7 метили красителем CellTracker™ Violet BMOQ и совместно культивировали с макрофагами донорского происхождения в присутствии антител к Siglec-10 указанной концентрации в течение 2 часов. Процент макрофагов, подвергающихся фагоцитозу, определяли с помощью проточной цитометрии. Как показано на фиг. 5, 31F11 более чем удвоил фагоцитоз, в то время как другие антитела к Siglec-10 не оказывают заметного эффекта. Таким образом, 31F11 является уникальным фактором, способствующим фагоцитозу.

Пример 4

Противоопухолевая активность в сочетании с антителами к hCD24

[0139] Поскольку 31F11 способствует ADCC *in vitro*, авторы предположили, что антитело может способствовать отторжению опухоли при использовании в комбинации с антителом, нацеленным на опухолевые клетки. Чтобы проверить эту гипотезу,  $1 \times 10^6$  клеток MC38-hCD24 инокулировали химерным мышам S10 BM (n равно 4-5). Мышей обрабатывали 100 мкг hIgFc,  $\alpha$ -hCD24, 31F11 ( $\alpha$ S10) или  $\alpha$ -hCD24 плюс 31F11 на 7, 10, 13 и 16 день. Как показано на фиг. 6, комбинация антител к CD24 и 31F11, но не по-отдельности, индуцировала отторжение опухоли у всех мышей-реципиентов. Эти данные подтверждают применение антител к Siglec-10 для отторжения опухоли.

Пример 5

Гуманизация 31F11 для терапии рака

[0140] Путем blast-анализа базы данных Ig человека последовательность V-области зародышевой линии человекаIGHV2-70\*04 и последовательность JH6 области были использованы в качестве человеческого каркасного акцептора для областей CDR VH 31F11. Последовательность V-области зародышевой линии человека IGKV3-15\*01 и J-области JK4

применяли в качестве человеческого каркасного акцептора для CDR-областей 31F11 VL. Были разработаны 5 версий huVH (VHv1, VHv2, VHv3, VHv4 и VHv5, имеющие SEQ ID NO: 9-13) и 5 версий huVL (VLv1, VLv2, VLv3, VLv4 и VLv5, имеющие SEQ ID NO: 14-18).

[0141] Чтобы выбрать наилучшую рабочую комбинацию (комбинации) HuVH и HuVL для связывания Siglec-10, ДНК, кодирующую тяжелую и легкую цепи, синтезировали в экспрессионных конструкциях, и различные комбинации совместно трансфицировали в 293 клетки, 7 гуманизированных антител и химерное исходное антитело сравнивали на предмет их связывания с клетками Jurkat, экспрессирующими человеческий Siglec-10. Свойства клонов приведены в таблице 2.

Таблица 2. Характеристика гуманизированных клонов 31F11

	Выход (мг/мл )	Rk	Tm 1	Tm 2		ADCC EC50 (нг/мл)	Rk	Связыван ие EC50 (нг/мл)	Rk	ka (1/мс)	Rk	kd (1/с)	Rk	KD (M)	Rk
Химерное	12,64		65, 8	н\д		94,44		210,8		3,13E+ 05		5,02E-04		1,61E- 09	
21#	9,98	2	63, 7	78, 5	7	153,3	1	242,4	4	2,72E+ 05	2	5,89E-04	5	2,17E- 09*	4
22#	14,83	1	63, 8	78, 5	6	265,7	5	237,1	2	1,64E+ 05	3	2,02E+04	2	1,23E- 09	2
23#	9,73	3	64, 0	80, 6	5	342,4	7	237,3	3	1,31E+ 05	4	1,97E-04	1	1,50E- 09	3
32#	6,62	5	66, 9	н\д	2	182,6	3	422,7	7						
34#	2,99	7	64, 4	71, 7	4	273	6	365,3	6						
52#	5,56	6	66, 6	н\д	3	157,2	2	228	1	4,41E+ 05	1	3,70E-04	4	8,40E- 10	1
54#	7,72	4	69, 1	н\д	1	261,8	4	322,7	5	9,87E+ 04	5	2,15E-04	3	2,18E- 09	5

Каждый столбец "Rk" обозначает относительное ранжирование каждого параметра в предыдущем столбце.

ka - константа скорости ассоциации

kd - константа скорости диссоциации

\* В этом измерении использовались данные из отдельного эксперимента, поэтому относительное ранжирование менее надежно.

[0142] Комбинации антител являются следующими: #21 (SEQ ID NO: 9 и 15), #22 (SEQ ID NO: 10 и 15), #23 (SEQ ID NO: 11 и 15), #32 (SEQ ID NO: 10 и 17), #34 (SEQ ID NO: 12 и 17), #52 (SEQ ID NO: 10 и 16) и #54 (SEQ ID NO: 12 и 16). Среди них исходное антитело имело

EC<sub>50</sub> 210 нг/мл, в то время как гуманизированные антитела имели EC<sub>50</sub> от 228 нг/мл до 423 нг/мл (фиг. 7). Это говорит о том, что все антитела продемонстрировали сильное связывание с клеточной поверхностью Siglec-10. Анализ термической стабильности показал, что все гуманизированные антитела демонстрируют хорошую термическую стабильность (фиг. 8). С помощью анализа Biacore измеряли аффинность 5 антител с самым высоким рангом. Как показано в таблице 2, все 5 протестированных антител демонстрируют высокоаффинное связывание с Siglec-10. В частности, три из пяти антител (#22, #23 и #52) имели более высокую аффинность, чем химерный родительский клон.

[0143] Для проверки биологической функции авторы сравнивали 7 моноклональных антител с исходными химерными антителами на предмет их способности восстанавливать активность ADCC. Как показано на фиг. 9, среди всех протестированных клонов была обнаружена сильная ADCC.

#### Пример 6

#### Доклинические исследования антител к Siglec-10

[0144] Доклинические исследования показывают, что терапевтическая эффективность моноклональных антител к CTLA-4 обусловлена истощением внутриопухолевых Treg, в то время как их токсичность обусловлена снижением уровня CTLA-4. Представляет интерес сочетание антитела к CTLA-4 с лекарственным средством, которое может повышать ADCC антитела к CTLA-4. Siglec-10 стал перспективной мишенью, поскольку мы продемонстрировали, что Siglec-10 является отрицательным регулятором ADCC, включая ADCC, вызванную антителом к CTLA-4 (фиг. 10). mAb к Siglec-10, 31F11, было разработано на основе его способности усиливать ADCC (фиг. 11) и фагоцитоз раковых клеток (фиг. 12). Гуманизированная версия антитела разработана таким образом для лечения рака человека под названием ONC-841.

[0145] Взятые вместе, антагонист Siglec-10 может способствовать противоопухолевому иммунитету двумя различными механизмами. Во-первых, он может инактивировать DNEMS для стимулирования фагоцитоза опухолевых клеток. Во-вторых, путем инактивации отрицательного регулятора ADCC, антагонист может усиливать терапевтическую активность терапевтических антител на основе ADCC.

#### Механизм действия

[0146] Накопленные данные установили, что Siglec-10 является отрицательным регулятором фагоцитоза, ADCC и ADCP. Таким образом, ONC-841 может способствовать отторжению опухоли как в виде монотерапии, так и в виде комбинированной терапии.

### Монотерапия

[0147] В качестве монотерапии ONC-841 способствует отторжению опухоли путем блокирования взаимодействия Siglec-10-CD24 DNEMS, как показано на фиг. 13. Этот механизм должен быть наиболее активным для рака, который сверхэкспрессирует CD24 или другие высокоаффинные лиганды Siglec-10. В настоящее время ясно, что почти 70% всех случаев рака человека сопровождается сверхэкспрессией CD24, и его экспрессия соответствует неблагоприятному прогнозу. Кроме того, Siglec-10 также экспрессируется на высоких уровнях в опухолеассоциированных макрофагах (TAM). Предполагается, что ONC-841 может оказывать широкое влияние на врожденный иммунитет против большинства типов рака, включая немелкоклеточный рак легкого.

### Комбинированная терапия

[0148] Поскольку Siglec-10 отрицательно регулирует ADCC и ADCP, ONC-841 работает синергетически с лекарственными средствами, которые достигают противоопухолевой активности ADCC и ADCP. Такие лекарственные средства могут быть нацелены на раковые клетки (например, эрбитукс, ритуксимаб) или на клетки-хозяева (например, антитела к CTLA-4). Siglec-10 отрицательно регулирует ADCC/ADCP, и, хотя CD24 способен к отрицательной сигнализации Siglec-10 с ингибированием ADCC/ADCP, данные демонстрируют, что Siglec-10 может распознавать лиганды, отличные от CD24. Следовательно, ONC-841 можно применять для усиления истощения клеток-хозяев или раковых клеток для типов опухолей, независимо от экспрессии CD24. На Фиг. 13 проиллюстрирован механизм, с помощью которого ONC-841 может использоваться в комбинации с антителом к CTLA-4, таким как ONC-392, для стимулирования истощения Treg в TME, а именно путем блокирования отрицательной сигнализации Siglec-10.

### Пример 7

#### Фармакология и токсикология антител к Siglec-10

#### Фармакология *in vitro*

#### Специфичность ONC-841

[0149] Чтобы подтвердить специфичность связывания ONC-841, авторы протестировали его связывание с другими рекомбинантными белками Siglec человека с помощью ELISA. Различные рекомбинантные белки внеклеточного домена Siglec с His или Fc-меткой наносили на планшеты для ELISA. Добавляли биотинилированный ONC-841 для обнаружения связывания с покрытым белком Siglec. Авидин-HRP использовали в качестве вторичного антитела для обнаружения. Как показано на фиг. 14А и В, ONC-841 сильно

связывается с Siglec 10 с Kd около 0,02247 мкг/мл, но не со всеми другими протестированными Siglec, включая Siglec 1-9, 11, 14 и 15. ONC-841 продемонстрировал некоторое связывание с Siglec-5Fc, Siglec-6Fc, Siglec-11Fc и Siglec-14Fc в высокой концентрации. Чтобы выяснить, было ли специфичным связывание с рекомбинантными белками Siglec или неспецифическим связыванием с Fc, авторы включили Fc IgG1 человека (hIgG1Fc) в качестве контроля. Результат показал, что связывание ONC-841 с Siglec-5Fc, Siglec-6Fc, Siglec-11Fc и Siglec-14Fc обусловлено неспецифическим связыванием с Fc-меткой, поскольку связывание сопоставимо с hIgG1Fc. (Фиг. 14B).

ONC-841 блокирует взаимодействие Siglec-10 с его лигандом на злокачественных клетках Jurkat человека и *in vitro* дифференцированных регуляторных Т-клетках

[0150] Белки Siglec распознают сиалирированные белки на поверхности клеток, при этом предпочтение отдается  $\alpha$ 2,6-сиалилированию, а не  $\alpha$ 2,3-сиалилированию. Чтобы проверить, блокирует ли ONC-841 взаимодействие Siglec-10 с его природным лигандом на злокачественных клетках, авторы исследовали способность ONC-841 блокировать связывание Siglec-10Fc с клеточной линией лейкоза Jurkat человека. Siglec-10Fc-биотин предварительно объединяли со стрептавидином-PE (SA-PE) в молярном соотношении 4:1 в течение 1 часа, а затем добавляли к различным концентрациям ONC-841 в течение 5 минут. Смесь добавляли к клеткам Jurkat-CTLA4 в концентрации 10 мкг/мл на основе концентраций Siglec-10Fc-биотин в течение часа инкубации при комнатной температуре. Клетки тщательно промывали для удаления избытка несвязанных реагентов и получали с помощью проточного цитометра. Анализ проводили после исключения мертвых клеток. Как показано на фиг. 15, Siglec-10Fc сильно связывается с клеточной линией Jurkat, и это связывание блокируется ONC-841 дозозависимым образом. IC50 оценивали в 2 мкг/мл (13,3 нМ).

[0151] Чтобы проверить влияние ONC-841 на связывание Siglec-10Fc-биотина с нормальными клетками-хозяевами, авторы использовали флуоресцентные тетрамеры Siglec-10Fc и оценивали влияние ONC-841 с использованием того же метода, упомянутого выше. Мы сосредоточились на Treg, чтобы поддержать предлагаемую нами комбинированную терапию. Treg дифференцировали из наивных CD4 Т-клеток, выделенных из свежих МКПК. Как показано на фиг. 16, Siglec-10Fc демонстрирует четкое связывание с *in vitro* дифференцированным человеческим Treg. Взаимодействие Siglec-10Fc с Treg блокировали дозозависимым образом с помощью ONC-841. IC50 оценивали при 3,57 мкг/мл (23,8 нМ).

ONC-841 способствует репортерной активности ADCC обоих антител, нацеленных на рак

[0152] ONC-841 тестировали на его способность стимулировать ADCC-активность антител, нацеленных на рак, включая антитела, нацеленные на CD20, CTLA-4 и рецептор эпидермального фактора роста (EGFR). Используя репортерный анализ ADCC Promega, авторы измерили активность ADCC путем обнаружения люминесценции, экспрессируемой NFAT, в эффекторных клетках при активации FcγR3A в присутствии антител, нацеленных на рак. Вкратце, клетки-мишени совместно инкубировали с эффекторными клетками ADCC, имитирующими переносимые эффекторные клетки ADCC (ADCC-Mock) или клетками ADCC, экспрессирующими человеческий Siglec-10 (ADCC-hSiglec10). Антитела, нацеленные на опухоль, добавляли в фиксированной концентрации с титрованием mAb ONC-841. Измеряли относительные единицы люминесценции (RLU). Как показано на фиг. 17A, ONC-841 способствовал активности ADCC против клеточной линии лимфомы Раджи с помощью антитела к CD20 со значением EC50, составляющим 0,5 мкг/мл. Чтобы проверить влияние ONC-841 на солидные опухоли, авторы использовали линию клеток меланомы B16, экспрессирующую EGFR человека, и использовали препарат против EGFR, цетуксимаб, для запуска ADCC. Как показано на фиг. 17B, ONC-892 почти удвоил активность ADCC цетуксимаба со значением EC50, равным 0,3 мкг/мл. Чтобы поддержать наш дизайн исследования комбинированной терапии, мы проверили эффективность ONC-841 в стимулировании ADCC с помощью ONC-392. Как показано на фиг. 17C, ONC-841 усиливал ADCC-активность ONC-392 со значением IC50, составляющим 0,08 мкг/мл. Тот факт, что EC50 является самым низким для комбинации с ONC-392, подтверждает наш выбор ONC-392 в качестве партнера по комбинации в ранних клинических испытаниях, и широкая активность предполагает возможность использования ONC-841 для комбинированной терапии с антителами, нацеленными на рак, как при гематологических злокачественных новообразованиях, так и при солидных опухолях.

ONC-841 способствует ADCC и антителонезависимому уничтожению лейкозных клеток NK-клетками человека

[0153] Чтобы проверить влияние ONC-841 на уничтожение опухолевых клеток NK-клетками, авторы использовали CTLA-4-трансфицированные клетки Jurkat в качестве клеток-мишеней и свежeweделенные NK-клетки человека в качестве эффекторных клеток. Вкратце, клетки-мишени Jurkat-CTLA-4, меченные кальцеином AM, совместно инкубировали с отрицательно отобранными NK-клетками человека из свежей цельной крови с ONC-392 или

без него в фиксированной концентрации с титрованием mAb ONC-841 в течение 6 часов. После инкубации клетки анализировали с помощью проточной цитометрии. Процент гибели клеток рассчитывали на основе количества оставшихся кальцеин AM<sup>+</sup> живых клеток по сравнению с контролем. Как показано на фиг. 18А-С, ONC-841 усиливал NK-опосредованное уничтожение клеток Jurkat в отсутствие антитела, нацеленного на опухолевые клетки, с расчетным EC<sub>50</sub> 0,3744 мкг/мл. В присутствии насыщающих количеств ONC-392 (20 мкг/мл), ONC-841 дополнительно усиливал активность NK-клеток с расчетным EC<sub>50</sub> 2,274 мкг/мл. Таким образом, ONC-841 способствовал как ADCC, так и независимому от антител цитолизу клеток злокачественного лейкоза NK-клетками.

ONC-841 способствует уничтожению опухолевых клеток человека МКПК человека

[0154] Siglec-10 экспрессируется преимущественно на миелоидных клетках. Следовательно, воздействие ONC-392, вероятно, будет выходить за рамки NK-клеток. Чтобы получить более полное представление о противоопухолевом эффекте, авторы протестировали влияние ONC-841 на лизис лейкозных клеток с помощью МКПК, выделенной из свежей цельной крови 3 отдельных доноров. Клетки-мишени Jurkat-CTLA-4, меченные кальцеином AM, совместно инкубировали с МКПК, выделенными из свежей цельной крови, с титрованием mAb ONC-841. После инкубации клетки анализировали с помощью проточной цитометрии. Процент гибели клеток рассчитывали на основе количества оставшихся кальцеин AM<sup>+</sup> живых клеток по сравнению с контролем. Как показано на фиг. 19, значительный лизис был достигнут при низких дозах ONC-841 с расчетным EC<sub>50</sub> донора 1, донора 2 и донора 3 при 0,3645, 0,01761 и 0,009572 мкг/мл, соответственно. Эти данные демонстрируют, что ONC-841 может способствовать уничтожению лейкемии в отсутствие антител, нацеленных на лейкемию.

Фармакологические исследования *in vivo*

[0155] Чтобы проверить терапевтическую активность ONC-841 на животных моделях, авторы получили трансгенную мышиную модель, в которой удаляли мышиный Siglec-G и вставляли его человеческий ортолог Siglec-10 путем целевой мутации гена Siglecg и вставки клона *Vasmid*, содержащего человеческий Siglec-10, соответственно (см. ниже). Поскольку распределение Siglec-10 в тканях трансгенных мышей согласуется с его распределением в лейкоцитах человека, авторы использовали эту модель для тестирования влияния ONC-841 на отторжение опухоли в двух отдельных моделях.

Монотерапия и комбинированная терапия антителами, нацеленными на рак

[0156] Для оценки терапевтического эффекта для солидных опухолей авторы использовали клеточную линию B16F10, экспрессирующую EGFR человека. Через 6 дней

после заражения опухолевыми клетками мышей, несущих опухоль, обрабатывали контрольным IgG, ONC-841 или ONC-841 с цетуксимабом, и рост опухоли измеряли в слепом режиме. B16-EGFR, несущие опухоль (п/к) Siglec10TG<sup>+/+</sup>; Siglecg<sup>-/-</sup> мышей (n равно 4-5) обрабатывали внутривенно 200 мкг контрольного hIgGfс или ONC-841 и внутривенно 10 мкг контрольного hIgGfс или цетуксимаба каждые три дня для четырех инъекций, начиная с 6 дня после инокуляции опухоли. Как показано на фиг. 20, внутритуморозная инъекция цетуксимабом имела минимальный эффект, в то время как частичная задержка роста опухоли достигалась при монотерапии ONC-841. В комбинации была достигнута более значительная задержка роста опухоли. Эти данные свидетельствуют о том, что ONC-841 обладает терапевтической активностью в отношении солидных опухолей в мышинной модели.

[0157] Чтобы проверить количества ONC-841, необходимые для 50% уменьшения объема опухоли, авторы титровали дозу ONC-841 в модели комбинированной терапии. Доза внутритуморозного лечения цетуксимабом была фиксированной и составляла 10 мкг/инъекцию, в то время как доза системного ONC-841 составляла 5, 10 и 20 мг/кг. Вкратце,  $5 \times 10^5$  опухолевых клеток B16-EGFR вводили (п/к) мышам Siglec10TG<sup>+/+</sup>; Siglecg<sup>-/-</sup> (n равно 4-5) и начинали лечение, когда опухоли достигали 4-7 мм в диаметре. Мышам, несущим опухоль, вводили внутривенно 2,5, 10 или 20 мг/кг ONC-841 и вводили внутривенно 10 мкг hIgGfс или цетуксимаба каждые три дня для четырех инъекций. Как показано на фиг. 21, было достигнуто дозозависимое уменьшение объема опухоли ONC-841. С помощью линейного регрессионного анализа было определено, что EC50 ONC-841 составляет 16,49 мг/кг.

#### Комбинированная терапия антителом к CTLA-4

[0158] В качестве модели для демонстрации комбинированного эффекта ONC-841 с иммунотерапевтическими антителами, нацеленными на хозяина, авторы использовали немодифицированную модель B16F10 и мышинное mAb CTLA-4, 9D9. Как показано на фиг. 22, ни 9D9, ни ONC-841 не вызывали задержку роста опухоли. Однако в комбинации наблюдалось значительное снижение роста опухоли.

#### Фармакологически значимые виды

ONC-841 не реагирует с Siglec G/10 мыши и примата, отличного от человека

[0159] Известно, что белки Siglec быстро развиваются с ограниченной гомологией среди ортологов разных видов. Человеческий Siglec-10 имеет большое сходство с некоторыми из его ортологов NHP: 90% сходство с яванским макаком и резусом Siglec-10, тогда как сходство с мышинным Siglec-G составляет только 60% (Ensembl.org).

[0160] Чтобы определить, какие виды животных являются подходящими токсикологическими видами для ONC-841, авторы оценивали связывание антитела ONC-841 с NHP Siglec-10 или мышинным ортологом Siglec-G в 3 анализах:

[0161] А. Связывание с рекомбинантным Siglec-10 / Siglec-G

[0162] В. Связывание с клетками ехрi293, временно экспрессирующими NHP Siglec-10/Siglec-G

[0163] С. Связывание с МКПК яванского макака

[0164] Ни один из анализов не показал специфического связывания ONC-841 с NHP Siglec-10 или мышинным Siglec-G, что позволяет предположить, что конкретный эпитоп, с которым связывается ONC-841, не является общим с этими видами.

Связывание с рекомбинантным Siglec-10/Siglec-G других видов

[0165] Рекомбинантные His-меченые Siglec-10 человека и яванского макака и Siglec-G мыши были приобретены у ACROBiosystems. Белки Siglec наносили на планшет для ELISA в качестве антигенной ловушки. Захваченный ONC-841 детектировали с использованием козьего антитела против человека. Как показано ниже на фиг. 23, ONC-841 продемонстрировал специфическое связывание с белками человека Siglec-10, но не с белками яванского макака или мыши.

Связывание с клетками 293Т, трансфицированными генами NHP Siglec-10

[0166] Клетки ехрi293 трансфицировали экспрессионными плазмидами Siglec-10 человека, яванского макака, резуса и мартышки, соответственно, для получения этих белков на поверхности клеток. Связывание ONC-841 оценивали с помощью проточной цитометрии на живых клетках ехрi293, а экспрессию различных белков Siglec-10 проверяли с использованием поликлонального антитела к Siglec-10 (фиг. 24, более светлая серая линия). ONC-841 показал связывание только с клетками, экспрессирующими человеческий Siglec-10, но не с любым из NHP Siglec-10 (фиг. 24, более темная серая линия).

Связывание с МКПК яванского макака

[0167] Для тестирования связывания ONC-841 с нативно экспрессируемыми Siglec-10 МКПК человека и яванского макака окрашивали и оценивали с помощью проточной цитометрии. Siglec-10 экспрессируется как моноцитами (CD14<sup>+</sup> клетки), так и В-клетками (CD20<sup>+</sup> клетки), и, следовательно, связывание ONC-841 было протестировано на этих популяциях. Для валидации специфического окрашивания и устранения возможного связывания ONC-841 через Fc-рецептор дополнительный образец клеток каждого вида перед окрашиванием блокировали избытком человеческого IgG. ONC-841 ясно показал

высокоспецифичное связывание как с человеческими моноцитами, так и с В-клетками, и на связывание не влияло присутствие избыточного количества человеческого IgG (фиг. 25). Напротив, ONC-841 демонстрировал слабое связывание с обеими субпопуляциями клеток яванского макака. Кроме того, избыточное количество человеческого IgG значительно снижало это связывание, что указывает на низкое или неспецифическое свойство связывания ONC-841 с этими NHP Siglec-10 (фиг. 27).

Получение трансгенных мышей с SIGLEC10 человека без эндогенного гена Siglecg: Siglec10TG<sup>+/+</sup>; Siglecg<sup>-/-</sup>

[0168] Поскольку ONC-841 не связывает лейкоциты доступных видов NHP и мышей, ни NHP, ни мыши не считаются релевантными видами для токсикологических и фармакологических исследований. Другие широко используемые токсичные виды генетически более далеки от человека, чем протестированные NHP, и, таким образом, менее вероятно, имеют отношение к исследованиям токсичности. Поэтому авторы решили разработать трансгенную мышиную модель для исследований токсичности, в которой ген Siglec10 человека заменяет его мышинный ортолог Siglecg.

[0169] Трансгенную линию Siglec10 (здесь и далее называемую Siglec10TG<sup>+/+</sup>) получали от мышей C57/BL6 компанией Cyagen, Inc. (Санта-Клара, Калифорния) с использованием клона Vasmid с геномной последовательностью, содержащей гены Siglec10, Siglec8 и Siglec12 человека. Применение геномного клона с регуляторными и кодирующими последовательностями человека может позволить мышам экспрессировать Siglec10 способом, по существу аналогичным способу экспрессии в лейкоцитах человека. Наши данные, представленные в настоящем документе, подтверждают эту гипотезу. Кроме того, для захвата эффекта блокирования Siglec-10 *in vivo* авторы удалили эндогенный ген Siglecg мыши путем скрещивания трансгена с мышью Siglecg<sup>-/-</sup>, в которой экзоны 2-11 Siglecg были заменены кассетой GFP/NEO.

[0170] Линию C57BL/6 Siglec10TG<sup>+/+</sup>; Siglecg<sup>-/-</sup> создавали путем скрещивания Siglec10TG<sup>+/+</sup> с мышами Siglecg<sup>-/-</sup>. Поколения F1 и F2 скрещенных мышей подвергали скринингу на экспрессию как hSiglec-10, так и Siglec-G с помощью проточной цитометрии клеток крови (фиг. 26 вверху и в середине) для выбора желаемого генотипа Siglec10TG<sup>+/+</sup>; Siglecg<sup>-/-</sup>. Это окрашивание подтвердило экспрессию человеческого Siglec-10 и отсутствие мышинового Siglec-G. Данные показали экспрессию Siglec-10 в более чем 30% В-клеток мыши, НК-клеток, моноцитов, дендритных клеток (ДК) и нейтрофилов и менее чем 10% Т-клеток в МКПК мыши.

[0171] Для сравнения связывания ONC-841 с субпопуляциями клеток в крови, наблюдаемого в Siglec10TG<sup>+/+</sup>; Siglecg<sup>-/-</sup> со связыванием ONC-841 с клетками человека, экспрессирующими эндогенный Siglec-10, МКПК человека окрашивали на маркеры линии и либо флуоресцентно маркировали ONC-841, либо коммерчески доступным антителом к Siglec-10. На нижней панели фиг. 26 показано четкое окрашивание Siglec-10 ONC-841 на моноцитах и В-клетках, в то время как Т-клетки не имели явного окрашивания, как сообщается в литературе. Неожиданно обнаружилось отсутствие четкого окрашивания НК-клеток в крови, CD16-положительных или 16-отрицательных НК-клеток, хотя данные показали, что ONC-841 усиливал активность ADCC НК-клеток, выделенных из МКПК (фиг. 26). Одно из возможных объяснений заключается в том, что НК-клетки человека экспрессируют более низкие количества Siglec-10, и текущий анализ не является чувствительным. Другой вариант заключается в том, что НК-клетки из МКПК человека покупали замороженными и размораживали для окрашивания Siglec-10. Расхождение, наблюдаемое между Siglec10TG<sup>+/+</sup>; Siglecg<sup>-/-</sup>, будет дополнительно исследовано.

[0172] Иммуногистохимию проводили на замороженных срезах из Siglec10TG<sup>+/+</sup>; Siglecg<sup>-/-</sup> мышей для обнаружения связывания ONC-841 в тканях мыши. Вкратце, мгновенно замороженные ткани мышей нарезали и устанавливали на предметные стекла. Срезы блокировали, а затем зондировали 1 мкг/мл ONC-841 с последующим обнаружением с использованием вторичного антитела против человека, меченного HRP. Связывание ONC-841 визуализировали с использованием DAB в качестве хромогенного субстрата для HRP, который дает коричневый цвет, и микропрепараты контрастировали гематоксилином для визуализации ядер клеток в синем цвете. Изучение микропрепаратов показало окрашивание иммунных клеток в гемопозитических органах и большинстве других тканей. Это был предварительный эксперимент, который будет повторен, а срезы будут исследованы обученным патологоанатомом. Примеры окрашивания можно увидеть на фиг. 27.

[0173] Широкая экспрессия Siglec-10 наблюдается на лейкоцитах, обитающих в тканях, в большинстве тканей/органов Siglec10TG<sup>+/+</sup>; мыши Siglecg<sup>-/-</sup> предполагают, что мышьяная модель будет ценной для токсикологических и фармакологических исследований.

#### Анализ высвобождения цитокинов *in vitro*

[0174] Было показано, что некоторые терапевтические средства на основе моноклональных антител индуцируют ряд острых инфузионных реакций, включая синдром высвобождения цитокинов (CRS), который может привести к нежелательным явлениям у

пациентов. На молекулярном уровне CRS характеризуется повышенными уровнями TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  через 1-2 часа после введения с последующим увеличением IL-6, IL-10, а иногда IL-2 и IL-8. Чтобы протестировать ONC-841 на возможную индукцию CRS отдельно или в комбинации с ONC-392, проводили предварительный анализ высвобождения цитокинов (CRA). ONC-841 с ONC-392 или без него в различных концентрациях до 2 мг/мл покрывали 96-луночным планшетом в течение ночи. Коммерческое антитело IgG человека (hIgG) использовали в качестве отрицательного контроля, а шарики CD3\_CD28 использовали в качестве положительного контроля. На следующий день планшеты промывали и в лунки добавляли МКПК от 4 различных здоровых доноров. Высвобождение цитокинов в супернатант тестировали через 48 часов после добавления МКПК с использованием панели 1 воспаления человека BioLegend 's LegendPlex (кат. №740809) и включали IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1 (CCL2), IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 и IL-33. Анализ проводили с МКПК от 4 разных доноров, и результаты представляют собой репрезентативные данные от одного из доноров (фиг. 29). ONC-841 с ONC-392 или без него не индуцировал цитокины выше уровней, обнаруженных для лунок без покрытия. Единственными лунками, в которых индуцировали цитокины, был положительный контроль гранул CD3/CD28. Некоторые цитокины также индуцировали в лунках, содержащих коммерческий IgG4. В целом, данные свидетельствуют о том, что ONC-841 не индуцирует высвобождение цитокинов из wPBMC и не будет индуцировать CRS (синдром высвобождения цитокинов) у пациентов.

[0175] Будут проведены дополнительные анализы *in vitro* для оценки того, способен ли ONC-841, с ONC-392 или без него в аналогичных концентрациях, индуцировать высвобождение цитокинов из нормальной, покоящейся МКПК человека. Анализы высвобождения цитокинов проводили в соответствии с протоколами, которые предсказывали высокий риск CRS для TGN1412. Будет проверено не менее 10 доноров. Эксперименты, проведенные только с ONC-392, показали, что он непосредственно не активирует Т-клетки.

#### Пример 8

Клиническое исследование антител к Siglec-10

Показание к применению

[0176] Для фазы 1 будут включены пациенты с гистологически или цитологически подтвержденным диагнозом солидных опухолей, которые имеют прогрессирующее местно-распространенное или метастатическое заболевание после неэффективности или непереносимости установленной стандартной медицинской противораковой терапии в соответствии со стандартными рекомендациями по уходу, такими как рекомендации NCCN.

[0177] Для фазы 2 пациенты с немелкоклеточным раком легкого, которые не прошли иммунотерапию, будут выбраны для открытого исследования для проверки клинической эффективности с использованием двухэтапного дизайна Саймона.

#### Обоснование

[0178] Как показано на примере успеха антител к PD(L)1 и к CTLA-4 в клинике, антитела, которые высвобождают супрессию Т-клеток в микроокружении опухоли, оказали преобразующее влияние на уход за онкологическими пациентами. Успех подчеркивает силу нацеливания на иммунные контрольные точки адаптивного Т-клеточного иммунитета. Недавние исследования показали, что нацеливание на врожденные иммунные контрольные точки, которые ограничивают функцию NK-клеток и макрофагов, может обеспечить новые подходы к улучшению иммунотерапии рака. Среди этих предполагаемых врожденных контрольных точек находятся пути, которые отрицательно регулируют фагоцитоз или уничтожение опухолевых клеток макрофагами и NK-клетками. Молекулы, которые подавляют фагоцитоз макрофагов, в совокупности называются сигналами "не ешь меня" (DNEMS). Среди известных DNEMS путь CD47-SIRP $\alpha$  является основной врожденной иммунной контрольной точкой для иммунотерапии рака, и mAb к CD47 активно тестируются в клинических исследованиях.

[0179] Доклинические исследования выявили взаимодействие CD24-Siglec-10 в качестве мощного DNEMS, который конкурирует с путем CD47-SIRP $\alpha$ . Путь CD24-Siglec-10 был впервые выявлен соучредителями OncoC4 в качестве врожденной иммунной контрольной точки для минимизации воспалительного ответа на повреждения тканей [4]. Было показано, что CD24Fc, агонист Siglec-10, оказывает защиту от вирусной пневмонии и вирусного колита. Недавнее клиническое исследование фазы 3 продемонстрировало, что CD24Fc обеспечивает значительную защиту госпитализированных пациентов с COVID-19. Напротив, несмотря на убедительные доклинические данные о том, что нацеливание на этот путь способствует фагоцитозу опухолевых клеток, антагонист пути CD24-Siglec-10 клинически не тестировался. Предлагаемое клиническое исследование может заполнить этот значительный пробел путем тестирования безопасности и эффективности mAb к Siglec-10, ONC-841, у онкологических пациентов, которые не справились или не могут переносить стандартные терапевтические средства.

[0180] В дополнение к своей роли в стимулировании фагоцитоза опухолевых клеток макрофагами, наши доклинические исследования показали, что ONC-841 также способствует антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Это новое открытие

побуждает нас тестировать ONC-841 в комбинации с лекарственными средствами, основная функция которых заключается в антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и/или ADCP, включая антитела, нацеленные на раковые клетки, и антитела, нацеленные на иммунные клетки. Ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами белок 4 (CTLA-4), также известный как CD152 (кластер дифференцировки 152), представляет собой рецептор белка клеточной поверхности, который взаимодействует с B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86) для обеспечения надлежащего функционирования регуляторных Т-клеток и защиты хозяина от аутовоспалительных заболеваний. Моноклональные антитела (mAb) к CTLA-4, такие как одобренное антитело ипилимумаб (продаваемое как YERVOY® компанией Bristol Myers Squibb), продемонстрировали сильные и обширные иммунотерапевтические эффекты в отношении рака (CITE) в различных доклинических моделях и используются клинически как в качестве монотерапии, так и в составе комбинированной терапии с ниволумабом (антитело к PD-1, продаваемое как OPDIVO® компанией Bristol Myers Squibb). Однако монотерапия CTLA-4 имеет больше связанных с иммунотерапией побочных эффектов (irAE), чем терапия антителом к PD-1/PD-L1. Кроме того, частота тяжелых irAE (степени 3 и 4) достигла 55% у пациентов с меланомой, получавших комбинацию ипилимумаба и ниволумаба. Тяжелые irAE дополнительно ограничивают дозы, переносимые онкологическими больными. Тем не менее, ипилимумаб в комбинации с ниволумабом к PD-1 приводил к значительному улучшению показателей ответа и общей выживаемости при множественных типах рака. Кроме того, антитела к CTLA-4 индуцируют длительный иммунитет у больных раком. Таким образом, CTLA-4 остается важной мишенью иммунотерапии, но остаются серьезные проблемы в повышении как безопасности, так и эффективности mAb к CTLA-4.

[0181] ONC-392 представляет собой высокоселективное гуманизованное моноклональное изотипическое антитело IgG1-каппа к CTLA-4. Авторы продемонстрировали, что ONC-392 диссоциирует с CTLA-4 при низком pH, чтобы обеспечить его выход из лизосомальной деградации и рециркуляцию на поверхность клетки. Мы предоставили несколько линий доказательств того, что pH-чувствительное антитело, такое как ONC-392, не только более безопасно, но и более эффективно при истощении Treg и отторжении опухоли, чем ипилимумаб, который нечувствителен к pH.

[0182] Поскольку терапевтическая эффективность mAb к CTLA-4 обусловлена истощением внутриопухолевого Treg посредством ADCC и/или ADCP, в то время как их токсичность обусловлена понижающей регуляцией CTLA-4, интересно комбинировать ONC-

392 с ONC-841, чтобы увидеть, может ли это привести к более сильной противоопухолевой активности посредством усиления ADCC для истощения Treg, в то же время поддерживая ONC-392 в более безопасном уровне дозы, чтобы избежать irAE.

[0183] Siglec-10 стал многообещающей мишенью для иммунотерапии. Доклинические исследования *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали, что Siglec-10 является отрицательным регулятором ADCC, включая ADCC, вызванный ONC-392. Мы разработали ONC-841 на основе его способности усиливать ADCC ONC-392. Авторы продемонстрировали на животной модели, что ONC-841 усиливает отторжение опухоли, индуцированное mAb к CTLA-4.

[0184] Взятые вместе, антагонист Siglec-10 и ONC-841 могут способствовать противоопухолевому иммунитету двумя различными механизмами. Во-первых, он может инактивировать DNEMS для стимулирования фагоцитоза опухолевых клеток. Во-вторых, путем блокирования отрицательной передачи сигнала через Siglec-10 в ADCC, ONC-841 может усиливать терапевтическую активность терапевтических антител на основе ADCC. Чтобы в полной мере использовать эти биологические активности и терапевтический потенциал, настоящее исследование предназначено для оценки безопасности, фармакокинетики и эффективности ONC-841 в качестве монотерапии и ONC-841 в комбинации с ONC-392 у пациентов с распространенными или метастатическими солидными опухолями.

Краткое описание дизайна исследования

[0185] Открытое исследование фазы 1/2 по увеличению дозы внутривенного (в/в) введения ONC-841 в качестве монотерапии и в комбинации с ONC-392 у участников с распространенными/метастатическими солидными опухолями.

Фаза 1А, исследования по подбору дозы

[0186] Исследование фазы 1А состоит из двух частей, чтобы соответственно определить RP2D (рекомендуемая доза фазы 2) для монотерапии (часть А) и для комбинированной терапии (часть В):

[0187] (1) Часть А: Увеличение дозы монотерапии для определения рекомендуемой дозы фазы 2 для монотерапии (RP2D-M). Повышение дозы ONC-841 будет включать пациентов, ранее не получавших ONC-392, с распространенным раком различных типов гистологии. Будет протестировано шесть уровней ONC-841, а начальная доза будет определена в зависимости от данных GLP по токсичности. ONC-841 будет вводиться путем в/в инфузии один раз в 21 день (1 р/3 нед). В исследовании будет использоваться интрапациентное увеличение дозы до второй по величине дозы, после чего она перейдет на схему 3+3. Шесть пациентов будут включены в окончательный уровень дозы с возможностью деэскалации, если

ДЛТ наблюдается у 2 или более пациентов. RP2D-M будет определяться как самый высокий уровень дозы, при котором менее чем у 2 из 6 пациентов развился DLT.

[0188] (2) Часть В: Исследование подбора дозы комбинированной терапии для определения рекомендуемой дозы фазы 2 для ONC-841 в комбинации (RP2D-C) с 3,0, 6,0 или 10,0 мг/кг ONC-392. Первая доза будет на один уровень дозы ниже, чем RP2D-M, в комбинации с ONC-392, 1 р/3 нед. Три пациента будут включены в первую когорту по схеме 3+3. Если DLT не наблюдается, доза будет увеличена до RP2D-M. Это один DLT, еще 3 пациента будут включены в исследование. Если не более чем у одного пациента из шести возникнут DLT, то в следующей когорте препарат ONC-841 будет находиться либо на промежуточном уровне между уровнем ниже RP2D-M и RP2D-M, либо на уровне RP2D-M, как будет определено по данным безопасности. Шесть пациентов будут включены в исследование на уровне конечной дозы. RP2D-C будет определяться как самый высокий уровень дозы, при котором менее чем у 2 из 6 пациентов развился DLT.

#### Фаза 1B, расширенные когорты

[0189] Фаза 1B состоит из двух групп расширенной дозы для проверки безопасности и клинической активности монотерапии ONC-841 при RP2D-M (группа А) или комбинации ONC-841 при RP2D-C с ONC-392 при 3,0, 6,0 или 10,0 мг/кг (группа В).

[0190] Мы планируем включить 30 пациентов в каждую группу с распространенными солидными опухолями или с прогрессированием заболевания в соответствии со стандартом лечения (SOC) или с непереносимостью SOC. Критерии приемлемости будут такими же, как и в Фазе 1А.

#### Фаза 2

[0191] Испытание фазы 2 будет проводиться по двухступенчатой схеме Саймона. На этапе 1 для определения частоты объективного ответа будет включено в общей сложности 29 пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Если более 4 пациентов достигли объективного ответа, исследование перейдет к этапу 2, чтобы включить достаточное количество пациентов (от 80 до 130), чтобы достичь 80% мощности для отклонения нулевой гипотезы о том, что частота ответа составляет менее 20%.

[0192] Мы оценили 22 основных типа рака по их потенциальной реакции на комбинированную терапию с использованием ONC-392 плюс ONC-841, которая, в свою очередь, была основана на их иммунологическом ландшафте, реконструированном с помощью секвенирования РНК и геномных данных в базе данных TCGA. Как показано на фиг. 28, авторы сгенерировали картину микроокружения иммунной опухоли из секвенирования РНК и

геномных данных 7279 независимых образцов рака, принадлежащих к 22 типам рака, из базы данных The Cancer Genomics Atlas (TCGA). В основном на основе геномных данных и секвенирования РНК клинических образцов пациентов с меланомой до лечения, которые впоследствии были идентифицированы как отвечающие и не отвечающие на антитело к CTLA-4, ипилиумаб, авторы определили 5 ранжирующих компонентов чувствительности к антителу к CTLA-4, включая экспрессию гена CTLA-4, потенциал ADCC, мутационную нагрузку, а также обогащение генов и клеточный состав, которые способствуют чувствительности к CTLA-4. Общее число ранжирования рассчитывали по сумме 5 независимых значений разделения, каждое из которых состояло из 1-3 компонентов. Ранжирование ответа на ONC-841 основано на избытке экспрессии SIGLEC10 и экспрессии макрофагов, установленной по данным секвенирования РНК. Ранжирование ответа на комбинированную терапию основано на их ответе на каждое из антител (таблица 3). Наш анализ показывает, что немелкоклеточная аденокарцинома легкого является наиболее чувствительным типом рака. Активность одного агента ONC-392 поддерживается нашим продолжающимся клиническим исследованием.

Таблица 3. Относительное ранжирование 22 типов рака по их ответу на ONC-392, ONC-841 и их комбинацию

Тип рака	Индекс ONC-392	Индекс ONC-841	Комбинированный индекс ранга
LUAD	2	1	1
SKCM-TM	1	4	2
LUSC	5	3	3
BRCA-Basal	4	6	4
BRCA-Her2	7	7	5
PAAD	8	8	6
HNSC	3	16	7
KIRC	9	10	8
STAD	6	14	9
GBM	21	2	10
BRCA_LumB	13	11	11
BRCA_LumA	14	13	12

COAD	10	17	13
LGG	22	5	14
SKCM-TP	12	15	15
KIRP	20	9	16
OV	18	12	17
READ	11	21	18
LHC	15	19	19
ESCA	17	18	20
BLCA	16	20	21
PRAD	19	22	22

[0193] Основываясь на наших клинических данных и анализе *in silico*, мы выбрали немелкоклеточную аденокарциному легкого в качестве нашего первого клинического показания в исследовании фазы 2 для проверки клинической эффективности комбинированной терапии с ONC-841 и ONC-392.

Лекарственная форма, способ применения и режим дозирования

[0194] Для увеличения дозы при монотерапии ONC-841 будет вводиться в виде минимальной 60-минутной в/в инфузии. Будет оценено шесть уровней дозирования ONC-841. Интервал между приемами препарата составит 21 день. ONC-841 будет предоставлен по графику Q3W. В комбинации ONC-392 и ONC-841 сначала будет вводиться ONC-841 в виде в/в инфузии продолжительностью не менее 60 минут. Затем ONC-392 будет вводиться в виде минимальной 60-минутной в/в инфузии в дозе 3,0, 6,0 или 10,0 мг/кг. ONC-392 и ONC-841 не следует смешивать при введении, и между введением двух препаратов должен быть интервал не менее 30 минут. ONC-841 отдельно или комбинация ONC-392 и ONC-841 будет предоставлена в графике Q3W.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к Siglec-10, которое содержит (а) переменную область тяжелой цепи, содержащую одну или более из определяющей комплементарности области (CDR) 1, содержащей последовательность SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 4, и CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 5; и (б) переменную область легкой цепи, содержащую одну или более из CDR1, содержащей последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащей последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащей последовательность SEQ ID NO: 8.

2. Антитело к Siglec-10 по п. 1, в котором переменная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 1, и переменная область легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 2.

3. Антитело к Siglec-10 по п. 1 или 2, которое представляет собой химерное антитело.

4. Антитело к Siglec-10 по п. 1, в котором переменная область тяжелой цепи содержит последовательность одной из SEQ ID NO: 9-13, и переменная область легкой цепи содержит последовательность одной из SEQ ID NO: 14-18.

5. Антитело к Siglec-10 по п. 4, в котором переменная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 9, 10 или 11, и переменная область легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 15.

6. Антитело к Siglec-10 по п. 5, в котором переменная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 9.

7. Антитело к Siglec-10 по п. 6, в котором тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 25.

8. Антитело к Siglec-10 по п. 7, в котором легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 27.

9. Антитело к Siglec-10 по п. 5, в котором переменная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 10.

10. Антитело к Siglec-10 по п. 9, в котором тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 32.

11. Антитело к Siglec-10 по п. 10, в котором легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 27.

12. Антитело к Siglec-10 по п. 5, в котором переменная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 11.

13. Антитело к Siglec-10 по п. 4, в котором переменная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 10 или 12, и переменная область легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 17.

14. Антитело к Siglec-10 по п. 13, в котором переменная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 10.

15. Антитело к Siglec-10 по п. 13, в котором переменная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 12.

16. Антитело к Siglec-10 по п. 4, в котором переменная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 10 или 12, и переменная область легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 16.

17. Антитело к Siglec-10 по п. 16, в котором переменная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 10.

18. Антитело к Siglec-10 по п. 17, в котором тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 32.

19. Антитело к Siglec-10 по п. 18, в котором легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 34.

20. Антитело к Siglec-10 по п. 16, в котором переменная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 12.

21. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту антитела к Siglec-10 по любому из пп. 1-0.

22. Способ по п. 21, в котором антитело к Siglec-10 вводят в комбинации со второй противораковой терапией.

23. Способ по п. 22, в котором вторая противораковая терапия представляет собой иммунотерапию, нацеленную на рак, или иммунотерапию, нацеленную на иммунные клетки.

24. Способ по п. 23, в котором вторая противораковая терапия представляет собой антитело к CTLA-4.

25. Способ по любому из пп. 21-24, в котором рак представляет собой распространенную солидную опухоль, гематологический рак или рак, который включает инфильтрирующие клетки, связывающиеся с антителом к Siglec-10.

26. Способ по п. 25, в котором рак представляет собой распространенную солидную опухоль, выбранную из группы, состоящей из аденокарциномы легкого (LUAD), кожной меланомы-метастазы (SKCM-TM), плоскоклеточной карциномы легкого (LUSC), инвазивной карциномы молочной железы-базальной карциномы, инвазивной карциномы молочной

железы-*Her2*, аденокарциномы поджелудочной железы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, почечной светлоклеточной карциномы, аденокарциномы желудка, мультиформной глиобластомы, инвазивной карциномы молочной железы-*LumB* или инвазивной карциномы молочной железы-*LumA*, немелкоклеточного рака легкого, глиобластомы, меланомы, глиомы низкой степени злокачественности, рака почки, базального типа рака молочной железы, *Her2+* рака молочной железы, рака поджелудочной железы и рака яичников.

27. Способ по п. 26, в котором аденокарцинома легкого представляет собой немелкоклеточную аденокарциному легкого.

28. Способ по п. 25, в котором рак представляет собой гематологический рак, выбранный из группы, состоящей из лейкемии, синдрома миелоидной дисплазии, В-клеточной лимфомы и множественной миеломы.

29. Антитело к *Siglec-10*, в котором тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 32, и легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 27; тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 25, и легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 27; или тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 32, и легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 34.

30. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту антитела к *Siglec-10* по п. 29.

31. Способ по п. 30, в котором антитело к *Siglec-10* вводят в комбинации со второй противораковой терапией.

32. Способ по п. 31, в котором вторая противораковая терапия представляет собой иммунотерапию, нацеленную на рак, или иммунотерапию, нацеленную на иммунные клетки.

33. Способ по п. 32, в котором вторая противораковая терапия представляет собой антитело к *CTLA-4*.

34. Способ по любому из пп. 30-33, в котором рак представляет собой распространенную солидную опухоль, гематологический рак или рак, который включает инфильтрирующие клетки, связывающиеся с антителом к *Siglec-10*.

35. Способ по п. 34, в котором рак представляет собой распространенную солидную опухоль, выбранную из группы, состоящей из аденокарциномы легкого (LUAD), кожной меланомы-метастазы (SKCM-TM), плоскоклеточной карциномы легкого (LUSC), инвазивной карциномы молочной железы-базальной карциномы, инвазивной карциномы молочной железы-*Her2*, аденокарциномы поджелудочной железы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, почечной светлоклеточной карциномы, аденокарциномы желудка, мультиформной

глиобластомы, инвазивной карциномы молочной железы-LumB или инвазивной карциномы молочной железы-LumA, немелкоклеточного рака легкого, глиобластомы, меланомы, глиомы низкой степени злокачественности, рака почки, базального типа рака молочной железы, Her2+ рака молочной железы, рака поджелудочной железы и рака яичников.

36. Способ по п. 35, в котором аденокарцинома легкого представляет собой немелкоклеточную аденокарциному легкого.

37. Способ по п. 34, в котором рак представляет собой гематологический рак, выбранный из группы, состоящей из лейкемии, синдрома миелоидной дисплазии, В-клеточной лимфомы и множественной миеломы.

38. Применение антитела к Siglec-10 по любому из пп. 1-20 в производстве лекарственного средства для лечения рака.

39. Применение по п. 38, в котором лекарственное средство предназначено для использования в комбинации со второй противораковой терапией.

40. Применение по п. 39, в котором вторая противораковая терапия представляет собой иммунотерапию, нацеленную на рак, или иммунотерапию, нацеленную на иммунные клетки.

41. Применение по п. 0, в котором вторая противораковая терапия представляет собой антитело к CTLA-4.

42. Применение по любому из пп. 38-41, в котором рак представляет собой распространенную солидную опухоль, гематологический рак или рак, который включает инфильтрирующие клетки, связывающиеся с антителом к Siglec-10.

43. Применение по п. 42, в котором рак представляет собой распространенную солидную опухоль, выбранную из группы, состоящей из аденокарциномы легкого (LUAD), кожной меланомы-метастазы (SKCM-TM), плоскоклеточной карциномы легкого (LUSC), инвазивной карциномы молочной железы-базальной карциномы, инвазивной карциномы молочной железы-Her2, аденокарциномы поджелудочной железы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, почечной светлоклеточной карциномы, аденокарциномы желудка, мультиформной глиобластомы, инвазивной карциномы молочной железы-LumB или инвазивной карциномы молочной железы-LumA, немелкоклеточного рака легкого, глиобластомы, меланомы, глиомы низкой степени злокачественности, рака почки, базального типа рака молочной железы, Her2+ рака молочной железы, рака поджелудочной железы и рака яичников.

44. Применение по п. 43, в котором аденокарцинома легкого представляет собой немелкоклеточную аденокарциному легкого.

45. Применение по п. 42, в котором рак представляет собой гематологический рак, выбранный из группы, состоящей из лейкемии, синдрома миелоидной дисплазии, В-клеточной лимфомы и множественной миеломы.

46. Применение антитела к Siglec-10 по п. 29 в производстве лекарственного средства для лечения рака.

47. Применение по п. 46, в котором лекарственное средство предназначено для использования в комбинации со второй противораковой терапией.

48. Применение по п. 47, в котором вторая противораковая терапия представляет собой иммунотерапию, нацеленную на рак, или иммунотерапию, нацеленную на иммунные клетки.

49. Применение по п. 48, в котором вторая противораковая терапия представляет собой антитело к CTLA-4.

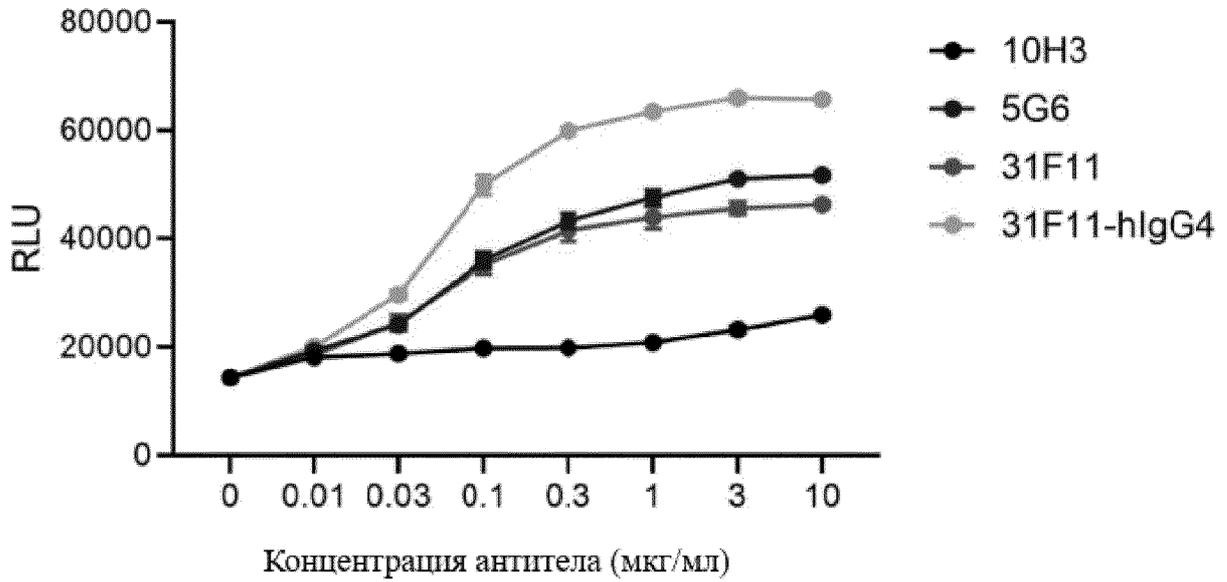
50. Применение по любому из пп. 46-49, в котором рак представляет собой распространенную солидную опухоль, гематологический рак или рак, который включает инфильтрирующие клетки, связывающиеся с антителом к Siglec-10.

51. Применение по п. 50, в котором рак представляет собой распространенную солидную опухоль, выбранную из группы, состоящей из аденокарциномы легкого (LUAD), кожной меланомы-метастазы (SKCM-TM), плоскоклеточной карциномы легкого (LUSC), инвазивной карциномы молочной железы-базальной карциномы, инвазивной карциномы молочной железы-Her2, аденокарциномы поджелудочной железы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, почечной светлоклеточной карциномы, аденокарциномы желудка, мультиформной глиобластомы, инвазивной карциномы молочной железы-LumB или инвазивной карциномы молочной железы-LumA, немелкоклеточного рака легкого, глиобластомы, меланомы, глиомы низкой степени злокачественности, рака почки, базального типа рака молочной железы, Her2+ рака молочной железы, рака поджелудочной железы и рака яичников.

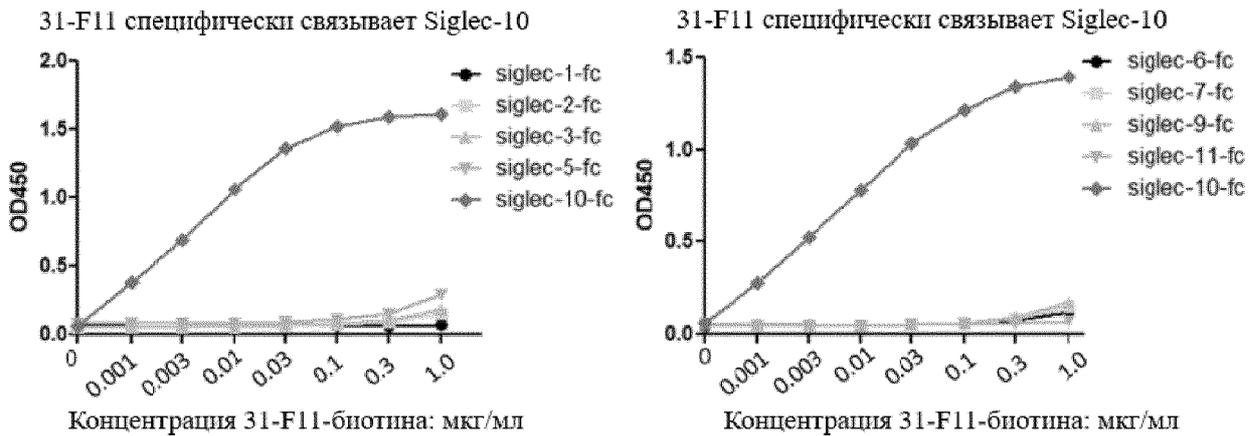
52. Применение по п. 51, в котором аденокарцинома легкого представляет собой немелкоклеточную аденокарциному легкого.

53. Применение по п. 50, в котором рак представляет собой гематологический рак, выбранный из группы, состоящей из лейкемии, синдрома миелоидной дисплазии, В-клеточной лимфомы и множественной миеломы.

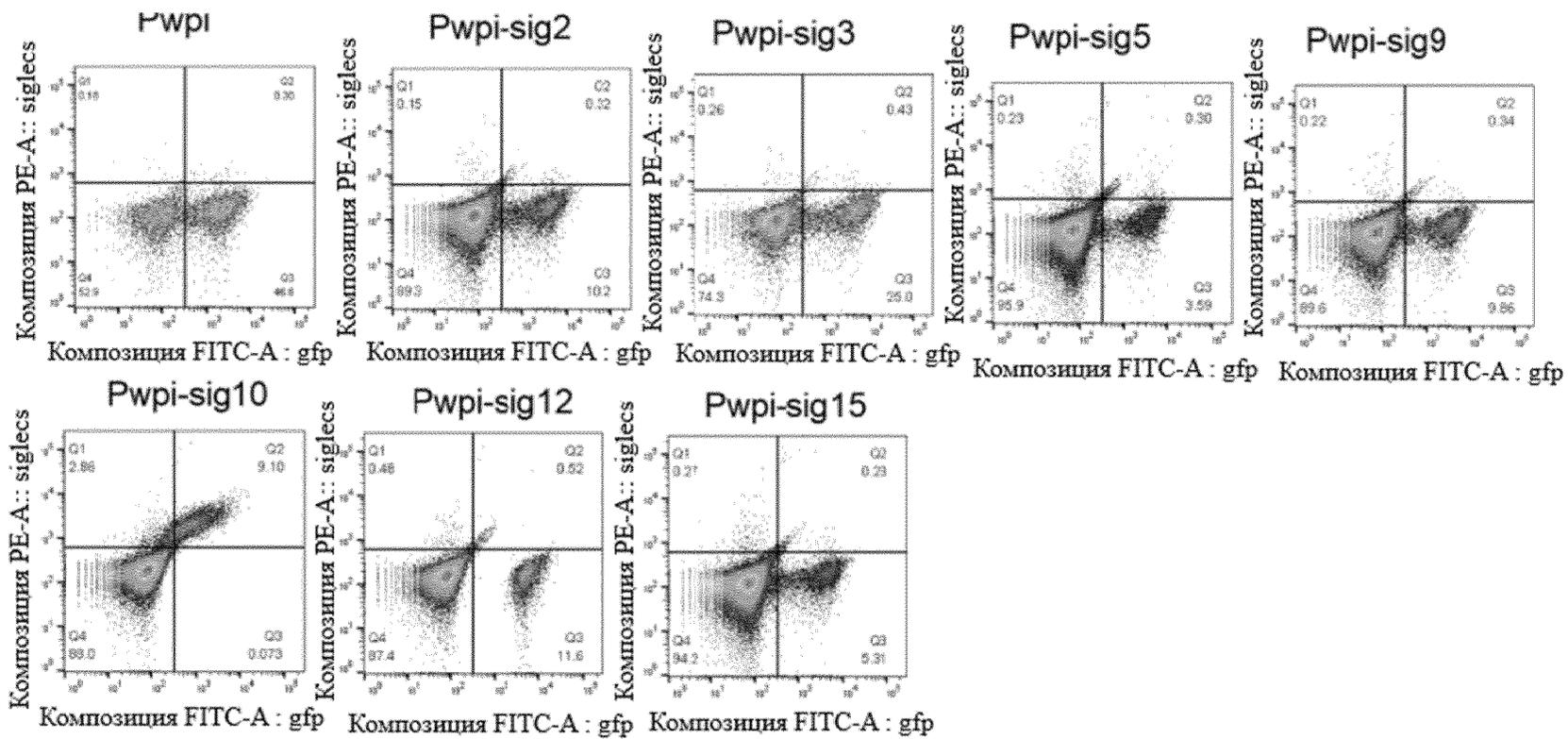
КОМПОЗИЦИИ К SIGLEC И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ



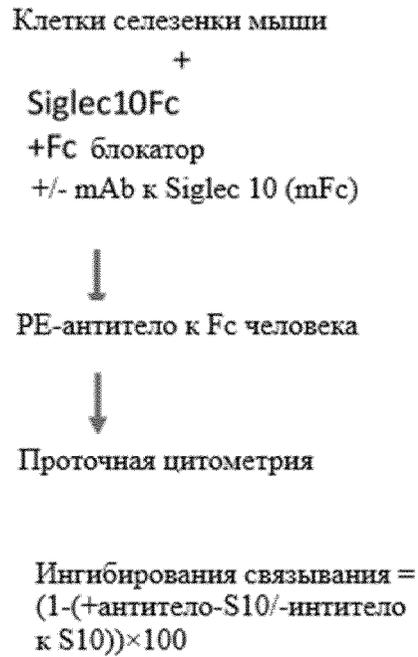
Фиг. 1



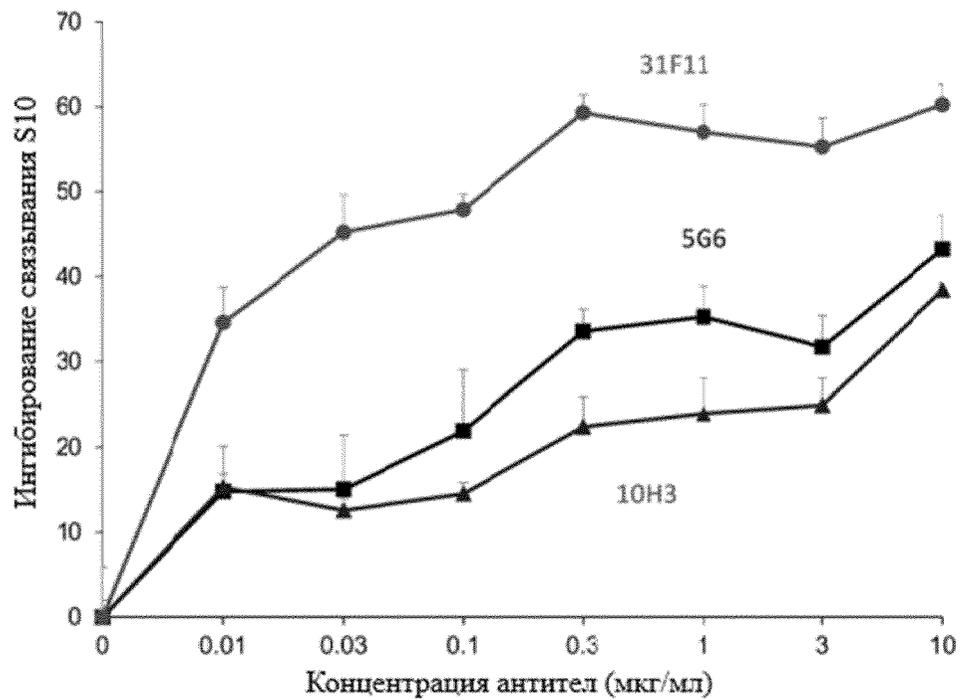
Фиг. 2



Фиг. 3

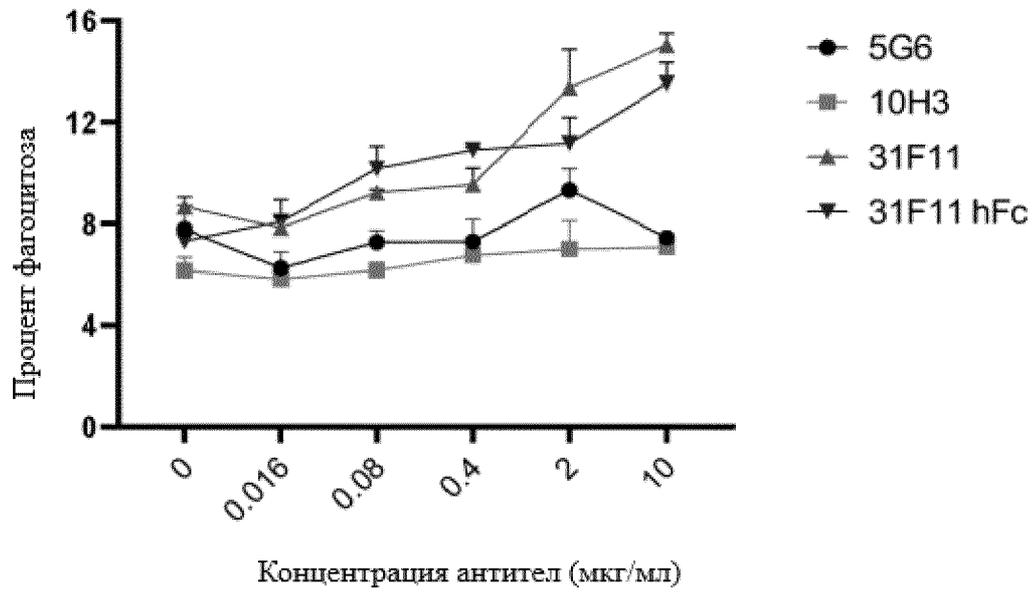


Фиг. 4А

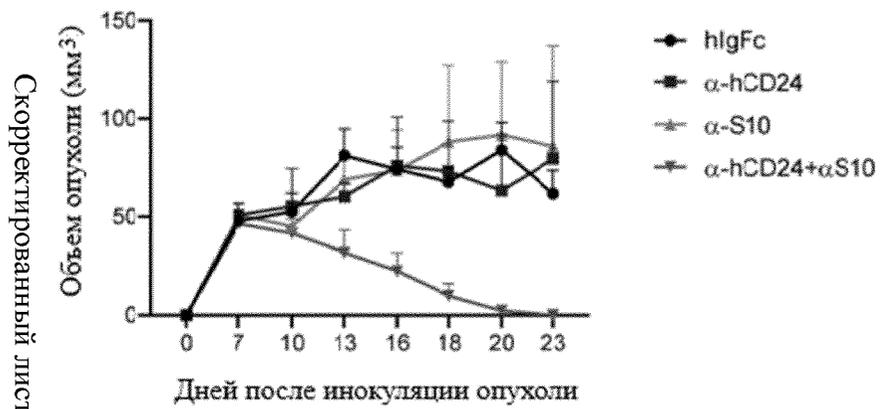


Фиг. 4В

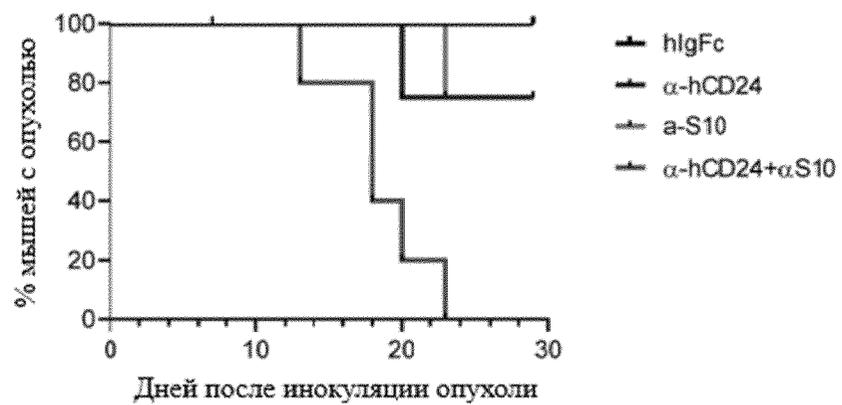
## КОМПОЗИЦИИ К SIGLEC И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ



Фиг. 5

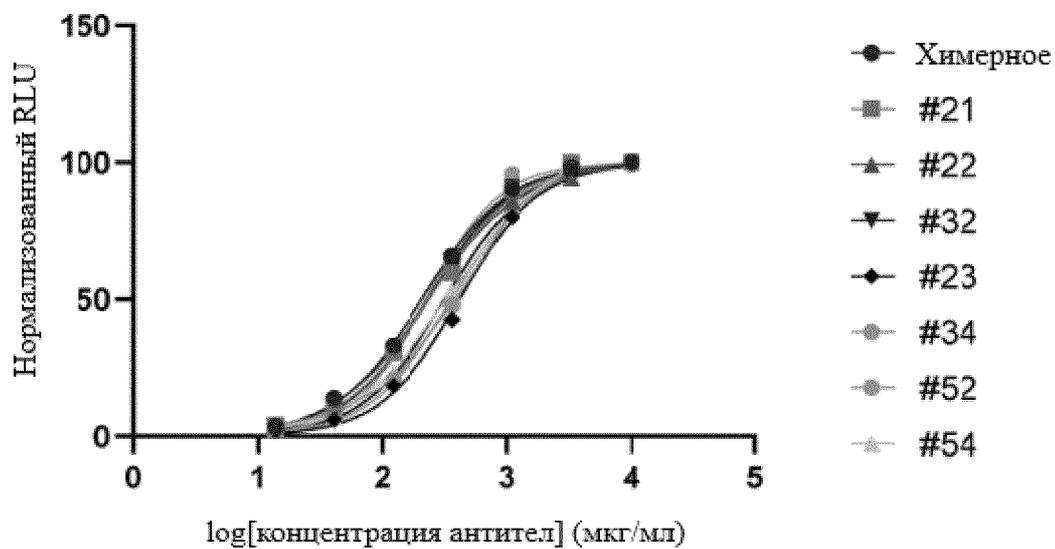


Фиг. 6А

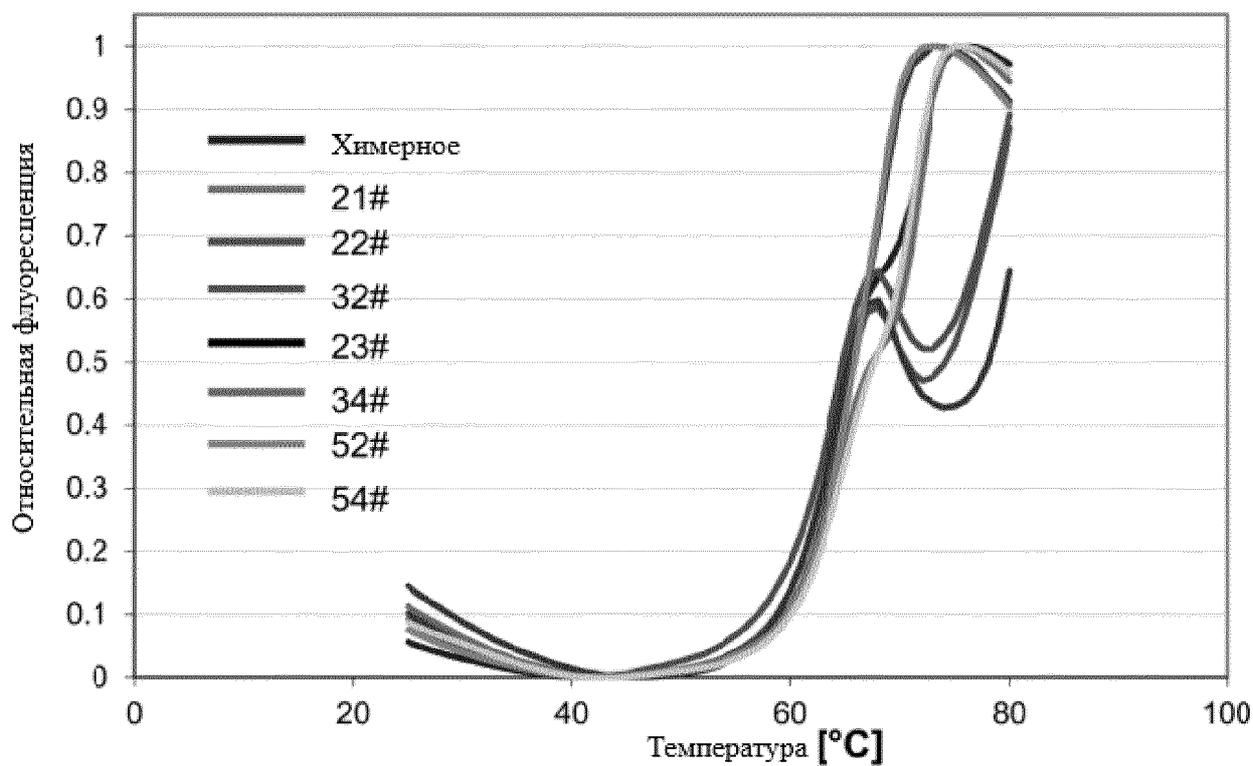


Фиг. 6В

## КОМПОЗИЦИИ К SIGLEC И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

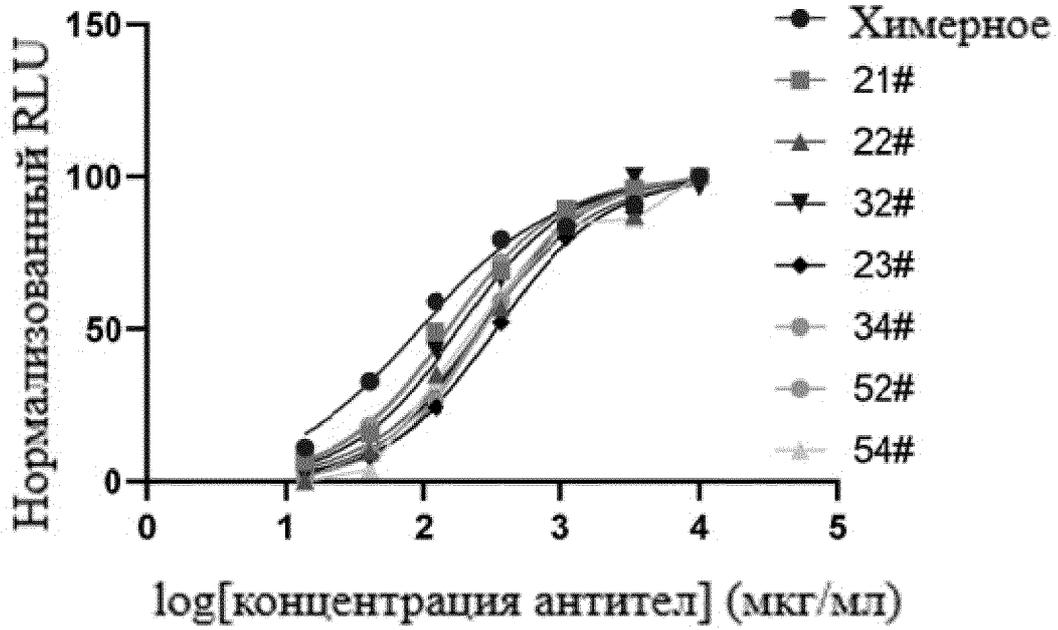


Фиг. 7

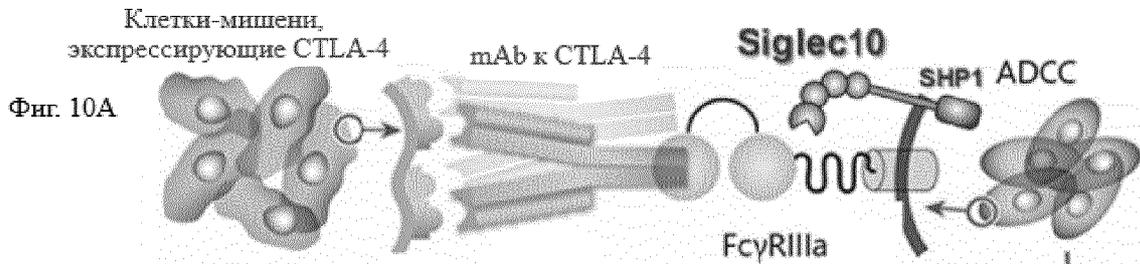


Фиг. 8

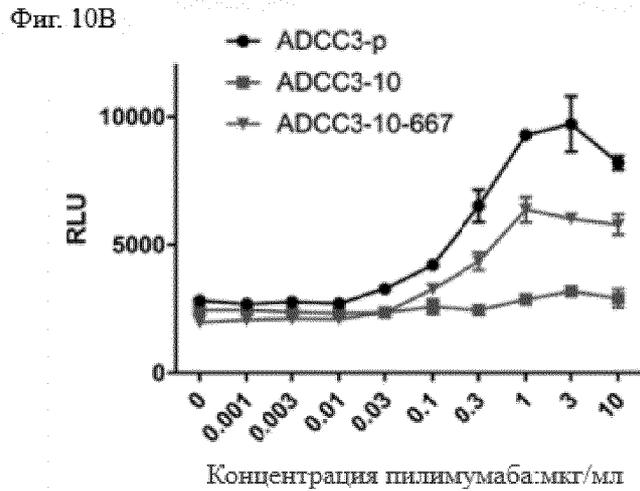
КОМПОЗИЦИИ К SIGLEC И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ



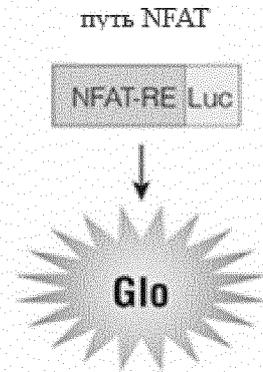
Фиг. 9



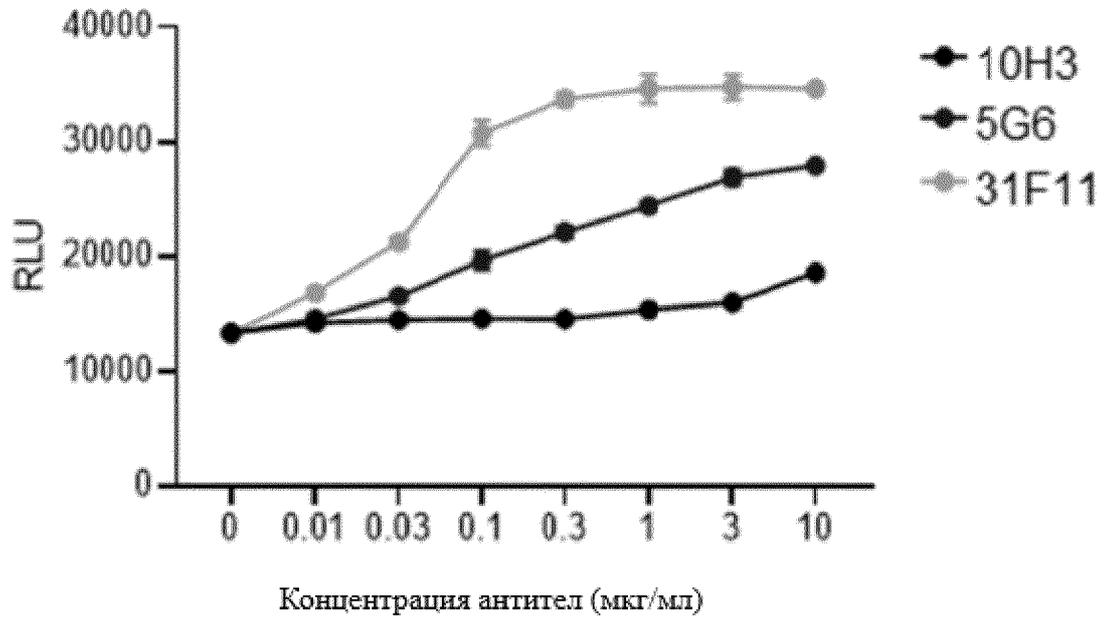
Фиг. 10А



Фиг. 10В

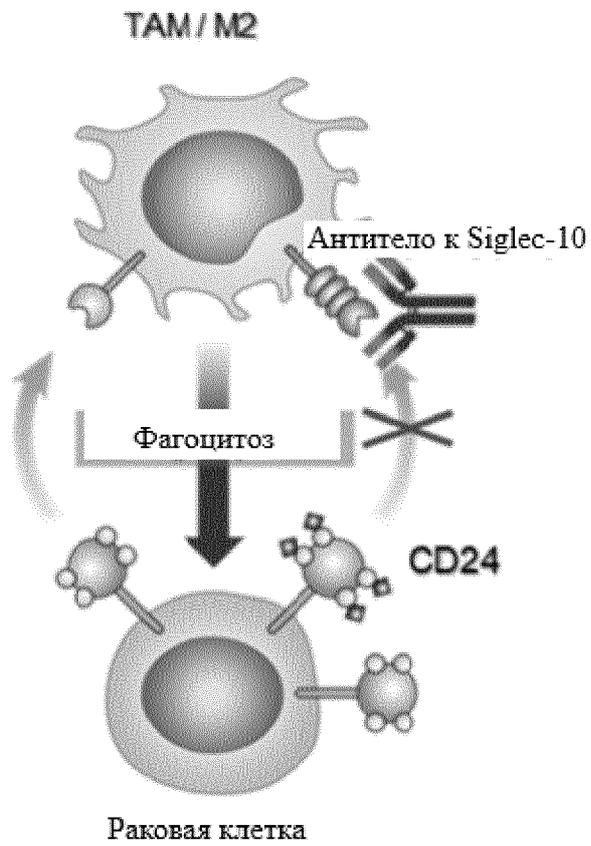


## КОМПОЗИЦИИ К SIGLEC И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

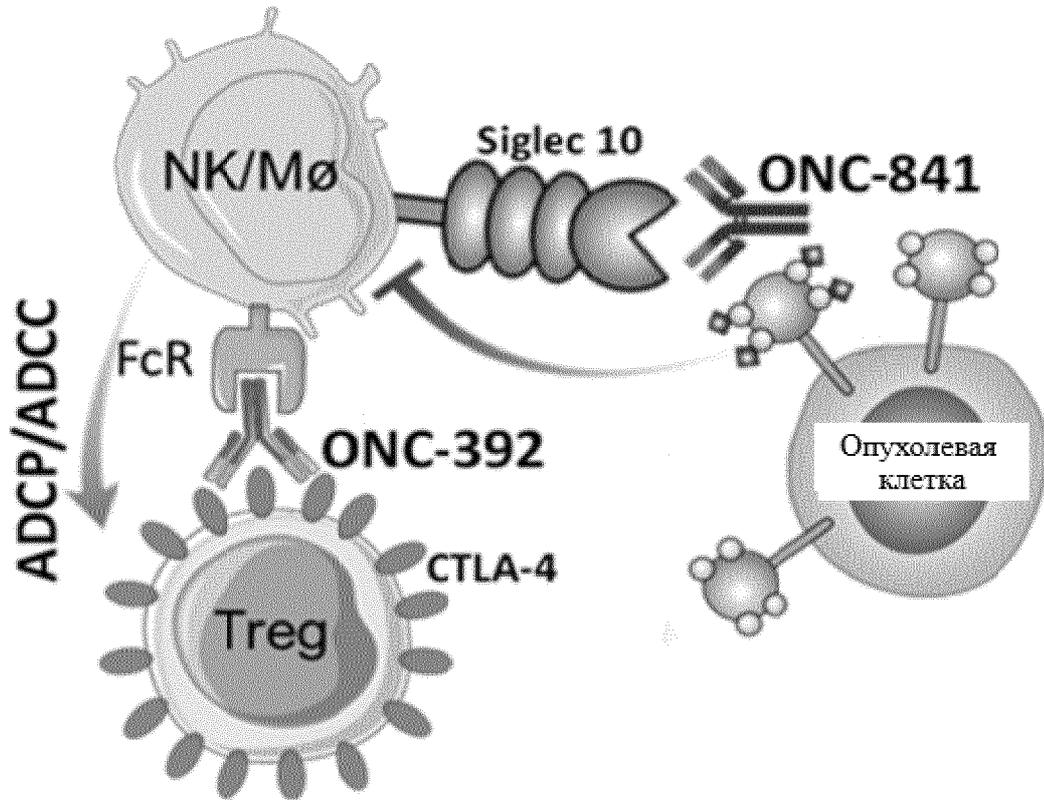


Фиг. 11

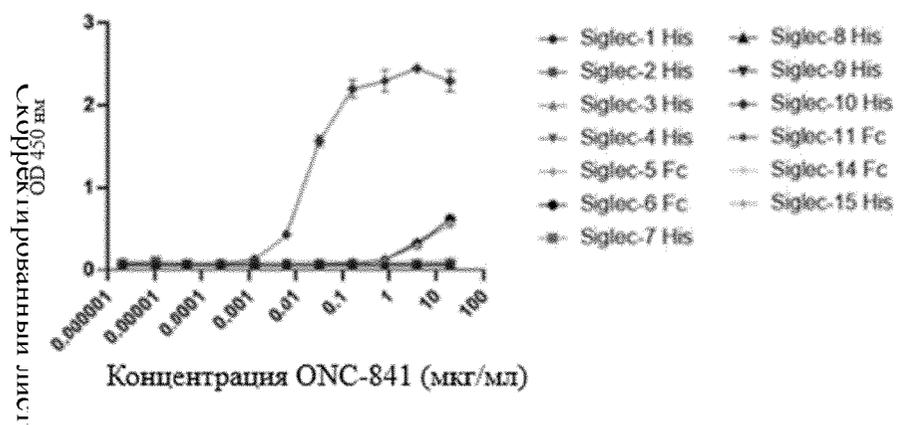
КОМПОЗИЦИИ К SIGLEC И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ



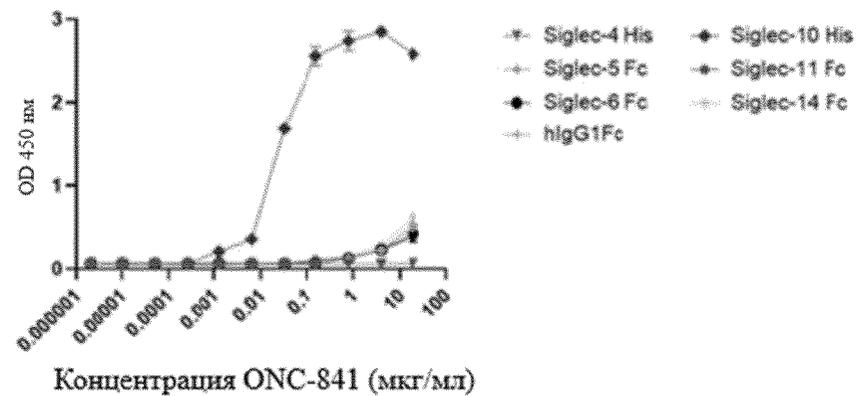
Фиг. 12



Фиг. 13

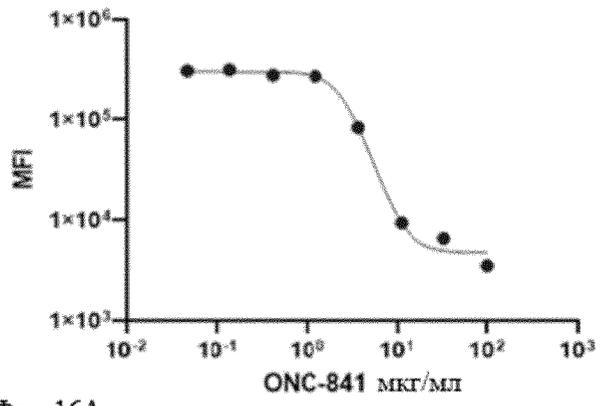


Фиг. 14А

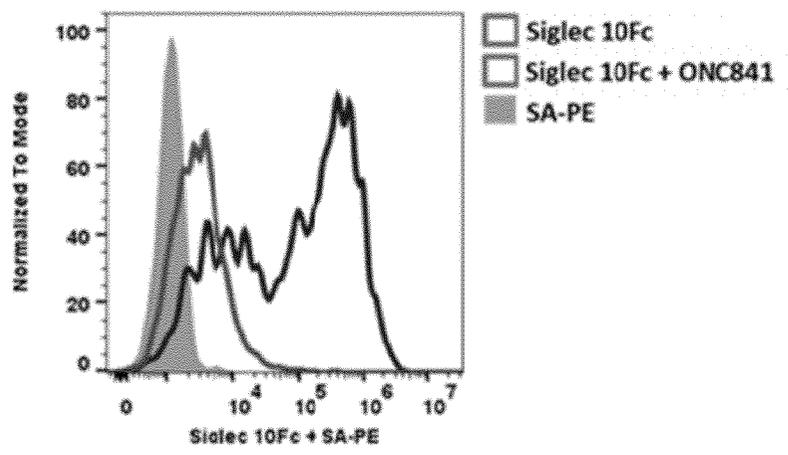


Фиг. 14В

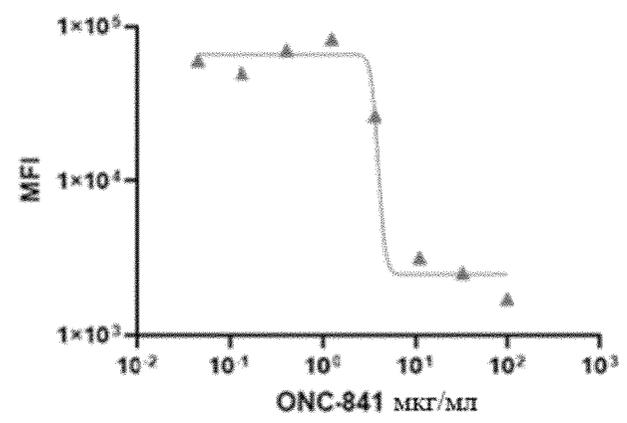
Фиг. 15



Фиг. 16А

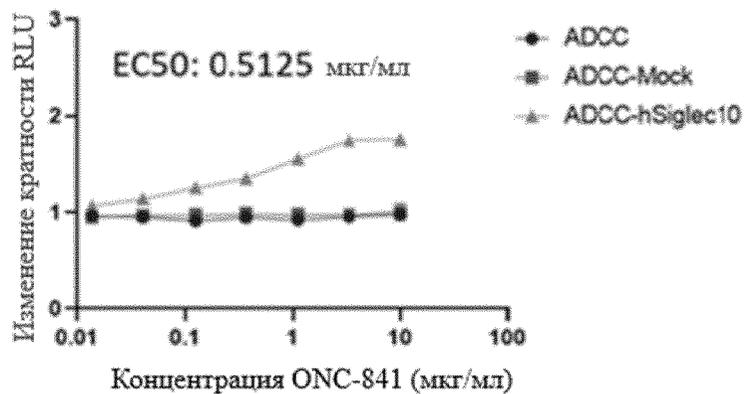


Фиг. 16В



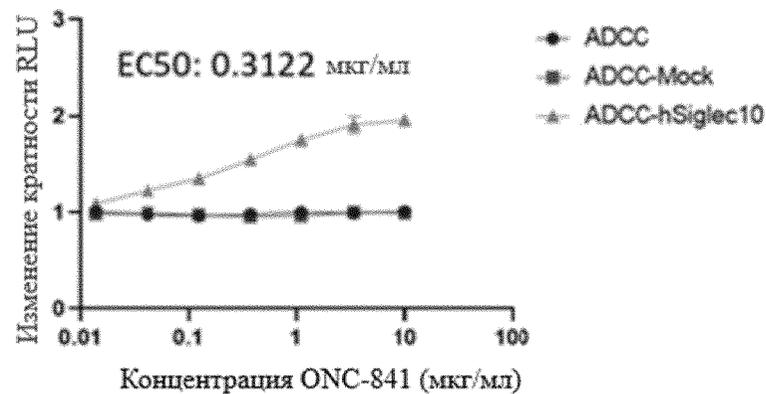
Фиг. 17А

ONC-841 способствует ADCC, зависимой от антитела к CD20



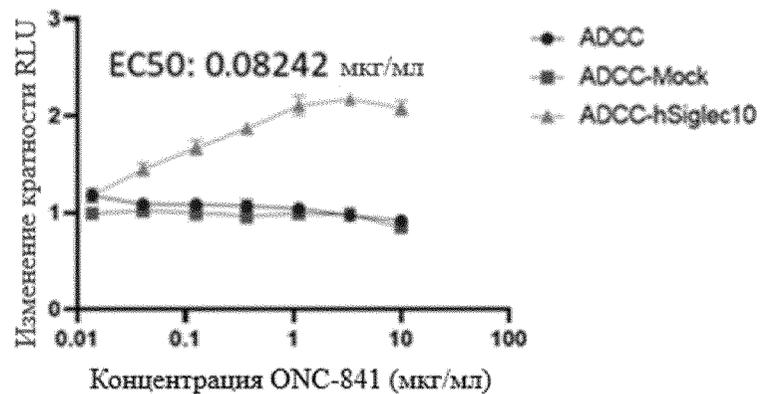
Фиг. 17В

ONC-841 способствует ADCC, зависимой от антитела к EGFR

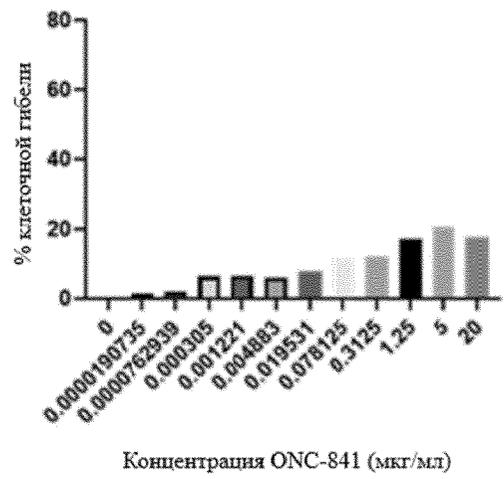


Фиг. 17С

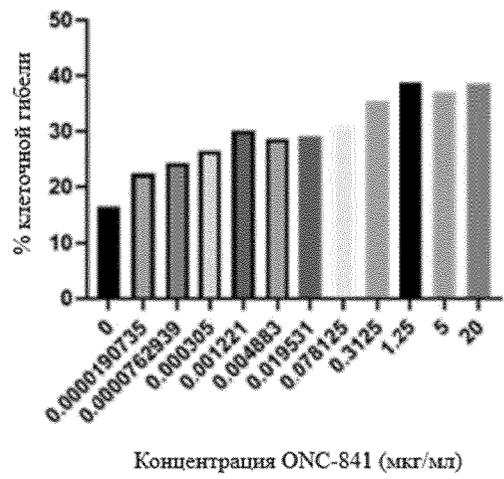
ONC-841 способствует ADCC, зависимой от антитела к CTLA-4



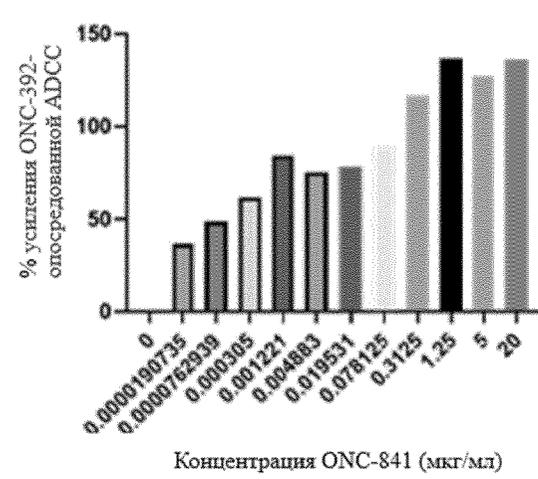
Фиг. 18А



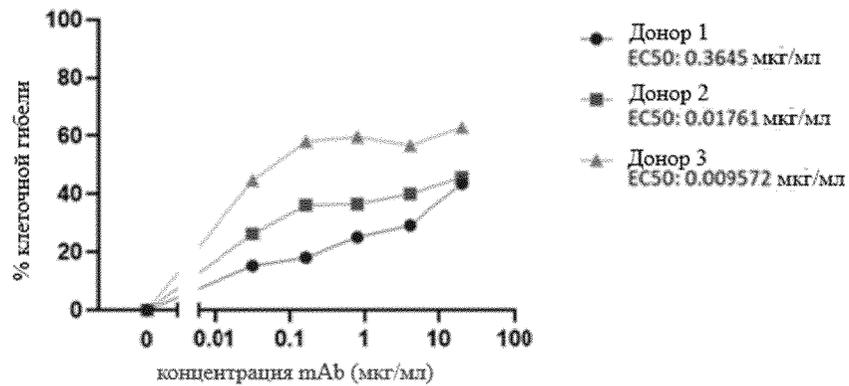
Фиг. 18В



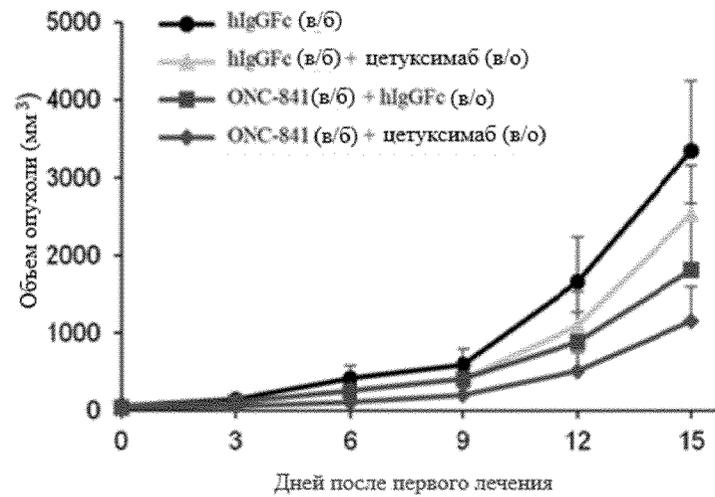
Фиг. 18С



ONC-841 способствует антитело-антителонезависимому уничтожению

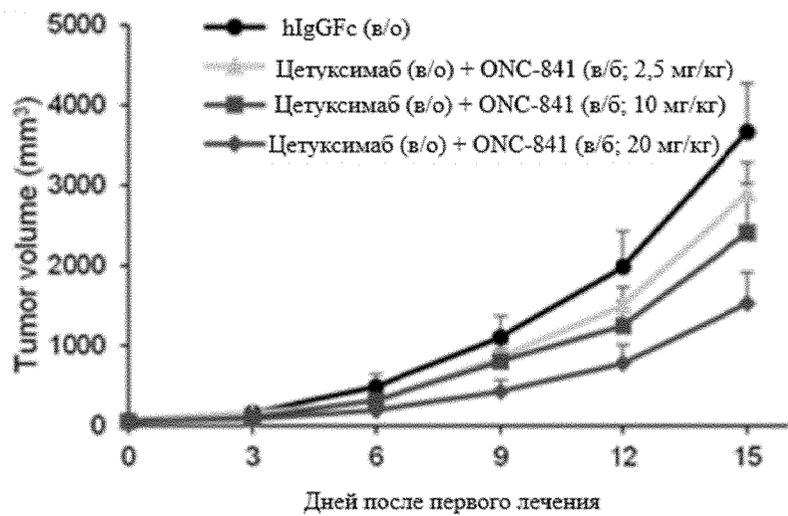


Фиг. 19

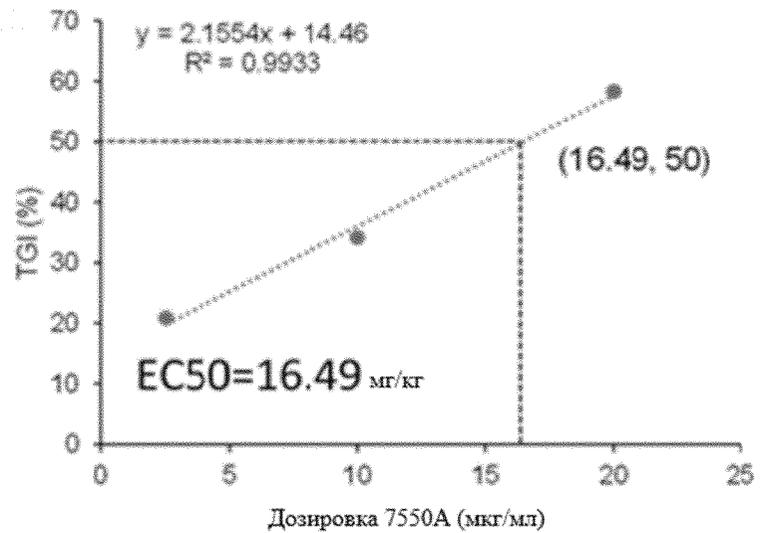


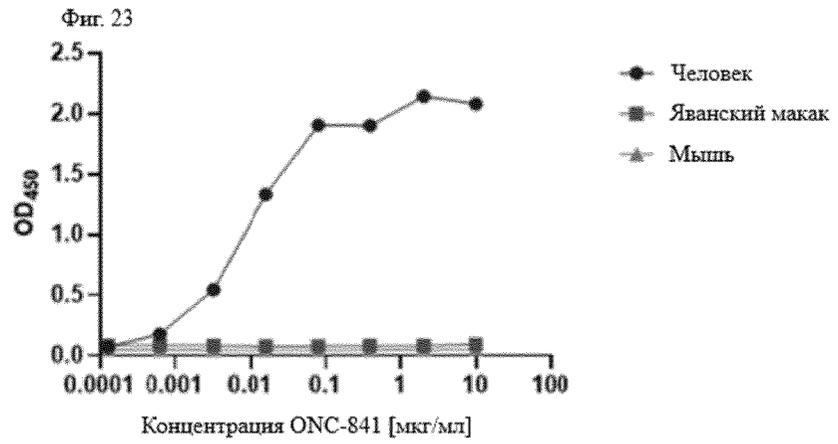
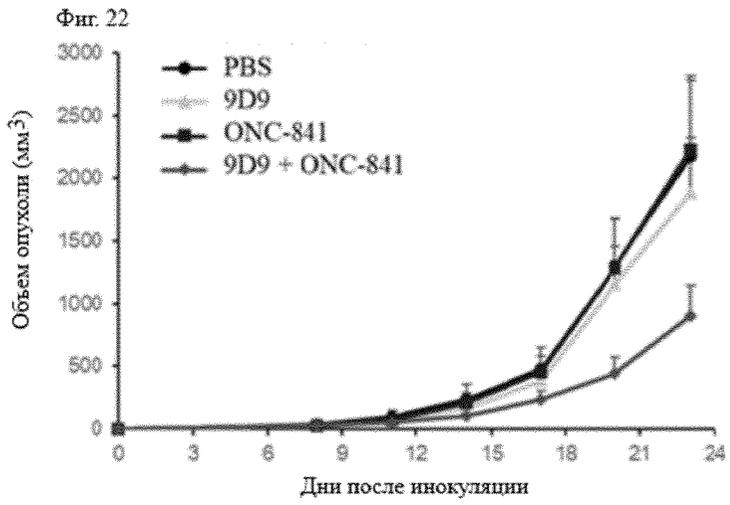
Фиг. 20

Фиг. 21А



Фиг. 21В

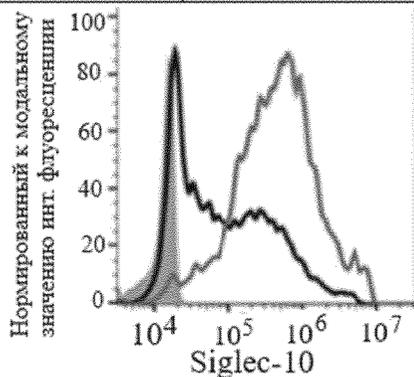




Фиг. 24

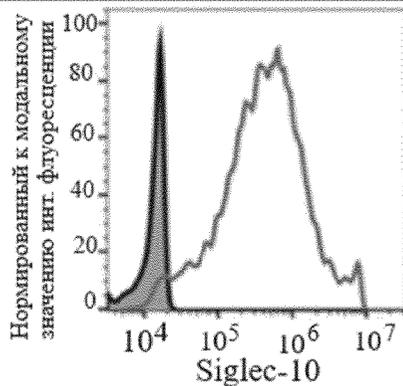
Название набора	Медиана: Композиция-APC-A
Поликлональное антитело	4,48E5
ONC-841	64212
FMO	14075

Человек



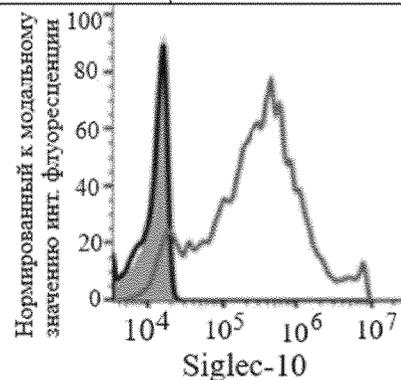
Название набора	Медиана: Композиция-APC-A
Поликлональное антитело	4,14E5
ONC-841	14460
FMO	13824

Резус



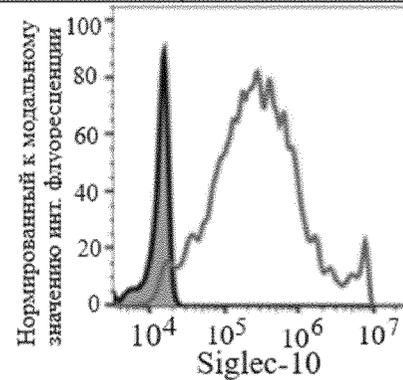
Название набора	Медиана: Композиция-APC-A
Поликлональное антитело	298941
ONC-841	13127
FMO	13039

Яванский макак



Название набора	Медиана: Композиция-APC-A
Поликлональное антитело	260625
ONC-841	14170
FMO	13762

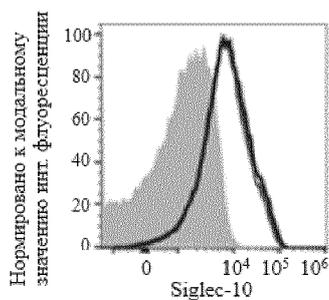
Мармозетка



## КОМПОЗИЦИИ К SIGLEC И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

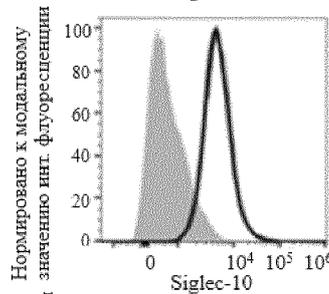
Фиг. 25

Моноциты человека



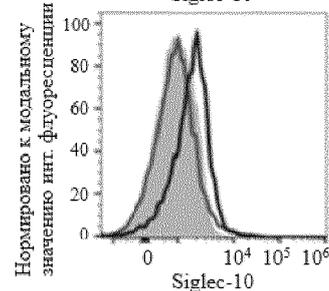
Название набора	Медиана: Композиция- - краситель Alexa 488-A	
CD14hi	ONC-841	7252
CD14hi	ONC-841 + избыток hIgG	6667
CD14hi	FMO	1244

В клетки человека



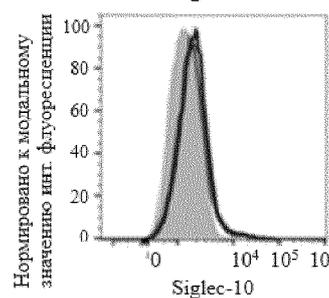
Название набора	Медиана: Композиция- - краситель Alexa 488-A	
В клетки	ONC-841	4650
В клетки	ONC-841 + избыток hIgG	4807
В клетки	FMO	531

Моноциты яванского макака



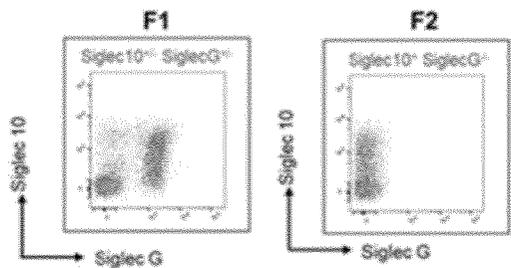
Название набора	Медиана: Композиция- - краситель Alexa 488-A	
CD14hi	ONC-841	1773
CD14hi	ONC-841 + избыток hIgG	888
CD14hi	FMO	901

В клетки яванского макака

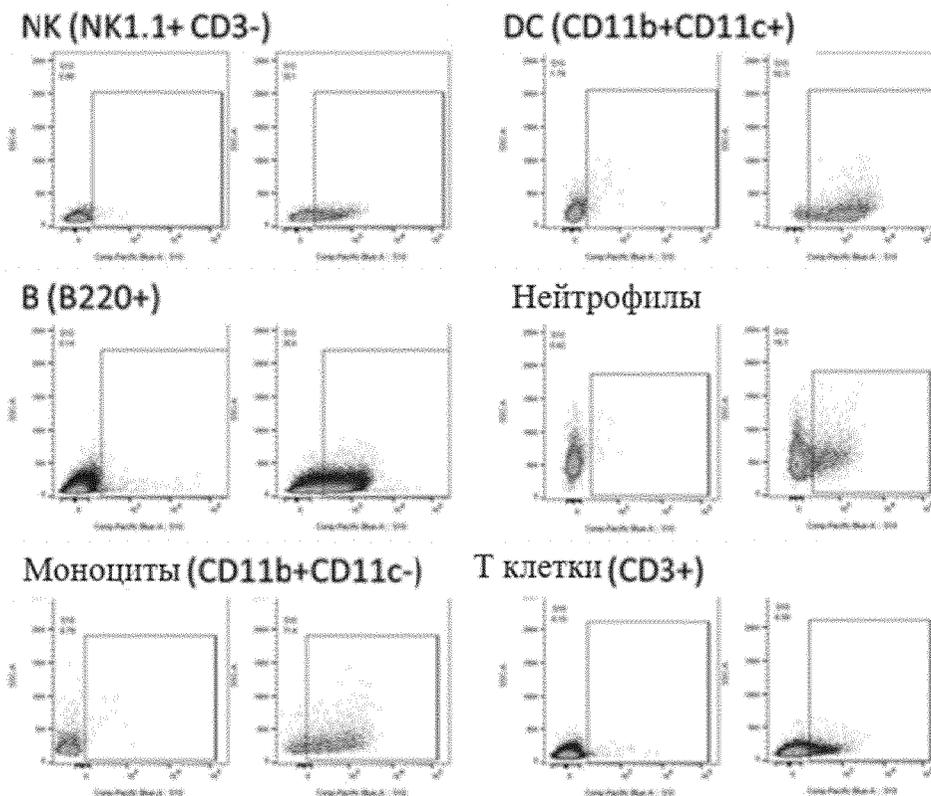


Название набора	Медиана: Композиция- - краситель Alexa 488-A	
В клетки	ONC-841	1842
В клетки	ONC-841 + избыток hIgG	1674
В клетки	FMO	1321

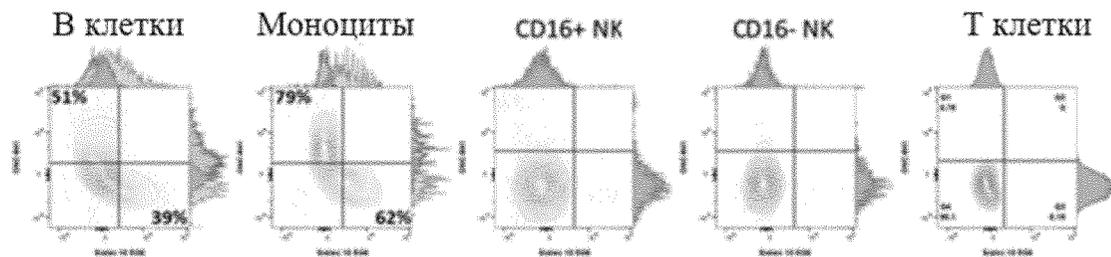
Фиг. 26А

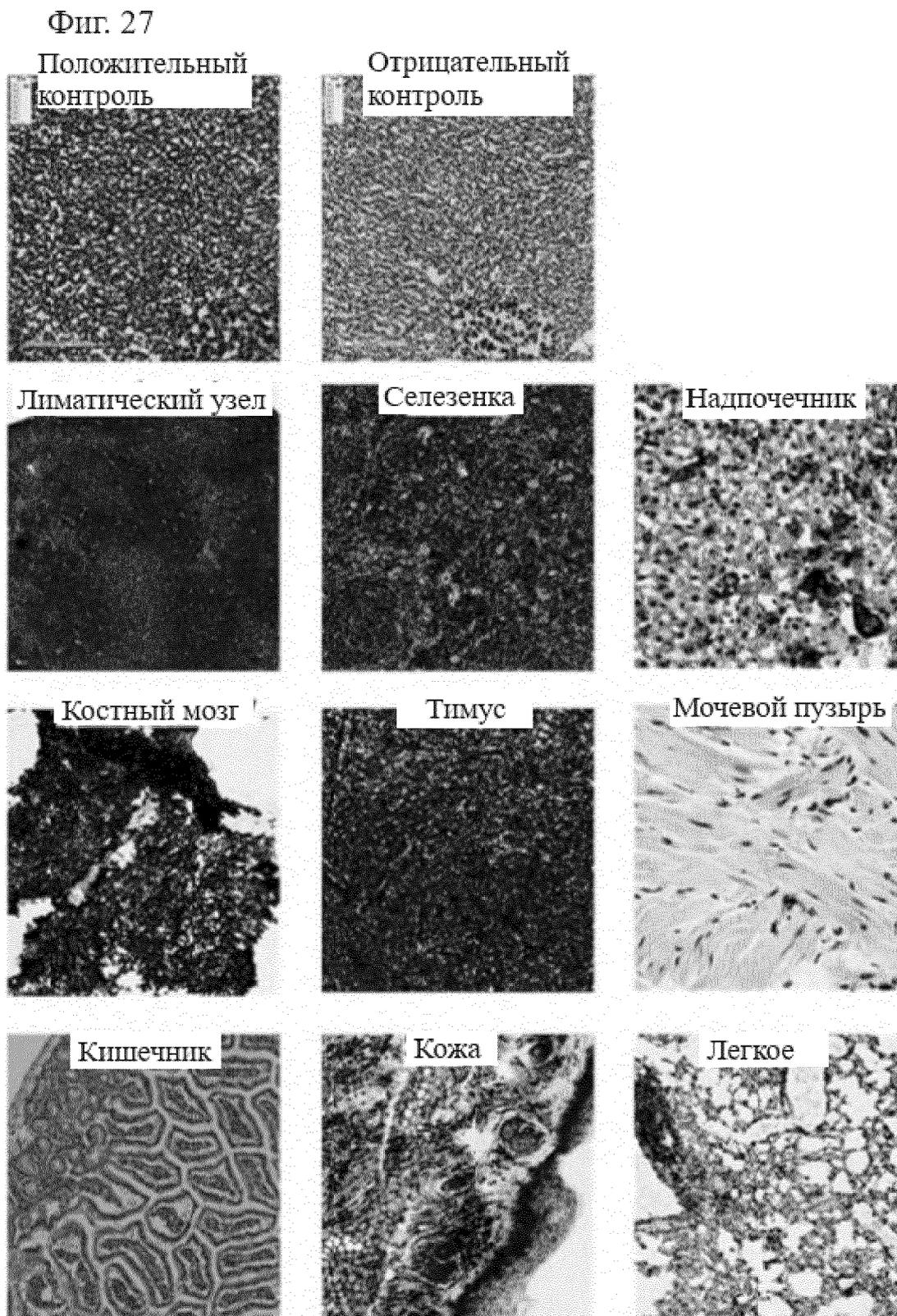


Фиг. 26В

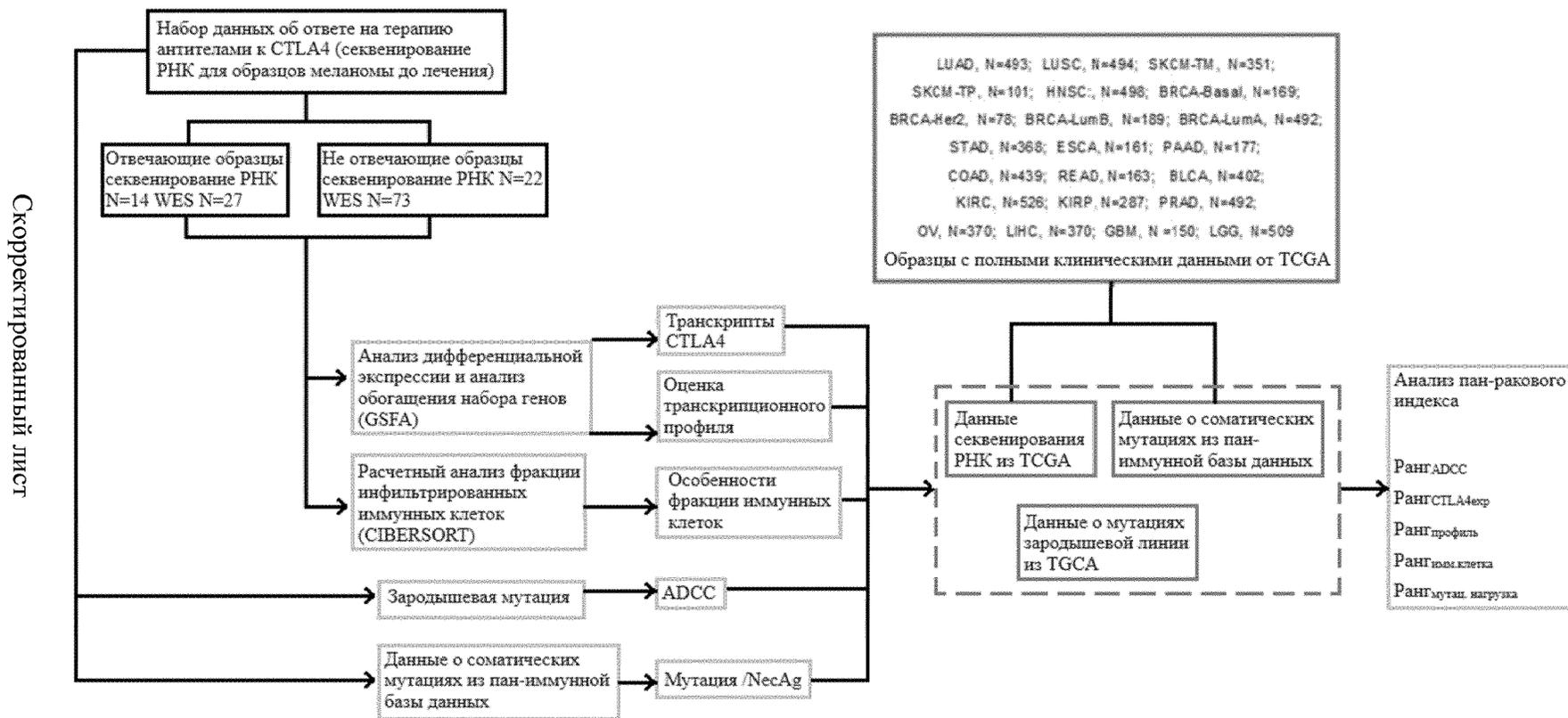


Фиг. 26С





Фиг. 28



Скорректированный лист

КОМПОЗИЦИИ К SIGLEС И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Фиг. 29

Донор 1

