

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491503** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.08.26

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.12.09

(54) **СЛИТЫЕ БЕЛКИ, СОСТОЯЩИЕ ИЗ АНТИТЕЛА И МУТЕИНА**

(31) **2021-0104**

(32) **2021.12.21**

(33) **CU**

(86) **PCT/CU2022/050012**

(87) **WO 2023/116951 2023.06.29**

(71) Заявитель:
**СЕНТРО ДЕ ИНМУНОЛОГИА
МОЛЕКУЛАР (CU)**

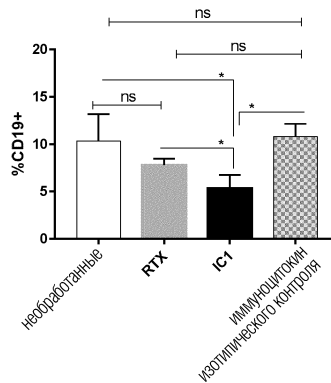
(72) Изобретатель:

**Касадесус Пасос Ана Виктория,
Эрнандес Гарсия Таис, Леон Монсон
Калет (CU)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и иммуноонкологии. Раскрыты слитые белки, содержащие мутеин агониста интерлейкина 2, связанный с иммуноглобулином через линкер. Эти слитые белки полезны при лечении рака, с точки зрения их превосходных свойств по сравнению с другими аналогичными белками на основе по-alpha мутеинов, благодаря сохранению способности антител индуцировать ADCC и CDC и активации NK-клеток и CD8+ клеток без экспансии регуляторных T-клеток. Конвергенция этих свойств приводит к созданию слитых белков с противоопухолевыми свойствами, превосходящими свойства родительских антител и даже их комбинации с по-alpha мутеином.



A1

202491503

202491503

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581632EA/032

СЛИТЫЕ БЕЛКИ, СОСТОЯЩИЕ ИЗ АНТИТЕЛА И МУТЕИНА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и иммуноонкологии. В частности, описаны слитые белки, состоящие из альфа-мутеинов, являющихся агонистами интерлейкина-2 (IL-2), слитых с антителами, специфичными к антигенам, экспрессируемым на опухолях, и способными рекрутировать эффекторные функции.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Иммуноцитокينات (IC), представляющие собой биофармацевтические продукты, состоящие из цитокина, слитого с антителом или фрагментом антитела, являются привлекательными иммунотерапевтическими инструментами для лечения рака, хотя их использование распространено и на другие заболевания.

IL-2 является мощным активатором Т-лимфоцитов и стимулятором IC-клеток и их ADCC (антитело-зависимой клеточной цитотоксичности) (Hank et al. (1990) *J Biol Response Mod.* 9:5-14). По этой причине он стал одним из наиболее часто используемых цитокинов при создании такого рода слитых белков. Действительно, наибольший клинический прогресс был достигнут в тех случаях, когда IL-2 сливали с антителами, специфичными к опухолевым антигенам (Sondel, P.M. and S.D. Gillies. (2012) *Antibodies.* 1(2): 149-171). Несмотря на многообещающие результаты клинических испытаний фазы II (Albertini, M.R. et al. (2012) *Cancer Immunol Immunother.* 61(12): 2261-2271; Danielli, R. et al. (2015) *Cancer Immunol Immunother.* 64(8): 999-1009; Kaufman, L. (2014) *Journal of Clinical Oncology.* 32(15); Lansigan, F. et al. (2016) *Blood.* 128 (22): 620), у этих IC сохраняются побочные эффекты, аналогичные таковым у рекомбинантного IL-2, например, профиль высокой токсичности (Panelli, M. C. et al. (2004) *J Transl Med.* 2(1): 17; Skrombolas, D. and J. G. Frelinger. (2014) *Expert Rev Clin Immunol.* 10(2): 207-217; Klein, C., et al. (2017) *Oncoimmunology.* 6(3): e1277306) и экспансия регуляторных Т-клеток, потенциально способных ингибировать противоопухолевую активность (Ahmadzadeh, M. and S. A. Rosenberg. (2006) *Blood.* 107(6): 2409-2414; Jensen, H. K., et al. (2009) *Clin Cancer Res.* 15(3): 1052-1058; Fournier, P., et al. (2011) *Int J Oncol.* 38(6): 1719-1729; Gubbels, J. A., et al. (2011) *Cancer Immunol Immunother.* 60(12): 1789-1800; Pretto, F., et al. (2014) *Cancer Immunol Immunother.* 63(9): 901-910; Sim, G. C., et al. (2014) *J Clin Invest.* 124(1): 99-110; Lansigan, F. et al. (2016) *Blood.* 128 (22):620). Дополнительное ограничение связано с неоптимальным биораспределением и нацеливанием на опухоль в силу взаимодействия с высокоаффинными рецепторами IL-2 (Klein, C., et al. (2017) *Oncoimmunology.* 6(3): e1277306; Waldhauer, I., et al. (2021) *Mabs.* 13(1): 1913791). Этот сценарий стимулировал разработку IC на основе мутированных вариантов IL-2 (без альфа-мутеинов), которые с рациональной точки зрения конструировали с целью снижения или потери способности IC связываться с альфа-цепью рецептора IL-2 с сохранением способности стимулировать определенные подмножества иммунных клеток, но уменьшением токсичности (Runbeck,

E., et al. (2021) *Antibodies*. (Basel) 10(1)).

Среди этих IC имеется группа, в которую входят IC, созданные на основе IL-2v, характеризующиеся наличием мутаций F42A, Y45A, L72G, которые отменяют связывание с альфа-цепью рецептора IL-2 и способствуют экспансии эффекторных CD8+ Т-клеток и NK-клеток, не вызывая при этом преимущественную пролиферацию регуляторных Т-клеток. Эти слитые белки имеют полноразмерный формат IgG (IgG1), не обладают классическими эффекторными функциями антител, такими как CDC (комплементзависимая цитотоксичность) и ADCC, но при этом являются моновалентными или монофункциональными в отношении цитокина. В эту группу входит IC цергугузмаб амуналейкин (CEA-IL2v), который состоит из антитела, специфичного к канцероэмбриональному антигену (CEA), слитого через C-конец одной из его тяжелых цепей с одной молекулой мутанта IL-2v (Klein, C., et al. (2017) *Oncoimmunology*. 6(3): e1277306).

Этот набор также включает IC, симлукафусп (Simlukafusp) альфа (FAP-IL2v), специфичный к белку активации фибробластов α (Waldhauer, I., et al. (2021) *Mabs*. 13(1): 1913791), и IC анти-PD1-IL2v (Klein, C., et al. (2019) *Cancer Res*. 79(13 Suppl): Abstract nr 1552), который распознает молекулу запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1) (Klein, C., et al. (2019) *Cancer Res*. 79(13 Suppl): Abstract nr 1552).

С другой стороны, имеются сообщения об IC, Erb-Sum-IL2, специфичном к EGFR (рецептору эпидермального фактора роста), который содержит вариант IL-2 (sum-IL-2), характеризующийся мутациями L80F, R81D, L85V, I86Y, I92F. Этот набор изменений по отношению к цитокину дикого типа позволяет снизить связывание и усиливает взаимодействие мутеина с альфа- и бета-цепями рецептора, соответственно. Это обуславливает благоприятное связывание с активированными CD8+ Т-клетками, а не с регуляторными Т-клетками. Этот IC представлен в виде гетеродимерного слитого белка Fc, содержащего sum-IL2 мономер на одном плече и анти-EGFR Fab на другом. Для этого моновалентного IC, в частности в отношении его антигенсвязывающего сайта и цитокина, была описана преимущественная экспансия CD8+ Т-клеток по сравнению с регуляторными Т-клетками в микроокружении опухоли, однако нет никаких упоминаний о способности рекрутировать классические эффекторные функции антитела, такие как ADCC и CDC (Sun, Z., et al. (2019) *Nat Commun*. 10(1): 3874).

На основе ранее описанной информации авторы настоящей заявки создали тип IC для терапии рака, конструкция которого основана на слиянии мутеина-агониста IL-2 (IL2po-alpha) с карбоксильными концами тяжелых цепей IgG антитела, который способен "рекрутировать" эффекторные функции антитела, получая таким образом молекулу, бифункциональную в отношении антигенсвязывающего сайта и цитокина. Удивительным оказалось то, что этот тип молекулы обладает превосходными свойствами по сравнению с другими аналогичными молекулами, созданными на основе po-alpha (без альфа-цепи) мутеинов, за счет сохранения или одновременного улучшения способности антитела осуществлять прямой лизис, проявлять ADCC и/или CDC, а также способности

активировать NK и CD8⁺ T-клетки, не вызывая при этом экспансию регуляторных T-клеток. Конвергенция этих свойств привела к созданию слитых белков с противоопухолевыми свойствами, превосходящими свойства родительских антител и даже их комбинацию с IL2_{no-alpha}. Наконец, формат и состав слитых белков, представленных в настоящем изобретении, не влияют на биологическую активность, связанную с частью, относящейся к вариабельной области антитела. Это справедливо в отношении способности индуцировать апоптоз или индуцировать цитотоксичность независимо от эффекторных функций.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном из вариантов осуществления объектом настоящего изобретения является слитый белок, характеризующийся тем, что он содержит мутеин агониста IL-2 (no-alpha мутеин), связанный с иммуноглобулином изоформа IgG1 или IgG3, и указанный иммуноглобулин распознается Fc-гамма-рецепторами и молекулами каскада комплемента. Этот иммуноцитокин характеризуется тем, что является двухвалентной молекулой в отношении антигенсвязывающего сайта и цитокина. Такой мутеин и указанный иммуноглобулин связаны через линкер. В частности, способность мутеина связываться с альфа-цепью рецептора IL-2 снижена по меньшей мере на два порядка, при этом мутеин связан с иммуноглобулином через карбокси-конец каждой тяжелой цепи указанного иммуноглобулина. В частности, no-alpha мутеин имеет последовательность, выбранную из группы, содержащей SEQ ID NO. 16-43.

В конкретном варианте осуществления линкер состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, содержащей: (Gly₄Ser)_nThrGly (SEQ ID NO. 44) и (Gly₄Ser)_n (SEQ ID NO. 45), где n является количеством повторов фрагмента Gly₄Ser и имеет значение от 1 до 5.

В конкретном варианте осуществления тяжелая цепь иммуноглобулина принадлежит к подклассам человеческого IgG1 или IgG3 и содержит последовательности SEQ ID NO. 11 или 12 или имеет последовательность, идентичную последовательности 11 или 12 на более чем 97%.

В конкретном варианте осуществления легкая цепь иммуноглобулина характеризуется тем, что она принадлежит каппа-изоформу человека и имеет последовательность, соответствующую SEQ ID NO. 9.

В конкретном варианте осуществления легкая цепь иммуноглобулина характеризуется тем, что она принадлежит лямбда-изоформу человека и имеет последовательность, соответствующую SEQ ID NO. 10.

Имуноцитокин по настоящему изобретению дополнительно характеризуется тем, что он распознает опухолевые антигены, которые включают: CD20, CD19, NGcGM3, PDL1, Her1, Her2 и Epcam.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат представленные в настоящем описании слитые белки в диапазоне концентраций от 0,5 мг/мл до 20 мг/мл и

фармацевтически приемлемый носитель.

Помимо этого, настоящее изобретение относится к применению слитых белков, раскрытых в настоящем изобретении, при лечении рака. Оно также относится к применению молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих слитые белки по настоящему изобретению, для подкожной, внутримышечной или внутриопухоловой инъекции.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения нуждающегося в этом субъекта, включающему подкожное, внутривенное, внутрикожное, внутримышечное или внутривнутрибрюшинное введение фармацевтических композиций по настоящему изобретению в диапазоне доз от 0,01 мг/кг до 0,6 мг/кг веса. В частности, выполняют от одного до 30 циклов введения фармацевтической композиции от одной до трех доз в неделю, где время между циклами составляет от семи дней до восьми недель.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Описание IC

В одном из вариантов осуществления объектом настоящего изобретения являются слитые белки или IC на основе мутеина агониста IL-2 без альфа-цепи (no-alpha мутеина), которые обладают по меньшей мере на два порядка более низким сродством связывания с альфа-цепью рецептора (Leon et al. (2018) *Semin Oncol.* 45(1-2): 95-104), связанные с тяжелыми цепями иммуноглобулина, со способностью рекрутировать классические эффекторные функции антител, с получением таким образом молекулы, бифункциональной в отношении антигенсвязывающего сайта и цитокина.

Термин «слитый белок», используемый в настоящем изобретении, относится к полипептиду, который содержит аминокислотную последовательность антитела и аминокислотную последовательность гетерологичного полипептида или белка, т.е. полипептида или белка, который обычно не является частью антитела, соединенного через пептидный линкер.

Термин иммуноцитокин (IC), используемый в настоящем описании, относится к формату антитела, которое связано с цитокином. Такой цитокин слит с антителом посредством линкера на карбокси-конце тяжелой цепи.

Термины «слитый белок» и «IC» используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо.

Мутеины, входящие в состав IC, описанных в настоящем изобретении, модифицированы путем снижения по меньшей мере на два порядка их способности связываться с высокоаффинным рецептором, конститутивно экспрессируемым на регуляторных T-клетках, в частности с альфа-цепью. Слитые белки по настоящему изобретению обладают свойством, которым не обладают другие IC на основе no-alpha мутеина, а именно способностью активировать NK и CD8⁺ T-клетки, не вызывая экспансию регуляторных T-клеток, при этом рекрутируя эффекторные функции, такие как прямой лизис, ADCC и/или CDC. Эти мутеины называются в настоящем описании no-alpha мутеины.

В частности, относящаяся к антителу часть IC представляет собой человеческий иммуноглобулин подкласса IgG1 или IgG3 с аминокислотной последовательностью, соответствующей природным или модифицированным аллельным вариантам IgG1 или IgG3, которые более чем на 97% идентичны вариантам, идентифицированным как SEQ ID NO. 11 и SEQ ID NO. 12, соответственно, и которые связываются с Fcγ-рецепторами и молекулами комплемента. Следовательно, они совместимы с активностью ADCC и CDC. Константная область легкой цепи антител, образующая часть слитых белков по настоящему изобретению, принадлежит человеческому каппа- или лямбда-изотипу, и их последовательности представлены в SEQ ID NO. 9 и SEQ ID NO. 10. С другой стороны, в части, относящейся к антителу, переменные области могут быть мышинными, гуманизированными или полностью человеческими и могут происходить из иммуноглобулинов, способных индуцировать ADCC и CDC. Переменные области антитела, являющегося частью IC по настоящему изобретению распознают антигены, экспрессируемые в опухолях человека, такие как: CD20, CD19, ганглиозид NGcGM3, PDL1, Her1, Her2 и Epcam.

No-alpha мутеины, описанные в настоящем изобретении, присоединены к карбоксильному концу каждой тяжелой цепи антитела посредством гибкого линкерного пептида $(Gly_4Ser)_nThrGly$ (SEQ ID NO. 44) или $(Gly_4Ser)_n$ (SEQ ID NO 45), где n представляет собой количество повторов фрагмента Gly_4Ser , и обладают способностью преимущественно вызывать экспансию CD8+ и NK-эффекторных Т-клеток в ущерб экспансии регуляторных Т-клеток.

No-alpha мутеины могут быть любыми мутеинами, представленными SEQ ID NO. 16-43, ранее раскрытыми в патенте США 9,206,243 B2 и патенте США 2019/0315826 A1, или IL-2v, ранее раскрытым в патенте WO2012107417 (SEQ ID NO. 40), и его вариантами, представленными SEQ ID NO: 41-43. Мутеины, представленные SEQ ID NO. 16-21, созданные в Центре молекулярной иммунологии, являются агонистами IL-2, и их способность связываться с высокоаффинным рецептором, конститутивно экспрессируемым на регуляторных Т-клетках, снижена по меньшей мере на два порядка. В результате этих модификаций относительно IL-2 дикого типа они способны обеспечивать преимущественно экспансию популяции NK-клеток и CD8+ Т-клеток памяти, обладают агонистическим действием нативного IL-2 и демонстрируют более высокий противоопухолевый эффект по сравнению с нативным IL-2 на животных моделях (US 920624309). Мутеины IL2no-alpha K35E, IL2no-alpha K35Q и IL2no-alpha K35D (SEQ ID NO. 22-39) представляют собой варианты IL2no-альфа, полученные методом, описанным в патенте США 9206243, которые содержат точечную мутацию, способствующую экспрессии в различных системах хозяина и совместимую с профилем взаимодействия no-alpha мутеина с разными цепями рецептора IL-2 (Rojas, G., et al. (2015) J Mol Recognit. 28(4): 261-268). Мутант IL-2v и его варианты (SEQ ID NO. 40-43) содержат мутации относительно IL-2 дикого типа, которые предотвращают связывание с альфа-цепью рецептора, предотвращая таким образом преимущественную пролиферацию

регуляторных Т-клеток и способствуя пролиферации эффекторных TCD8⁺ и NK-клеток (Klein, C., et al. (2017) Oncoimmunology. 6(3): e1277306).

Таким образом, формат слитых белков по настоящему изобретению гарантирует сохранение или улучшение классических эффекторных функций антител (прямой лизис, ADCC и CDC), которые совпадают с конкретными иммуномодулирующими свойствами по- α мутеинов, заключающимися в индукции преимущественной пролиферации эффекторных клеток по отношению к регуляторным Т-клеткам.

Фармацевтические композиции

Было обнаружено, что IC, являющиеся объектом настоящего изобретения, можно использовать в качестве активного ингредиента в составе различных соответствующих фармацевтических композиций, содержащих также фармацевтически приемлемый носитель. Концентрации активного ингредиента в указанных фармацевтических композициях находятся в диапазоне от 0,5 до 20 мг/мл, предпочтительно от 1 до 10 мг/мл, либо активный ингредиент может быть лиофилизированным.

Фармацевтически приемлемые носители включают, без ограничения, физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор с нейтральным pH и др. Композиции по настоящему изобретению могут включать другие буферные агенты, диспергирующие агенты и нетоксичные инертные вещества, подходящие для доставки пациенту. Композиции могут представлять собой растворы, подходящие для введения, и обычно являются стерильными и не содержат нежелательных частиц.

Терапевтическое применение и лечение

Новизна IC, описанных в настоящем изобретении, состоит в конвергенции бифункционального слитого белка на основе иммуноглобулина IgG1 или IgG3 и мутеина без альфа-цепи, способности обеспечивать преимущественно пролиферацию и активацию эффекторных клеток, таких как TCD8⁺ памяти и NK, а не регуляторных Т-клеток, а также в сохранении или усилении эффекторных функций, типичных для антител, таких как прямой лизис, ADCC и CDC. Эта конвергенция не описана ни для одного IC на основе по- α мутеинов, описанных на сегодняшний день. Кроме того, наличие двух молекул по- α мутеина IL-2 в одной молекуле IC позволяет увеличить присущую им иммуномодулирующую активность слитого белка. Это дополнительно способствует потенциальному снижению токсичности из-за отсутствия взаимодействия с высокоаффинными рецепторами на эндотелиальных клетках. Fc-область обеспечивает возможность их получения с высокой степенью чистоты с помощью аффинной хроматографии с белком А, что позволяет вводить их в виде растворимого белка различными путями (подкожно, внутривенно, внутривожно, внутримышечно, внутривентриально), увеличивая при этом период полувыведения этих агентов из кровотока и, в свою очередь, терапевтическую эффективность.

IC по настоящему изобретению можно вводить субъектам (эти субъекты являются позвоночными животными, такими как люди), предпочтительно подкожно или

внутривенно, в диапазоне доз от 0,01 мг/кг веса до 0,6 мг/кг веса, что соответствует общему количеству от 0,7 до 42 мг, соответственно. Введение IC пациенту можно осуществлять циклами от одного до 30 с частотой введения от одного до трех раз в неделю. Время между циклами введения может составлять от семи дней до восьми недель.

Кроме того, стратегии доставки этих IC, используемые в настоящем изобретении, также могут включать инъекцию продукта с помощью подходов генной терапии, такую как инъекция мРНК и трансдуцирующих частиц, кодирующих их.

Учитывая иммуномодулирующие свойства этих молекул, помимо усиления антигенспецифического противоопухолевого ответа, способность к системной иммуностимуляции позволяет комбинировать их с терапевтическими средствами, направленными на другие мишени у пациентов с различными типами рака. Их также можно использовать в комбинации с другими иммуномодуляторами и классическими методами онкотерапии, такими как химиотерапия и лучевая терапия. В частности, биофармацевтические средства этого типа можно использовать для лечения В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний, таких как неходжкинская лимфома (NHL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL), лимфома Беркитта (BL), мантийно-клеточная лимфома (MCL), фолликулярная лимфома, индолентные лимфомы, лимфома маргинальной зоны (MZL), критическая лимфоплазмочитарная лимфома (PL), В-клеточный лимфопролиферативный синдром, солидные опухоли поздней стадии, опухоли головы и шеи, опухоли шеи, головного мозга, глиомы у взрослых и детей, рак поджелудочной железы, пищевода, немелкоклеточный рак легкого и опухоли носоглотки.

Таким образом, вышеупомянутые IC предназначены для создания терапевтического фронта, усиливающего защитное действие антител и IL-2, используемых в настоящее время при лечении рака. Этот эффект может быть связан с генерацией слитых белков, которые могут одновременно обладать активностью ADCC и CDC, важными противоопухолевыми механизмами и преимущественно обеспечивать пролиферацию цитотоксических Т- и NK-клеток, а не регуляторных Т-клеток, приводя к более эффективному противоопухолевому иммунному ответу и, следовательно, к замедлению роста опухоли и более высокой выживаемости получающих лечение индивидуумов. Кроме того, более низкие уровни токсичности, гарантированные используемыми мутеинами IL-2, увеличивают вероятность успеха по сравнению с терапией цитокинами дикого типа. Все это приводит к увеличению продолжительности и качества жизни получивших лечение пациентов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

Фиг. 1. Представление IgG-IL2no-alpha IC. (A) Схема (B) Формат.

Фиг. 2. Оценка экспрессии IC в супернатанте трансдуцированных клеток CHO (A, E, F) и в суспензии, временно трансфицированных клеток HEK293T (B, C, D).

Фиг. 3. Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) анти-CD20-IgG1h-IL2no-alpha (IC1) в нередуцирующих (A) и редуцирующих (B)

условиях.

Фиг. 4. Иммуноидентификация IC1 и простых контролей с помощью вестерн-блоттинга со специфическим антителом к человеческому IgG в нередуцирующих (А) и редуцирующих (В) условиях, и в нередуцирующих условиях со специфическим антителом к IL-2 (С).

Фиг. 5. Анализ IC1(А) и ритуксимаба (В) методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC) на колонке TSK gel 3000.

Фиг. 6. SDS-PAGE анти-CD20-IgG2a-IL2no-alpha IC (IC7) в нередуцирующих (А) и редуцирующих (В) условиях.

Рисунок 7. Иммуноидентификация IC7 и простых контролей с помощью вестерн-блоттинга со специфическим антителом к IL-2 в нередуцирующих условиях.

Фиг. 8. Анализ IC7 методом SEC-HPLC на колонке TSKgel 3000.

Фиг. 9. SDS-PAGE анти-NGcGM3-IL2no-alpha IC (IC8) в нередуцирующих (А) и редуцирующих (В) условиях.

Фиг. 10. Иммуноидентификация IC8 и простых контролей с помощью вестерн-блоттинга со специфическим антителом к IL-2 в нередуцирующих условиях.

Фиг. 11. Анализ SEC-HPLC IC8 (1) и 14F7m (2) на колонке TSKgel 3000.

Фиг. 12. Иммуноидентификация IC4 и простых контролей с помощью вестерн-блоттинга со специфическим антителом к человеческому IgG в нередуцирующих условиях.

Фиг. 13. Распознавание EL4-huCD20+ клеточной линии антителом RTX и IC1 (А) и мышинным антителом RTX-IgG2a и IC7 (В).

Фиг. 14. Распознавание молекулы CD20 на опухолевых клетках молекулой IC1 (А). Отношение средней интенсивности флуоресценции (MFI) RTX и IC1 к MFI конъюгата (В).

Фиг. 15. Индукция CDC, вызванная IC1.

Фиг. 16. Индукция апоптоза, вызванная IC1. (А) Ранний апоптоз, (В) апоптоз (сумма всех аннексин-V+ клеток) и (С) активация каспазы 3 в Ramos клетках, обработанных IC1.

Фиг. 17. Индукция ADCC, вызванная IC1 (А). Истощение В-клеток (CD19+) *in vitro* у здорового донора (В) и пациента с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (С), вызванное IC1.

Фиг. 18. Уровень распознавания NGcGM3 ганглиозида молекулой IC8, измеренный с помощью (А) ELISA и (В) проточной цитометрии.

Фиг. 19. Индукция комплемент-независимой цитотоксичности, вызванная IC8.

Фиг. 20. Активность типа IL-2no-alpha (А) у IC1 и (В) IC7, и IC8, измеренная с помощью анализа пролиферации клеточной линии CTLL-2. Значения концентрации относятся к no-alpha IL-2 части, содержащейся в каждом образце.

Фиг. 21. Измерение индуцированных IC1 поверхностных маркеров активации NK-клеток: (А) CD16, (В) CD69 и (С) CD107a.

Фиг. 22. Противоопухолевый эффект IC7 в модели EL4-huCD20. (А) Сравнение с

высокими дозами родительского антитела. (B) Сравнение с комбинацией родительского антитела и мутеина IL2no-alpha (в эквимоллярных количествах).

Фиг. 23. Противоопухолевый эффект IC1 в модели EL4-huCD20: (A) Сравнение с высокими дозами ритуксимаба, (B) сравнение с эквимоллярными количествами ритуксимаба и (C) длительный защитный эффект IC1 у выживших животных, повторно зараженных опухолевыми клетками. Противоопухолевый эффект IC8 относительно эквимоллярных количеств антитела и мутеина IL2no-alpha в модели 3LL-D122 (D).

Фиг. 24. Иммуномодуляция *in vivo*, индуцированная IC1, у мышей C57BL/6 с опухолью EL4-hCD20. (A-B) Абсолютное количество (A) CD8+ Т-клеток, (B) NK1.1+CD3-клеток, (C-D) доля клеток (C) FOXP3+CD4+/CD8+, (D) FOXP3+CD4+/NK1.1+ CD3+ и (E) абсолютное количество FOXP3+CD4+ Т-клеток.

Настоящее изобретение описано более подробно со ссылкой на приведенные ниже примеры и чертежи. Однако эти примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Создание и получение IC

Создавали человеческие IC, состоящие из двухвалентных молекул в отношении антигенсвязывающего сайта и бифункциональных в отношении части, относящейся к мутированному IL-2, на основе полноразмерного IgG. В частности, IC1, IC2, IC3, IC4, IC5 и IC6 соответствовали формату, подобному представленному на фиг. 1 (A-B).

IC1 и IC2 специфичны к молекуле CD20 человека, и последовательности их переменных областей аналогичны последовательностям ритуксимаба, ведущего моноклонального антитела в пассивной терапии В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний (Pierpont, T. M., et al. (2018) *Front Oncol* 8: 163; Sehn, L. H. & G. Salles. (2021) *N Engl J Med.* 384(9): 842-858). Легкая цепь каждого из этих IC образована из переменной области VL (SEQ ID NO. 1) и константной области С каппа-цепи человека (SEQ ID NO. 9). Тяжелая цепь состоит из переменной области VH последовательности SEQ NO. 2, за которой следует константная область человеческого IgG1 (SEQ ID NO. 11), содержащая слитый с карбоксильным концом линкерный пептид (Gly₄Ser)₃ThrGly (SEQ ID NO. 44), за которым следует молекула IL2no-alpha (SEQ ID NO. 21 для IC1 и SEQ ID NO 37 для IC2). IC такой специфичности, содержащие мутированные варианты IL-2, до настоящего времени не были описаны.

IC3 и IC4 специфичны к ганглиозиду NGcGM3, который отсутствует или присутствует лишь в небольших количествах в нормальных тканях (Varki, A. (2009) *Glycosonj J* 26(3): 231-245). Последовательности их переменных областей аналогичны последовательностям антитела 14F7hT, которое в настоящее время проходит клинические испытания для лечения солидных опухолей поздней стадии (EC-PCRDEC168). Легкая цепь обоих IC образована переменной областью VL (SEQ ID NO. 3) и константной областью С каппа-цепи человека (SEQ ID NO. 9). Тяжелая цепь состоит из переменной области VH последовательности SEQ ID NO. 4, за которой следует константная область

человеческого IgG1 (SEQ ID NO. 11), карбоксильный конец которой слит с линкерным пептидом (Gly₄Ser)₃ThrGly (SEQ ID NO. 44), за которым следует молекула IL2no-alpha (SEQ ID NO. 21 для IC3 и SEQ ID NO 37 для IC4). На сегодняшний день не получены IC ни на основе этого антитела, ни на основе любого другого антитела, специфичного к ганглиозиду NGcGM3.

IC5 и IC6 распознают рецептор EGFR, и последовательности их переменных областей соответствуют последовательностям антитела нимотузумаб (US 5891996 B2), широко используемого в терапии опухолей эпителиального происхождения (Crombet T, et al. (2002) *Int J Cancer* 101(6):567-75 Ramos-Suzarte M et al (2012) *Cancer Biol Ther* 13(8):600-5 Suarez Martinez G and BencomoYanes A. (2014) *Biotecnol APL [Internet]* 31(2):159-167, Crombet T. (2014) *Handbook of therapeutic antibodies*. 1679-94). Легкая цепь состоит из переменной области VL (SEQ ID NO: 5) и константной области C каппа-цепи человека (SEQ ID NO: 9). Тяжелая цепь состоит из переменной области VH последовательности SEQ ID NO. 6, за которой следует константная область человеческого IgG1 (SEQ ID NO. 11), карбоксильный конец которой слит с линкерным пептидом (Gly₄Ser)₃ThrGly (SEQ ID NO. 44), за которым следует молекула IL2no-alpha (SEQ ID NO. 21, для IC5, SEQ ID NO: 37 для IC6).

Два других IC, двухвалентных в отношении антигенсвязывающего сайта и бифункциональных в отношении части, относящейся к мутированному IL-2, создавали параллельно на основе формата мышиного полноразмерного IgG (фиг. 1A-B).

IC7 является специфичным к молекулам человеческого CD20, а последовательности его переменных областей аналогичны последовательностям ритуксимаба. Легкая цепь состоит из переменной области VL (SEQ ID NO. 1) и константной области C мышинной каппа-цепи (SEQ ID NO. 13). Тяжелая цепь состоит из переменной области VH с последовательностью SEQ ID NO. 2, за которой следует константная область мышинного IgG2a (SEQ ID NO. 15), содержащая слитый с карбоксильным концом линкерный пептид (Gly₄Ser)₃ThrGly (SEQ ID NO. 44), за которым следует молекула IL2no-alpha (SEQ ID NO. 21).

IC8 является специфичным к ганглиозиду NGcGM3. Последовательности его переменных областей аналогичны последовательностям антитела 14F7 (патент США 6429295 B1), мышинного предшественника 14F7hT. Легкая цепь образована переменной областью VL (SEQ ID NO: 7) и константной областью C мышинной каппа-цепи (SEQ ID NO: 13). Тяжелая цепь состоит из переменной области VH с последовательностью SEQ ID NO. 8, за которой следует константная область мышинного IgG1 (SEQ ID NO. 14), содержащая слитый с карбоксильным концом линкерный пептид (Gly₄Ser)₃ThrGly (SEQ ID NO. 44), за которым следует молекула IL2no-alpha (SEQ ID NO. 21).

Для получения человеческого IC гены, кодирующие переменную область легкой цепи антител ритуксимаб, нимотузумаб или 14F7hT, клонировали в вектор pFUSE (Ckh), содержащий ген константной области C человеческой каппа-цепи, таким образом собирая гены, кодирующие соответствующие легкие цепи.

Затем сегмент гена, кодирующий мутеин IL2no-alpha (SEQ ID NO. 21 или SEQ ID NO. 37), слитый по N-концу с линкерным пептидом $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3\text{ThrGly}$ (SEQ ID NO. 44), амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и затем EcoRV/XbaI клонировали в вектор pFUSE (IgG1h), предварительно модифицированный для вставки сайта EcoRV. В полученные генетические конструкции EcoRI/NheI клонировали соответствующий ген VH, предварительно амплифицированный с помощью ПЦР.

Гены тяжелой и легкой цепей IC1 (анти-CD20) клонировали независимо в вектор pLV-CMV-IRES-Neo для создания соответствующих векторов-переносчиков, с помощью которых получали лентивирусные трансдуцирующие частицы. Клетки CHO-K1 трансдуцировали ранее полученными лентивирусными частицами для создания рекомбинантных стабильных клонов. Слитый белок IC1 (анти-CD20) детектировали в супернатанте трансдуцированных клеток CHO-K1 с помощью ELISA, специфического к человеческой области Fc (фиг. 2A).

IC2 (анти-CD20) получали путем временной экспрессии, используя плазмидную ДНК, соответствующую генетическим конструкциям, кодирующим легкие и тяжелые цепи, в векторах pFUSE (фиг. 2B).

IC3 и IC4 (анти-NGcGM3) получали путем временной экспрессии, используя плазмидную ДНК, соответствующую генетическим конструкциям, кодирующим тяжелые и легкие цепи, в векторах pFUSE. Клетки HEK293T временно трансфицировали этими генетическими конструкциями, и экспрессию IC проверяли через 7 дней с помощью ELISA, специфического к человеческой Fc-области (фиг. 2C).

IC5 и IC6 (анти-EGFR) получали путем временной экспрессии в клетках HEK293T, используя плазмидную ДНК, соответствующую генетическим конструкциям, кодирующим тяжелые и легкие цепи, в векторах pFUSE. Супернатанты клеток HEK293T, выращенных в суспензии и трансфицированных PEI, оценивали с помощью ELISA, специфического к человеческой Fc-области, и подтверждали наличие слитых белков (фиг. 2D).

Для получения мышинных IC гены, кодирующие переменную область легкой цепи антител ритуксимаб или 14F7, клонировали в вектор pFUSE (Ckm), содержащий ген константной области C мышинной каппа-цепи, и, таким образом, конструировали гены, кодирующие соответствующие легкие цепи.

В случае IC7 (анти-CD20) ген тяжелой цепи получали путем сборки методом ПЦР генных сегментов, кодирующих область VH ритуксимаба (SEQ ID NO. 2), область CH мышинного IgG2a (SEQ ID NO. 15), соединяющий пептид $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3\text{ThrGly}$ (SEQ ID NO: 44) и молекулу IL2no-alpha (SEQ ID NO: 21). Полученные ген тяжелой цепи и ген легкой цепи, содержащиеся в векторе pFUSE, амплифицировали с помощью ПЦР и независимо клонировали в вектор pLV-CMV-IRES-Neo. Полученные таким образом векторы-переносчики использовали для создания лентивирусных частиц, которые в дальнейшем использовали для трансдукции клеток CHO-K1. С помощью ELISA, специфического к мышинной Fc-области, в супернатанте трансдуцированных клеток CHO-K1 детектировали

слитый белок IC7 (анти-CD20) (фиг. 2E).

Для IC8 (анти-NGcGM3) сегмент гена, кодирующий мутеин IL2no-alpha (SEQ ID NO. 21), слитый по N-концу с линкерным пептидом (Gly₄Ser)₃ThrGly, амплифицировали с помощью ПЦР и EcoRV/XbaI клонировали в вектор pFUSE (мышиный IgG1), предварительно модифицированный для встраивания сайта EcoRV. В полученную генетическую конструкцию EcoRI/NheI клонировали ген VH14F7, предварительно амплифицированный методом ПЦР. Гены тяжелой цепи и легкой цепи, содержащиеся в векторах pFUSE, амплифицировали с помощью ПЦР и независимо клонировали в вектор pLV-CMV-IRES-Neo. Полученные таким образом векторы-переносчики использовали для создания лентивирусных частиц, которые в дальнейшем использовали для совместной трансдукции клеток CHO-K1. С помощью ELISA, специфического к мышинной Fc-области, в супернатанте трансдуцированных клеток CHO-K1 детектировали слитый белок IC8 (анти-NGcGM3) (фиг. 2E).

Пример 2. IC экспрессируются в виде интактных и функциональных белков.

Из культуральных супернатантов рекомбинантных клонов CHO-K1 очищали IC анти-CD20-IL2no-alpha (IgG1h) (IC1), анти-CD20-IL2no-alpha (мышиный IgG2a) (IC7) и анти-NGcGM3-IL2no-alpha (мышиный IgG1) (IC8). Этап захвата белка А и затем выполняли препаративную эксклюзионную хроматографию, используя гель-фильтрацию. Затем оценивали размер и иммунохимическую идентичность очищенных белков. Было подтверждено, что IC экспрессируются в виде белков, электрофоретическая миграция которых в нередуцирующих условиях соответствует приблизительному теоретическому размеру 180 кДа (фиг. 3А, фиг. 6А и фиг. 9А), а в редуцирующих условиях миграция обеих цепей рекомбинантных молекул соответствовала теоретическим размерам примерно 65 кДа для тяжелой цепи из-за присутствия мутеина IL2no-alpha (15 кДа) и 25 кДа для легкой цепи (фиг. 3В, фиг. 6В и фиг. 9В). Идентичность фрагмента антитела подтверждали путем проведения вестерн-блоттинга, специфичного к человеческому IgG (фиг. 4А-В и фиг. 12), тогда как присутствие цитокина в структуре IC доказывали тем же методом со специфическим антителом к человеческому IL-2 (фиг. 4С, фиг. 7 и фиг. 10). Чистоту слитых белков анализировали с помощью SEC-HPLC в аналитическом масштабе с помощью колонки TSK3000 (фиг. 5А, фиг. 8 и фиг. 11). Поскольку эти белки имеют более высокую молекулярную массу по сравнению с антителом IgG (150 кДа), их время удерживания было короче, чем у эталонных моноклональных антител (фиг. 5А-В и фиг. 11). Также наблюдали высокий процент мономерных видов (>95%), что свидетельствует об их высокой чистоте (фиг. 5А, фиг. 8 и фиг. 11).

Пример 3: IC сохраняют и усиливают *in vitro* биологическую активность, соответствующую фрагменту антитела.

Для определения, является ли часть антитела активной в структуре полученных анти-CD20 IC, выполняли эксперименты *in vitro* с использованием эквимольных количеств по отношению к исходной или эталонной молекуле. Распознают ли IC анти-CD20-IL2no-alpha (IgG1h) (IC1) и анти-CD20-IL2no-alpha (мышиный IgG2a) (IC7)

молекулу человеческого CD20, определяли методом проточной цитометрии, используя мышиную линию опухолевых клеток EL4-huCD20, которые экспрессируют на своей мембране высокие уровни человеческого CD20 (Di Gaetano, N., et al. (2003) *J Immunol.* 171(3): 1581-1587). Уровни распознавания клеток EL4-huCD20 белком IC1 и ритуксимабом (положительный контроль), а также белком IC7 и его родительским антителом (Rtx-IgG2a) были аналогичными (фиг. 13А-В). Приведенные выше результаты демонстрируют способность обоих IC связываться и распознавать молекулу человеческого CD20. Распознавание белком IC родительской клеточной линии EL4 было отрицательным, что подтверждает специфичность мечения, наблюдаемую в линии клеток мышинной лимфомы EL4-huCD20 (фиг. 13А-В). Помимо этого, оценивали две линии человеческих клеток лимфомы Беркитта, экспрессирующих CD20. Для каждой из этих линий не наблюдали никаких различий в характере их распознавания между IC1 и ритуксимабом, как можно видеть на фиг. 14А и В. Специфичность метки подтверждали неспособностью нерелевантного IC распознавать эти линии и неспособностью IC1 связываться с клетками Jurkat не экспрессирующей CD20 Т-клеточной лимфомы (фиг. 14А-В).

Активация каскада комплемента является одним из предполагаемых механизмов терапевтической активности ритуксимаба *in vivo* (Smith, M. R. (2003) *Oncogene.* 22(47): 7359-7368; Seyfizadeh, N., et al. (2016) *Crit Rev Oncol Hematol.* 97: 275-290). По этой причине способность IC1 оказывать CDC на линию опухолевых клеток Ramos оценивали с помощью проточной цитометрии посредством включения йодида пропидия (PI). В качестве источника комплемента использовали сыворотку АВ человека в конечном разведении 1:5. Вычисляли среднее значение \pm стандартное отклонение в виде процента (%) положительных клеток PI, полученных для трех независимых образцов (фиг. 15). IC1 при 6 нМ сохранял цитотоксический эффект, наблюдаемый при использовании ритуксимаба.

Нерелевантные IC не вызывали цитотоксичность в тестируемой концентрации (фиг. 15). Этот результат свидетельствует о том, что у данной молекулы эта активность не снизилась в отличие от активности других IC аналогичного формата (Gillies, S. D., et al. (2005) *Blood.* 105(10): 3972-3978; Gillies, S. D., et al. (1999) *Cancer Res.* 59(9): 2159-2166).

Апоптоз опухолевых клеток является еще одним из механизмов, предложенных для объяснения терапевтического действия ритуксимаба в клинических условиях (Smith, M. R. (2003) *Oncogene.* 22(47): 7359-7368; Seyfizadeh, N., et al. (2016) *Crit Rev Oncol Hematol.* 97: 275-290). Воздействие фосфатидилсерина представляет собой явление, которое характеризует ранние стадии апоптоза (Koopman, G., et al. (1994) *Blood.* 84(5): 1415-142). Воздействие этого фосфолипида во внешнем монослое плазматической мембраны оценивали на клетках Ramos, обработанных IC1. Уровень фосфатидилсерина измеряли методом проточной цитометрии путем мечения аннексином V. Вычисляли среднее значение \pm стандартное отклонение для трех образцов. Клетки на стадии раннего апоптоза идентифицировали как клетки, меченные аннексином V+/PI- (фиг. 16А); клетки

на поздней стадии апоптоза представляли собой клетки, меченные аннексином V+/PI+, а сам апоптоз определяли как сумму этих двух популяций (фиг. 16B). Удивительно, IC1 оказался более эффективным, чем ритуксимаб (фиг. 16A-B). Учитывая тот факт, что воздействие фосфатидилсерина возможно и в отсутствие апоптоза, дополнительно оценивали активацию каспазы 3 как маркера позднего апоптоза. Активный фрагмент каспазы 3 массой 17/19 кДа определяли методом проточной цитометрии со специфической кроличьей сывороткой и кроличьей антисывороткой, конъюгированной с Alexa Fluor-488. Вычисляли среднее значение \pm стандартное отклонение в виде процента клеток с активной каспазой 3, полученного для трех независимых образцов. Инкубация клеток Ramos с IC1 при концентрации 6 нМ в течение 48 часов вызывала активацию этого фермента (фиг. 16C).

Еще одним механизмом противоопухолевого действия ритуксимаба является ADCC (Smith, M. R. (2003) *Oncogene*. 22(47): 7359-7368; Seyfizadeh, N., et al. (2016) *Crit Rev OncolHematol*. 97: 275 -290). Способность IC1 опосредовать ADCC определяли путем оценки активности фермента LDH, высвобождаемого клетками-мишенями (Ramos), как меры повреждения клеток. Этот эксперимент выполняли по субоптимальному сценарию для ритуксимаба с точки зрения соотношения эффекторных клеток к клеткам-мишеням (10:1) и использования неактивированных эффекторных клеток. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) использовали в качестве эффекторных клеток, а клетки Ramos - в качестве клеток-мишеней. Как показано на фиг. 17A, IC1 индуцировал более высокий процент специфического лизиса по сравнению с ритуксимабом и комбинацией ритуксимаба с IL2 α . Индуцированная цитотоксичность зависела от концентрации.

Учитывая превосходство IC1 в индукции ADCC в клетках Ramos, изучали его способность элиминировать *in vitro* злокачественные клетки (CD19+) у пациента с неходжкинской лимфомой, при этом PBMC являлись источником клеток-мишеней и эффекторных клеток. В этом эксперименте PBMC инкубировали с IC1 и ритуксимабом (18 нМ) в течение 24 часов, и процент В-клеток в PBMC измеряли с помощью проточной цитометрии. Как показано на фиг. 17B, IC1 и ритуксимаб способны убивать нормальные В-клетки здорового донора. Примечательно, что только IC1 обеспечивал существенное снижение процентного содержания клеток CD19+ в PBMC пациента с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (фиг. 17B). Это указывает на возможность использования данного IC1 у пациентов, резистентных к ритуксимабу из-за недостаточной или неоптимальной активности ADCC.

Согласно результатам ELISA, мышинный иммуноцитокин анти-NGcGM3-IL2 α (IC8) распознавали ганглиозид NGcGM3 аналогично родительскому антителу 14F7. Специфичность связывания подтверждали по отсутствию активности нерелевантного моноклонального антитела, используемого в качестве изотипического контроля (фиг. 18A). В этом эксперименте, в дополнение к твердофазному иммуноферментному анализу, также выполняли проточную цитометрию. Использовали мышинные опухолевые клетки L1210, которые экспрессируют высокие уровни ганглиозида NGcGM3 (Roque-Navarro, L.,

et al. (2008) *Mol Cancer Ther.* 7(7): 2033-2041). IC8 был способен связываться с этой линией опухолевых клеток, как и антитело 14F7 (фиг. 18B).

Затем, используя клетки L1210, выполняли оценку цитотоксической активности, независимой от эффекторных функций, ранее описанную для 14F7 (Roque-Navarro, L., et al. (2008) *Mol Cancer Ther.* 7(7): 2033-2041). С этой целью в качестве показателя гибели клеток анализировали увеличение проницаемости мембраны для ядерной ДНК при мечении PI. Неожиданно было обнаружено, что процент нежизнеспособных клеток оказался выше для IC анти-NeuGcGM3-IL2no-alpha по сравнению с клетками без обработки и клетками, обработанными родительским антителом (фиг. 19).

Пример 4. IC сохраняют функциональность фрагмента no-alpha IL-2

Биологическую активность *in vitro*, соответствующую части IC, относящуюся к IL2no-alpha, оценивали в анализах пролиферации IL-2-зависимой линии мышинных клеток CTLL-2, которая экспрессирует высокоаффинный вариант IL-2R (фиг. 20A-B). Значения концентрации, представленные на фиг. 20, относятся к части IL2 без альфа-цепи, содержащейся в каждом образце.

Инкубация клеток CTLL-2 с мутеином и IC приводила к стимуляции их пролиферации. Во всех случаях величина пролиферации зависела от концентрации. Этот результат демонстрирует, что IL2no-alpha часть сохраняет свою функциональность в контексте слитых белков (фиг. 20A-B).

Пример 5. IC способствуют активации НК-клеток

Активация НК-клеток является критическим этапом для ADCC, и, кроме того, было показано, что эти клетки являются важными медиаторами противоопухолевой функции мутеина IL2no-alpha (Carmenate, T., et al. (2013) *J Immunol.* 190 (12): 6230-6238). Через двадцать часов после проведения анализа определяли способность IC1 активировать НК-клетки при 6,6 нМ в присутствии клеток-мишеней (Ramos) и эффекторных (PMBC) клеток в соотношении 1:10. В НК-клеточной популяции образцов, обработанных IC1, наблюдали более сильное снижение экспрессии поверхностного маркера CD16 по сравнению с ритуксимабом (фиг. 21A), что свидетельствует о более высокой активации этого типа клеток (Bowles, J.A. и G.J. Weiner (2005) *J Immunol Methods* 304(1-2): 88-99). Аналогичным образом, подтверждали усиление экспрессии CD69 в качестве доказательства активации НК-клеток, эффект также наблюдали в присутствии ритуксимаба (фиг. 21B). Экспрессия CD107a, поверхностного маркера, связанного с лизосомальной дегрануляцией, в клетках, инкубированных с IC1, увеличилась в три раза по сравнению с другими обработками (фиг. 21C). В совокупности эти результаты демонстрируют более высокую ассоциированную с ADCC активностью активацию НК-клеток, обработанных этим слитым белком, по сравнению с обработкой антителом ритуксимабом, что, вероятно, может быть связано с усиливающим эффектом, оказываемым IL2no-alpha.

Пример 6. IC обладают превосходным противоопухолевым действием

Чтобы продемонстрировать концепцию, согласно которой слияние no-alpha

мутеинов с антителом может привести к превосходному противоопухолевому эффекту, выполняли сравнение противоопухолевой активности мышиной IgG2a-версии ритуксимаба и соответствующего IC на основе IL2no-alpha (IC7). Для этого мышам C57BL/6 внутривенно инокулировали $2,5 \times 10^5$ клеток EL4-huCD20+ и затем вводили три внутрибрюшинные инъекции по 20 мкг IC7 (дни 1, 4 и 7) или пять доз по 200 мкг родительского антитела анти-CD20 IgG2a (дни 1, 4, 7, 10 и 13), с терапевтический эффект которого продемонстрирован в предыдущих исследованиях (Abes, R., et al. (2010) Blood. 116(6): 926-934; Casadesus, A. V., et al. (2020) Oncoimmunology. 9(1): 1770565). Интересно, что лечение низкими дозами (20 мкг) IC7 обеспечило такую же выживаемости мышей, как и тех, которые получили высокие дозы IgG2a-версии ритуксимаба (фиг. 22A). Однако дозы антитела, эквивалентные 20 мкг IC7, и его комбинация с эквивалентными количествами мутеина IL2no-alpha не оказывали противоопухолевого эффекта (фиг. 22B).

Исходя из перекрестной реактивности между человеческими антителами и мышинными эффекторными клетками, а также рецепторами человеческого IL-2 и мышинового IL-2 (Arenas-Ramirez, N., et al. (2015) Trends Immunol. 36 (12): 763-777), оценку эффективности IC1 выполняли на иммунокомпетентных мышах. Мышам C57BL/6 внутривенно инокулировали 5×10^5 клеток EL4-huCD20, и затем в дни 1, 4 и 7 вводили внутрибрюшинно 20 мкг IC1 и 150 мкг ритуксимаба, терапевтический эффект которого продемонстрирован в предыдущих исследованиях (Di Gaetano, N., et al. (2003) J Immunol. 171(3): 1581-1587) (фиг. 23A). Было замечено, что доза IC1, которая была ниже дозы ритуксимаба в 7,5 раз, продемонстрировала такой же противоопухолевый эффект, что и антитело (фиг. 23A), тогда как ритуксимаб в эквивалентных количествах IC1 (20 мкг) не оказывал противоопухолевого эффекта, в отличие от IC (фиг. 23B). Помимо этого, выживаемость мышей, ранее обработанных IC1, через 65 дней после их заражения опухолевыми клетками EL4-huCD20 подтвердила, что IC в низких дозах сохраняет длительный защитный эффект, описанный для мышинового IgG2a-варианта ритуксимаба в высоких дозах (Abes, R., et al. (2010) Blood. 116(6): 926-934) (фиг. 23C).

Для сравнения противоопухолевого эффекта анти-NGcGM3-IL2no-alpha (IC8) относительно контрольной группы, мышам C57BL/6 в день 0 инокулировали подкожно (п/к) 2×10^5 клеток 3LL-D122 в объеме 200 мкл. Через шесть дней, после проверки их приживления, мышам внутрибрюшинно вводили эквивалентные количества антител, цитокинов и IC (85 мкг для антител, 16,6 мкг для IL2no-alpha и 100 мкг для IC8). Обработку повторяли в дни 8 и 10. В отличие от контрольного антитела 14F7 введение IC8 привело к уменьшению объема опухоли у обработанных животных (фиг. 23D).

Пример 7. IC обеспечивают преимущественную пролиферацию NK- и CD8+ клеток, а не регуляторных T-клеток

Для оценки влияния IC на основе no-alpha мутеина на определенные популяции иммунных клеток в условиях опухоли, мышей EL4hu-CD20 с опухолью C57BL/6, обрабатывали анти-CD20-IL2no-alpha (IC1), как описано в примере 6. Через десять дней после заражения опухолью селезенку удаляли, и разные популяции клеток анализировали

с помощью проточной цитометрии. Для IC1 наблюдали значительное увеличение TCD8+ клеток (фиг. 24А) и NK1.1+CD3- клеток (фиг. 24В), что не было подтверждено в случае обработки ритуксимабом или PBS. Стоит отметить, что IC1 способствовал пролиферации эффекторных клеток вместо регуляторных Т-клеток, на что указывает соотношение FOXP3+CD4+/TCD8+ и FOXP3+CD4+/NK1.1+CD3- (фиг. 24С-Д). Примечательным оказалось не только увеличение количества эффекторных клеток, но также и отсутствие увеличения количества регуляторных Т-клеток (фиг. 24Е). Этот результат демонстрирует, что IC1 обеспечивает иммуномодуляцию эффекторных клеток в ущерб регуляторным Т-клеткам, что может способствовать наблюдаемому превосходному противоопухолевому эффекту.

В совокупности предыдущие результаты указывают на терапевтическое превосходство IC на основе по- α мутеинов ранее описанного формата и указывают на то, что слияние анти-CD20 антител, обладающих доказанным эффектом прямого лизиса, ADCC и/или CDC, с по- α мутеинами IL-2 приводит к качественной или количественной активации различных молекулярных и клеточных механизмов, которые вызывают более высокий усиленный противоопухолевый ответ, чем ответ, получаемый с контрольными антителами и по- α мутеинами.

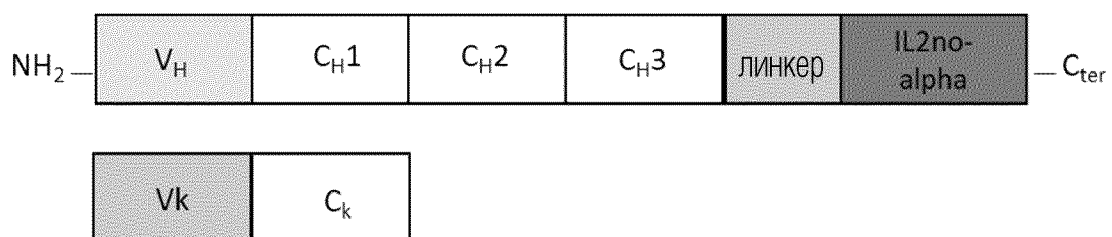
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, содержащий мутеин агониста интерлейкина 2 (IL-2), связанный с иммуноглобулином изотипа IgG1 или IgG3, где указанный иммуноглобулин распознается Fc-гамма рецепторами и молекулами каскада комплемента.
2. Слитый белок по п.1, характеризующийся двухвалентной молекулой в отношении антигенсвязывающего сайта и цитокина.
3. Слитый белок по п.1, где способность мутеина связываться с альфа-цепью рецептора IL-2 уменьшена по меньшей мере на два порядка.
4. Слитый белок по п.1, где мутеин связан с иммуноглобулином посредством линкера.
5. Слитый белок по п.1, где мутеин связан с тяжелыми цепями иммуноглобулина.
6. Слитый белок по п.5, где мутеин связан с карбокси-концом иммуноглобулина.
7. Слитый белок по любому из пп.1-6, где мутеин имеет последовательность, выбранную из группы, содержащей SEQ ID 16-43.
8. Слитый белок по п.4, где линкер образован аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, содержащей: $(Gly_4Ser)_nThrGly$ (SEQ ID NO: 44) и $(Gly_4Ser)_n$ (SEQ ID NO: 45), где n - количество повторов фрагмента Gly_4Ser от 1 до 5.
9. Слитый белок по п.1, где подклассы IgG1 или IgG3 содержат последовательность SEQ ID NO. 11 или 12, соответственно, или содержат последовательность, более чем на 97% идентичную указанным SEQ ID NO. 11 или 12.
10. Слитый белок по п.1, где легкая цепь иммуноглобулина представляет собой человеческий каппа-изотип, имеющий последовательность, соответствующую SEQ ID NO. 9.
11. Слитый белок по п.1, где легкая цепь иммуноглобулина представляет собой человеческий лямбда-изотип, имеющий последовательность, соответствующую SEQ ID NO. 10.
12. Слитый белок по п.1, где целевой опухолевый антиген выбирают из группы, содержащей CD20, CD19, NGcGM3, PDL1, Her1, Her2 и Epcam.
13. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок по любому из пп.1-12 в диапазоне концентраций от 0,5 мг/мл до 20 мг/мл и приемлемый фармацевтический носитель.
14. Применение фармацевтической композиции по п.13 при лечении рака.
15. Применение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок по любому из пп.1-12, для подкожной, внутримышечной или внутриопухолевой инъекции.
16. Способ лечения нуждающегося в этом субъекта, включающий подкожное, внутривенное, внутрикожное, внутримышечное или внутрибрюшинное введение фармацевтической композиции по п.13 в диапазоне доз от 0,01 мг/кг до 0,6 мг/кг массы тела.
17. Способ лечения по п.16, где выполняют от одного до 30 циклов введения фармацевтической композиции от одной до трех доз в неделю с интервалом между

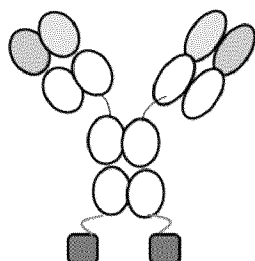
циклами от семи дней до восьми недель.

ФИГ. 1

А



В

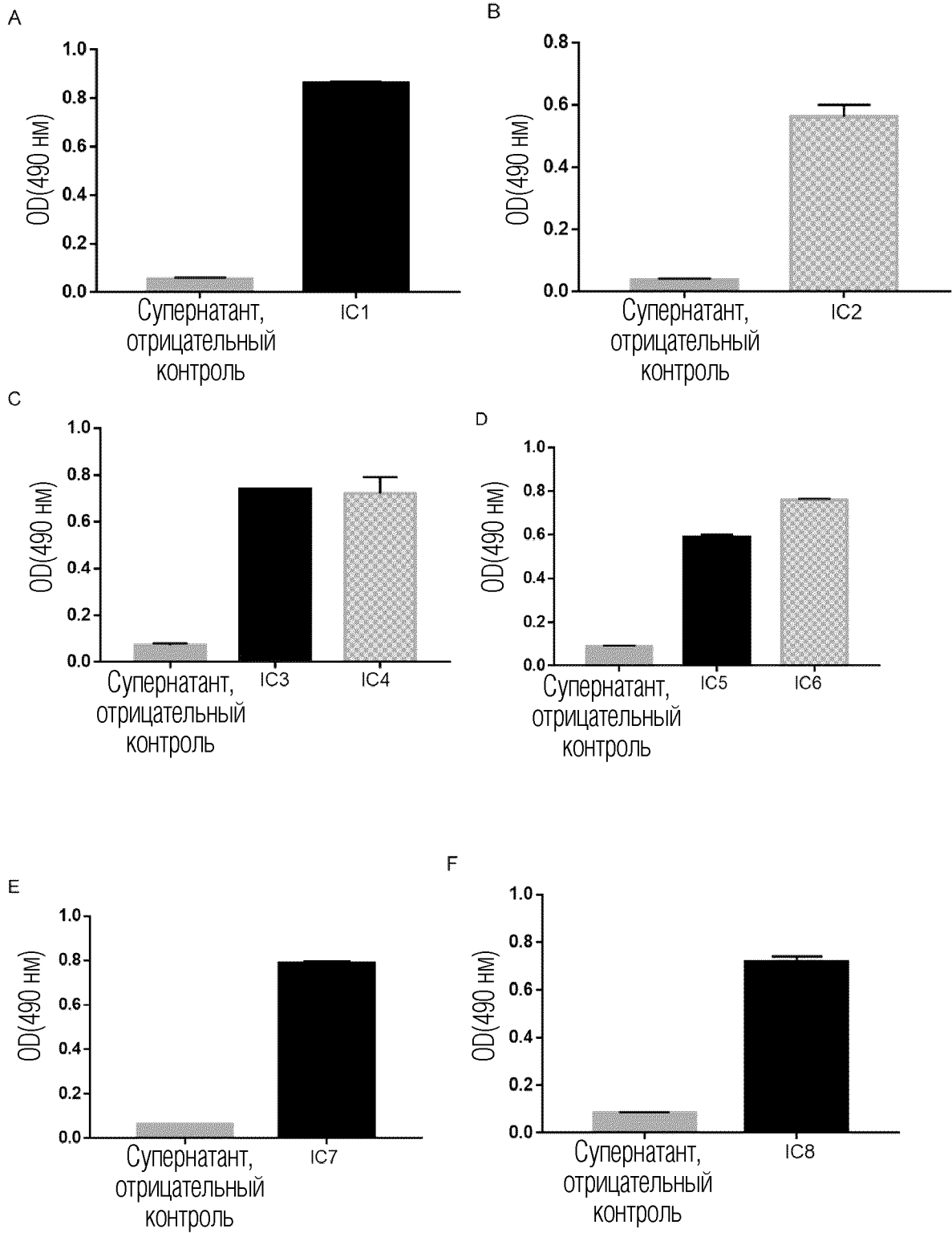


 переменные домены легкой и тяжелой цепей

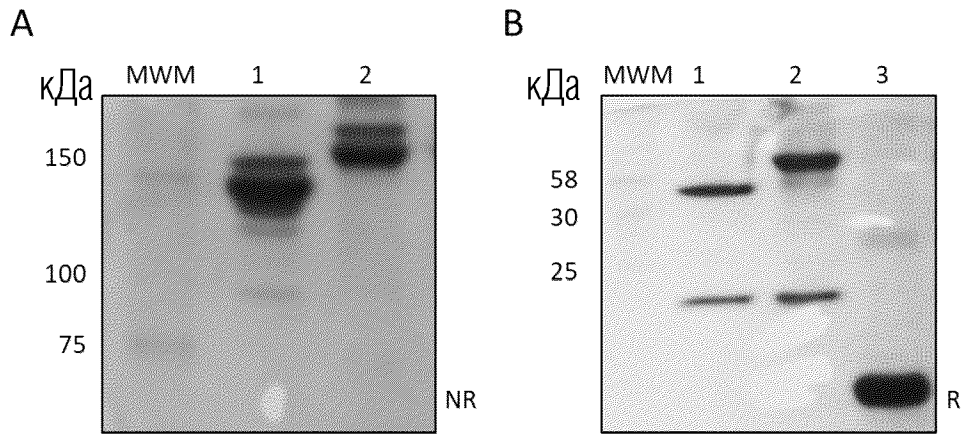
 константные домена изотипа hlgG3 или мышиного IgG1 или IgG2a

 мутеин IL2no-alpha

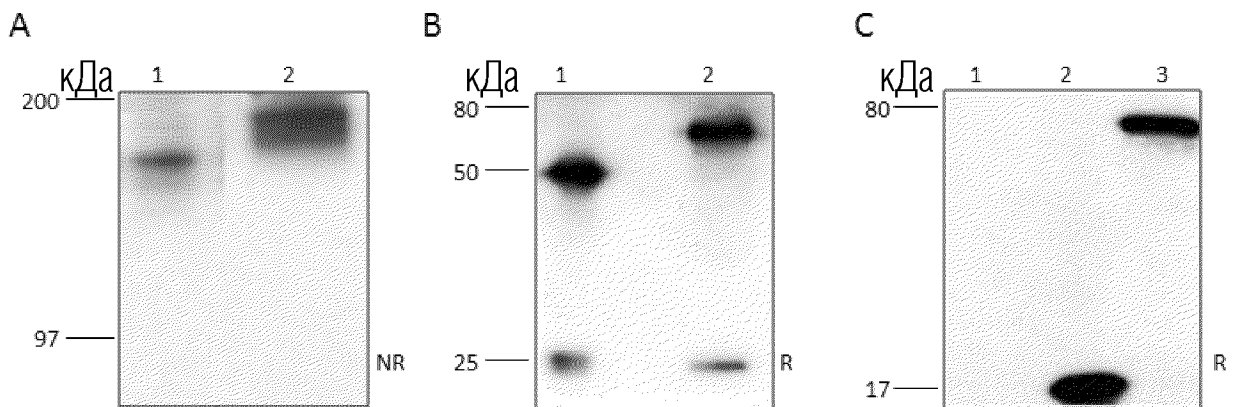
ФИГ. 2



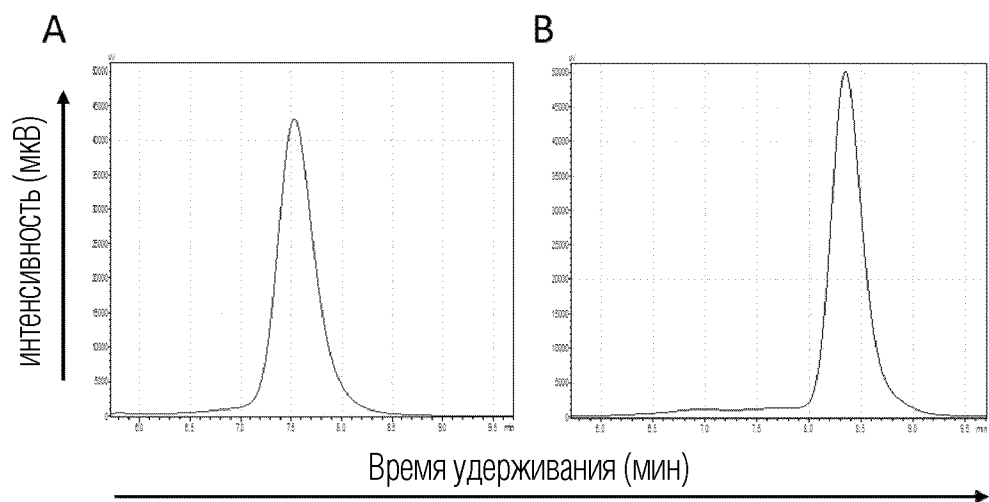
ФИГ. 3



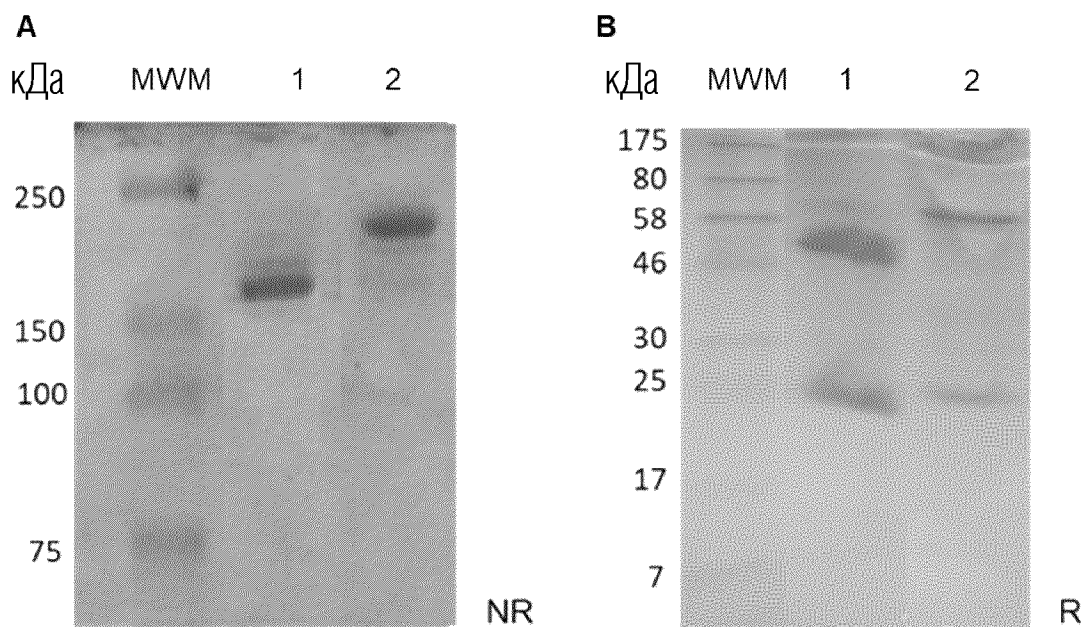
ФИГ. 4



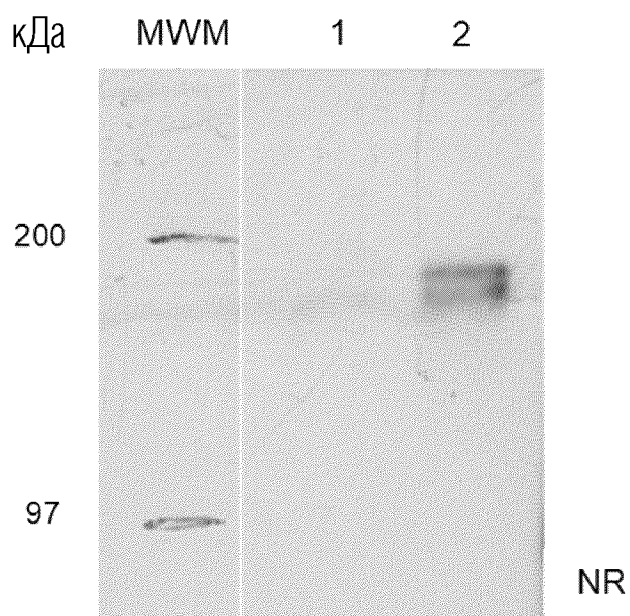
ФИГ. 5



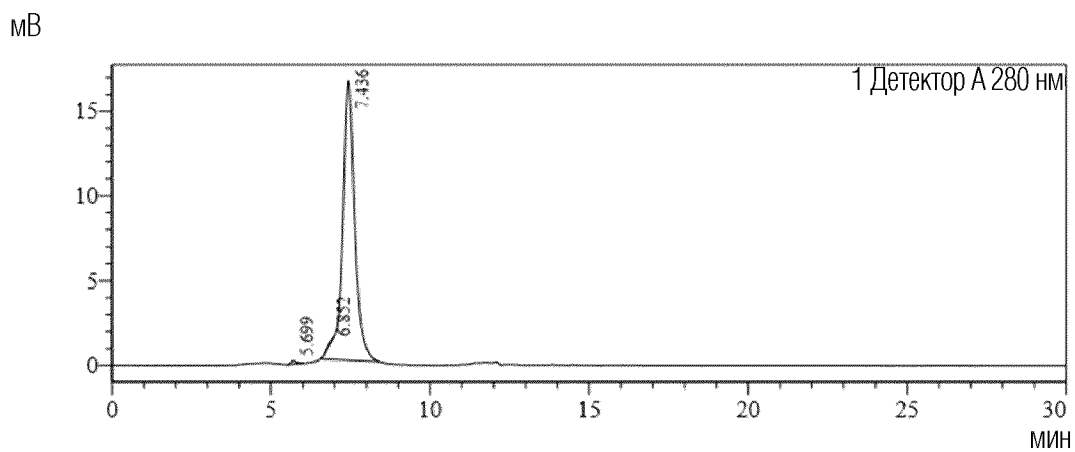
ФИГ. 6



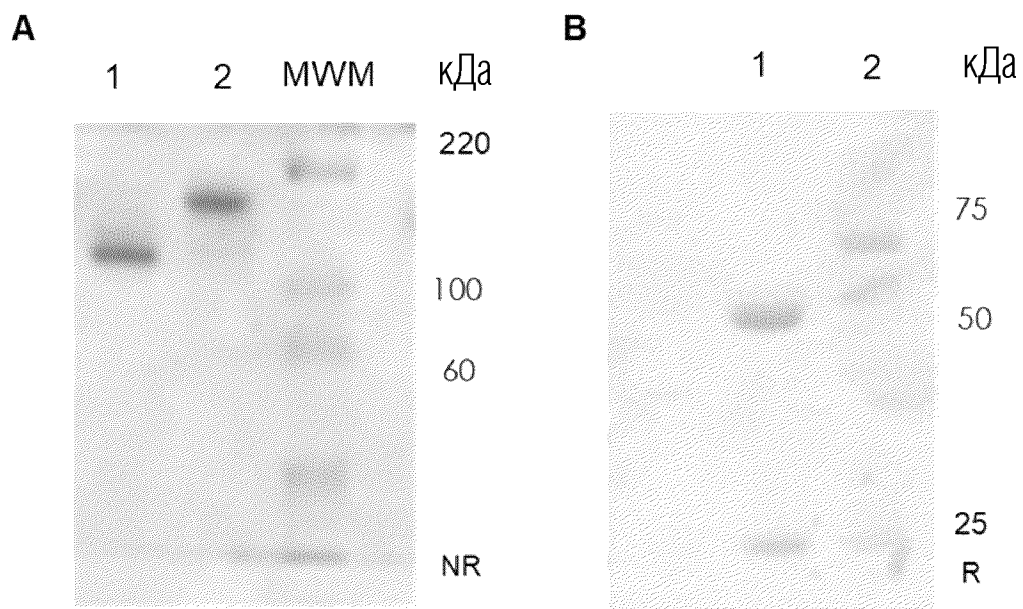
ФИГ. 7



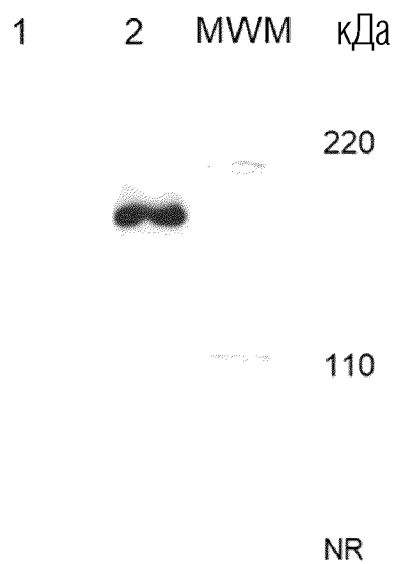
ФИГ. 8



ФИГ. 9



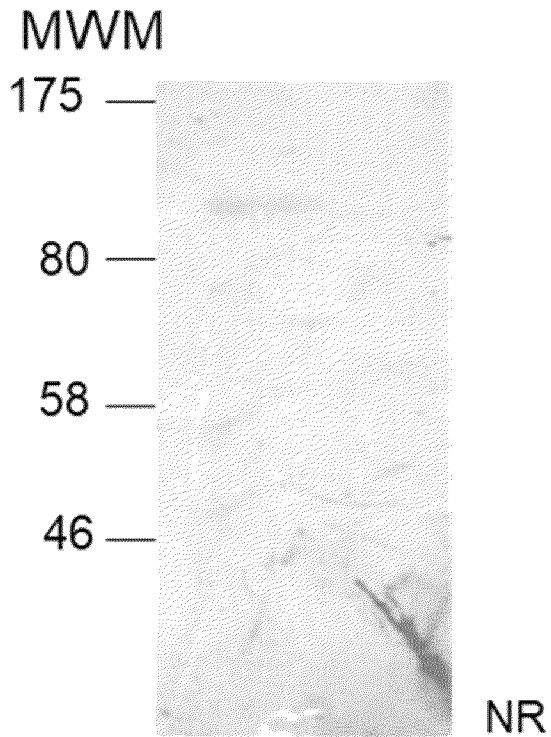
ФИГ. 10



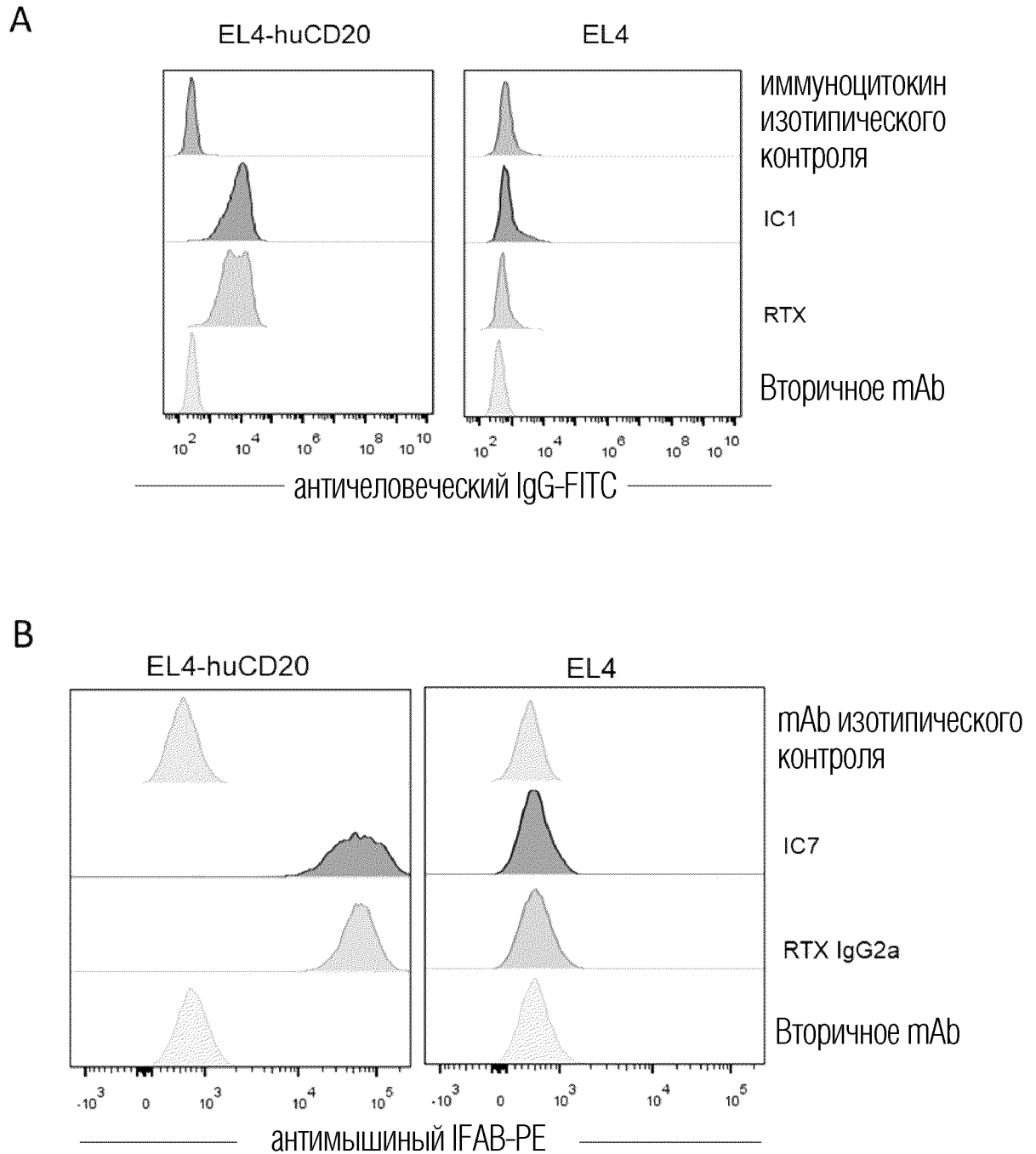
ФИГ. 11



ФИГ. 12

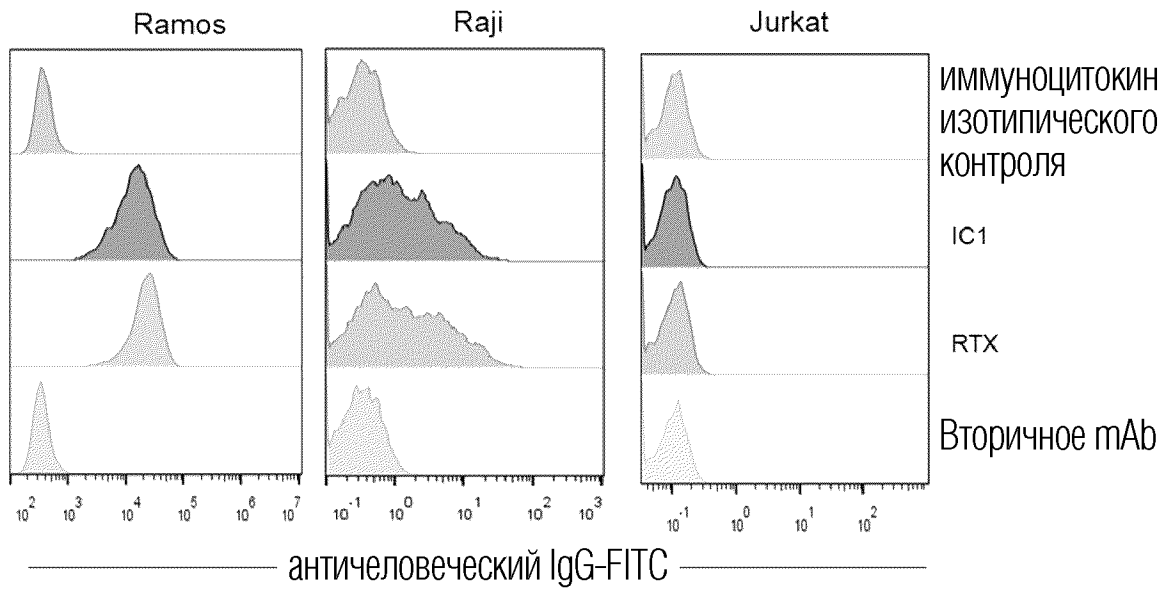


ФИГ. 13

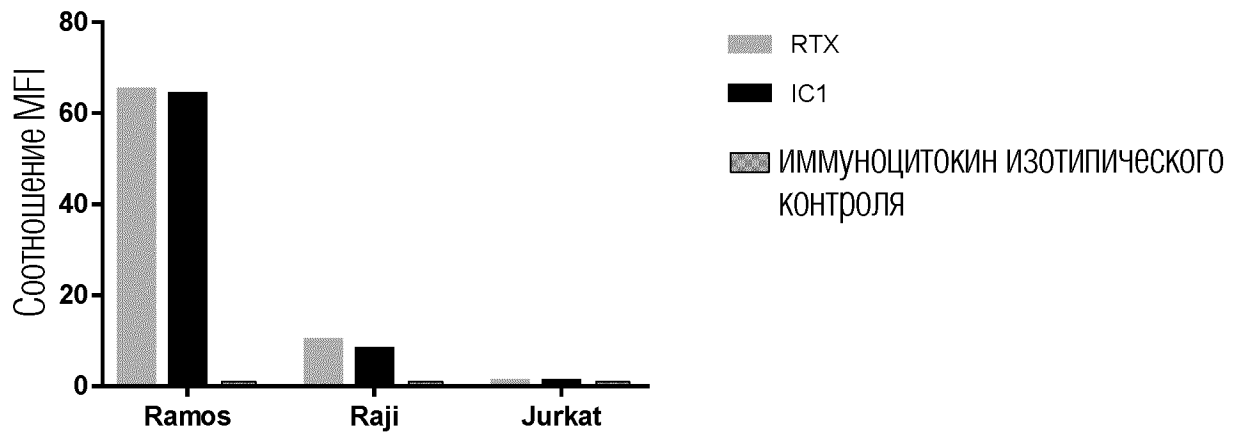


ФИГ. 14

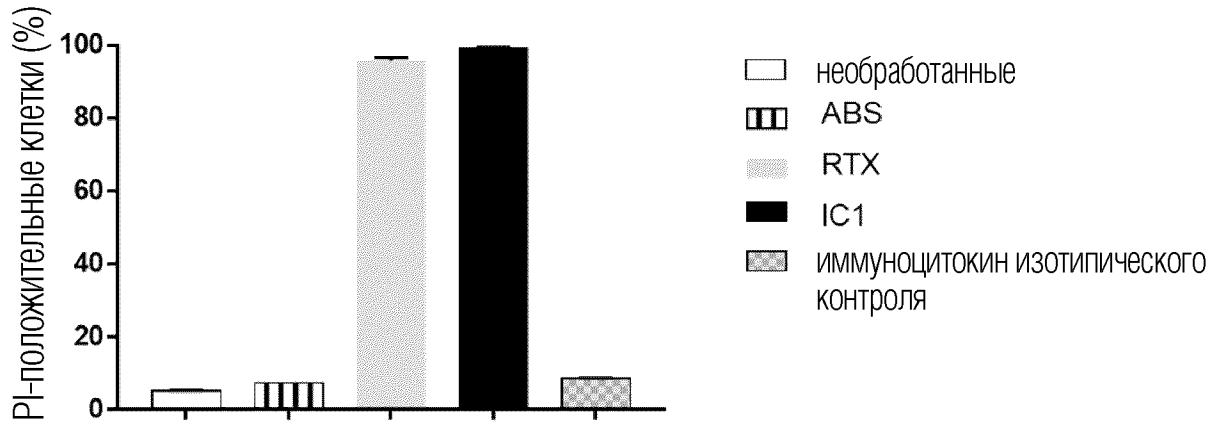
A



B

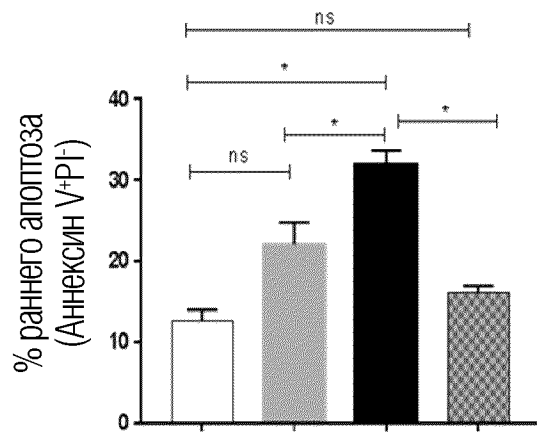


ФИГ. 15

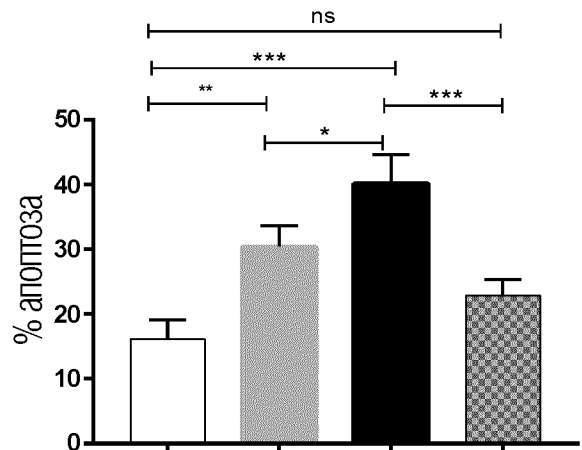


ФИГ. 16

A

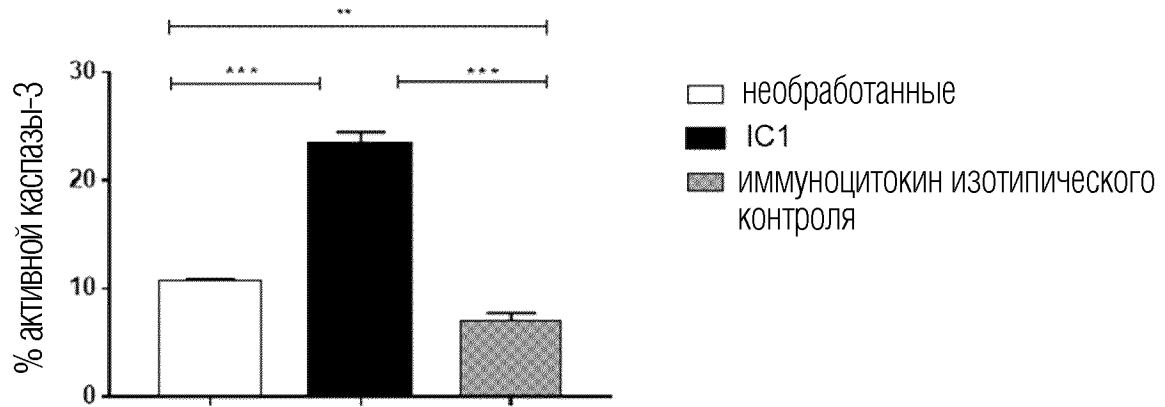


B

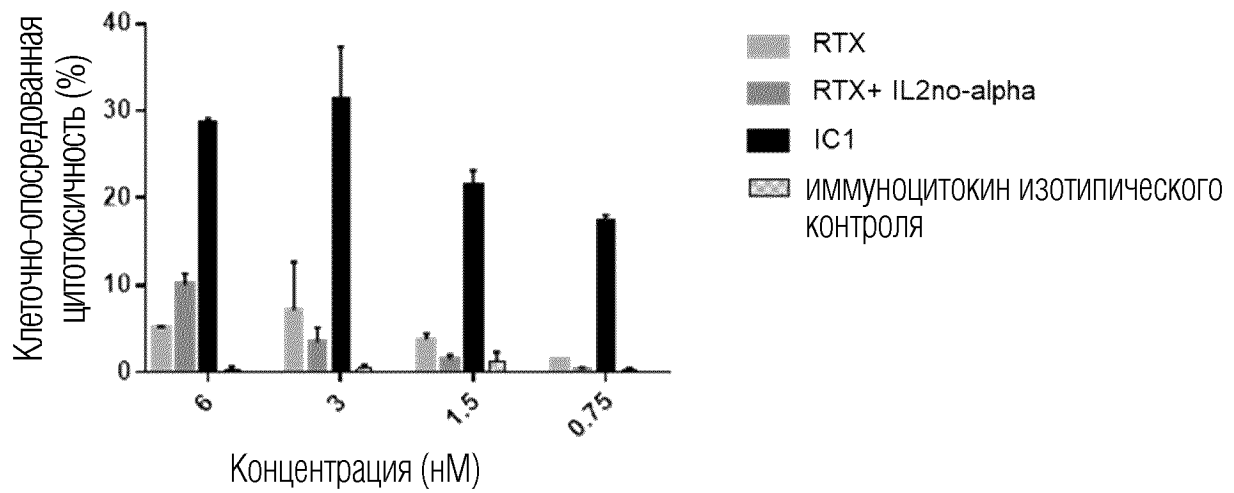


необработанные
 RTX
 IC1
 иммуноцитокин изотипического контроля

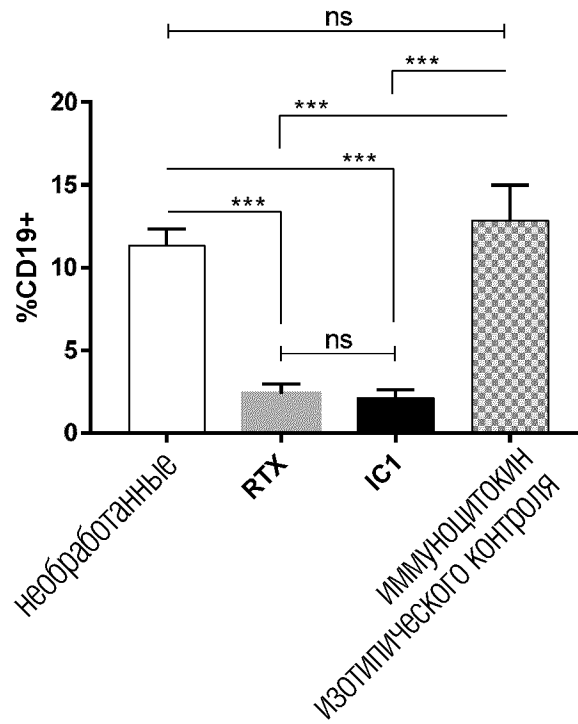
ФИГ. 16С



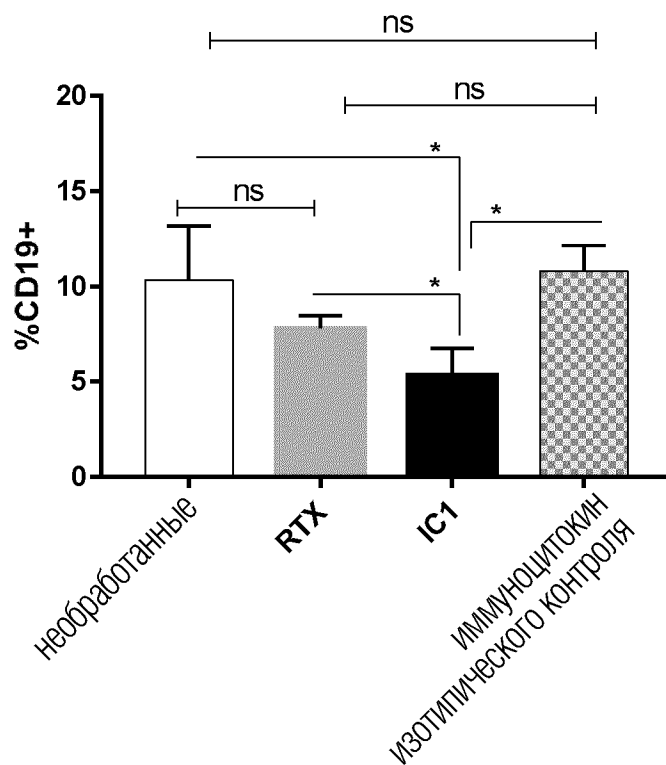
ФИГ. 17А



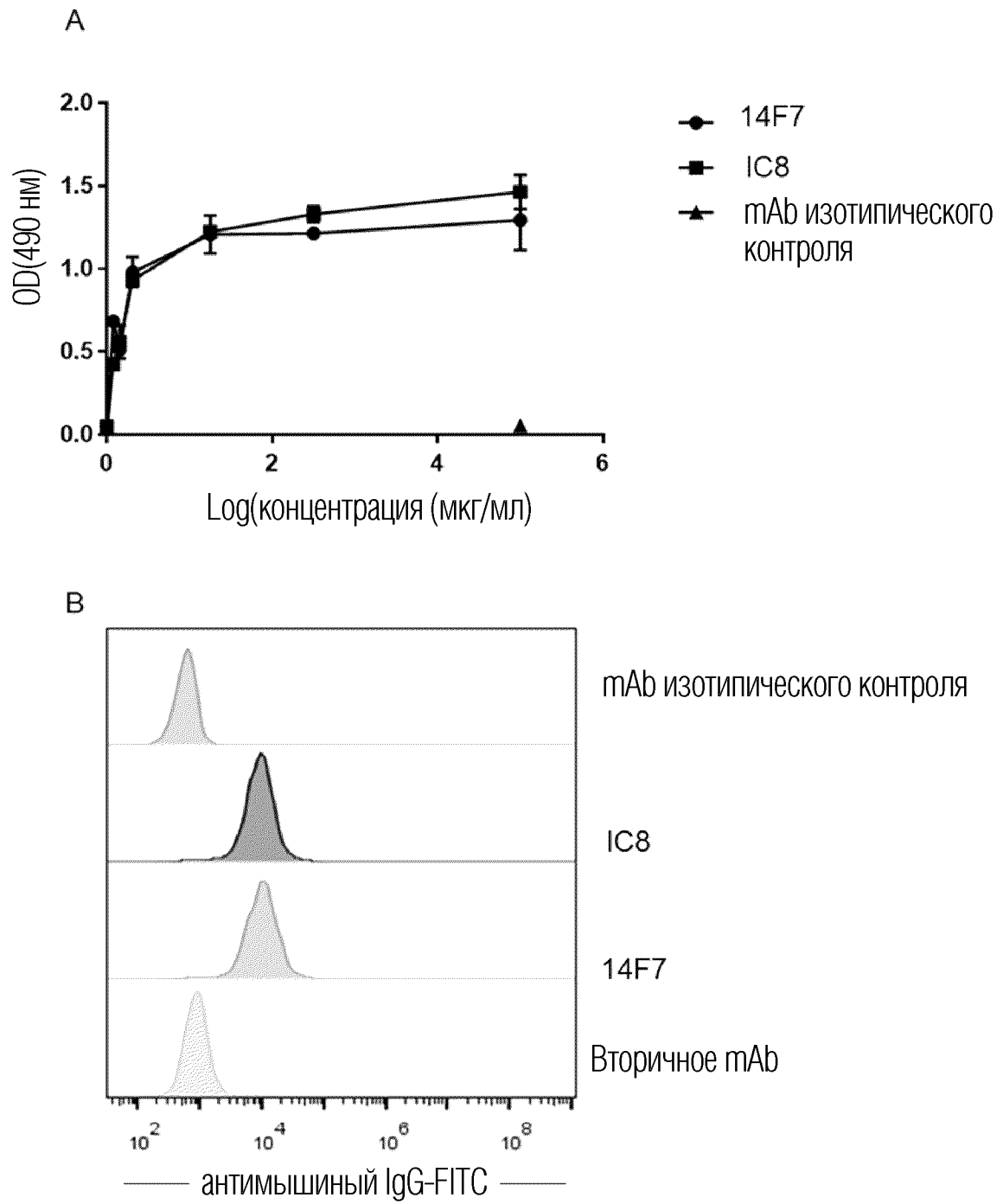
ФИГ. 17В



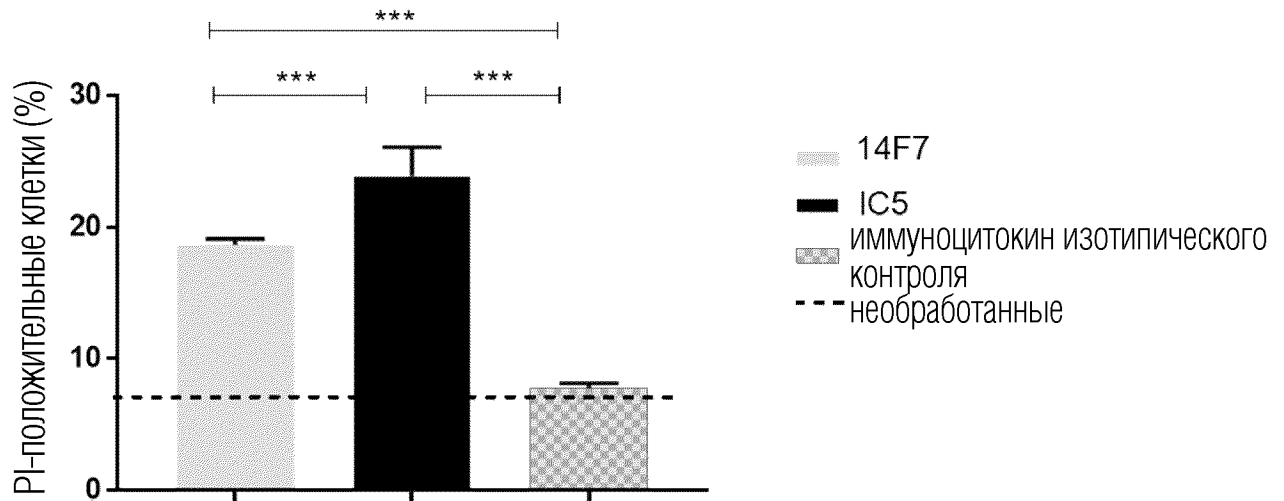
ФИГ. 17С



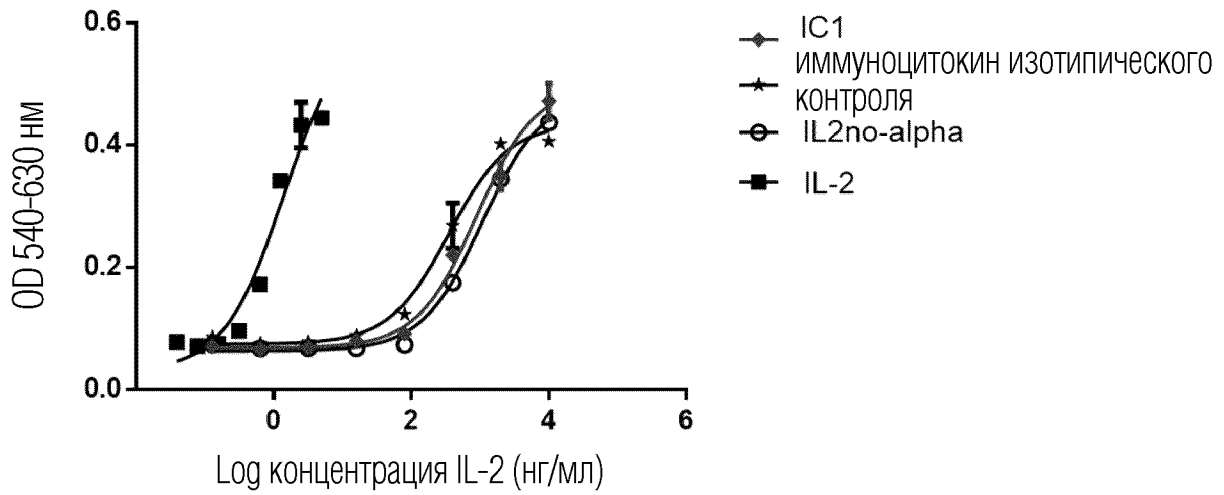
ФИГ. 18



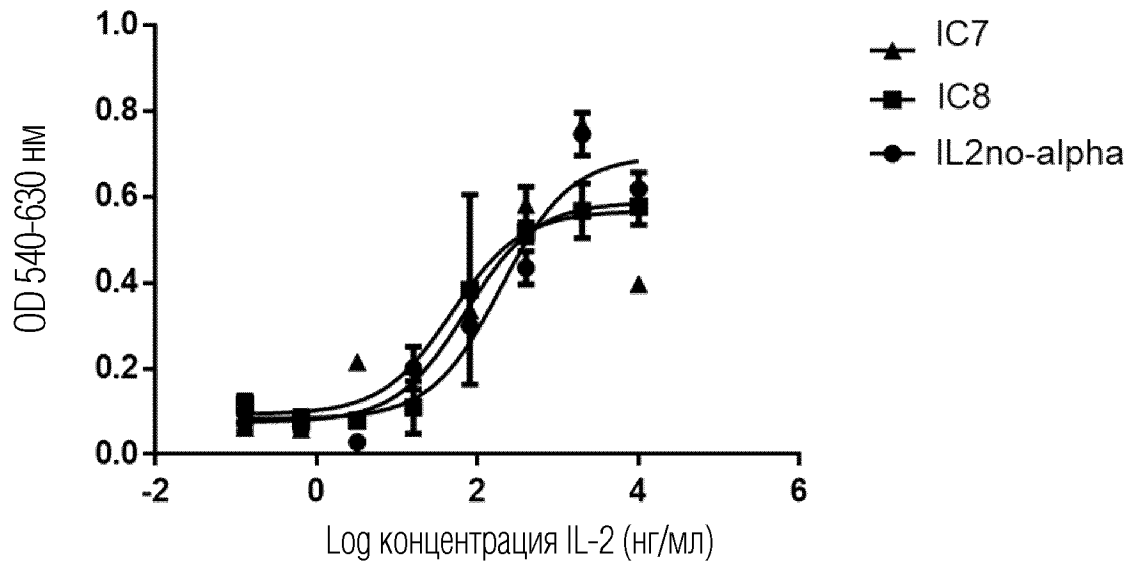
ФИГ. 19



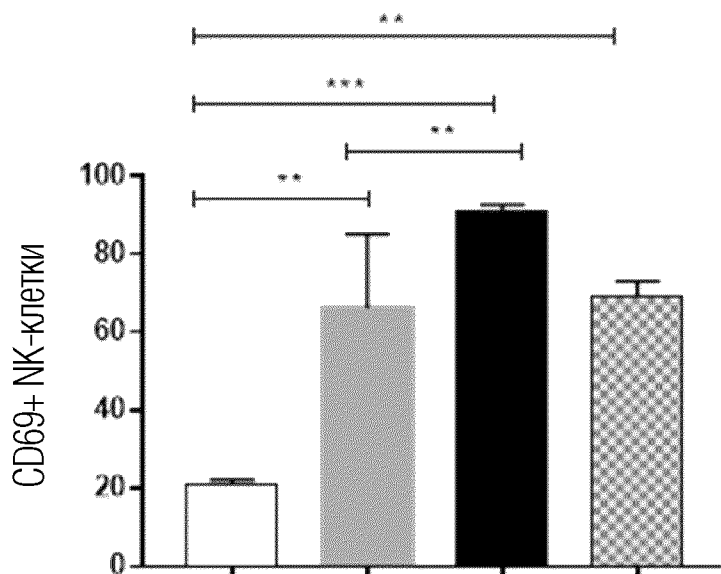
ФИГ. 20А



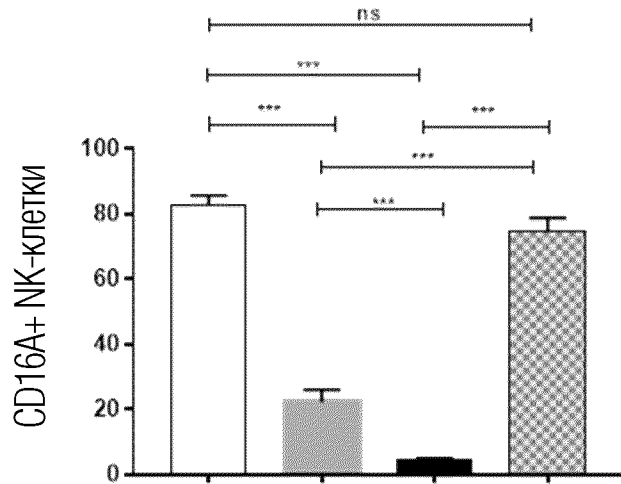
ФИГ. 20В



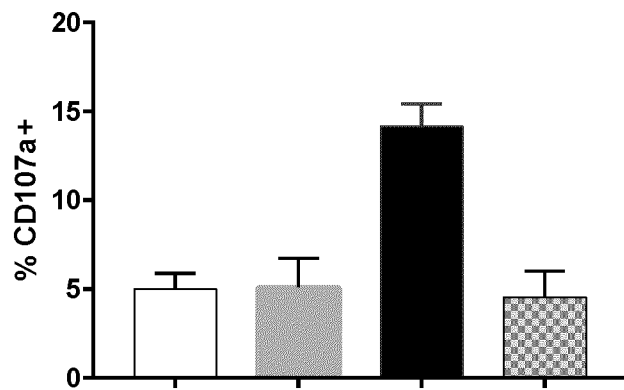
ФИГ. 21А



ФИГ. 21В



ФИГ. 21С



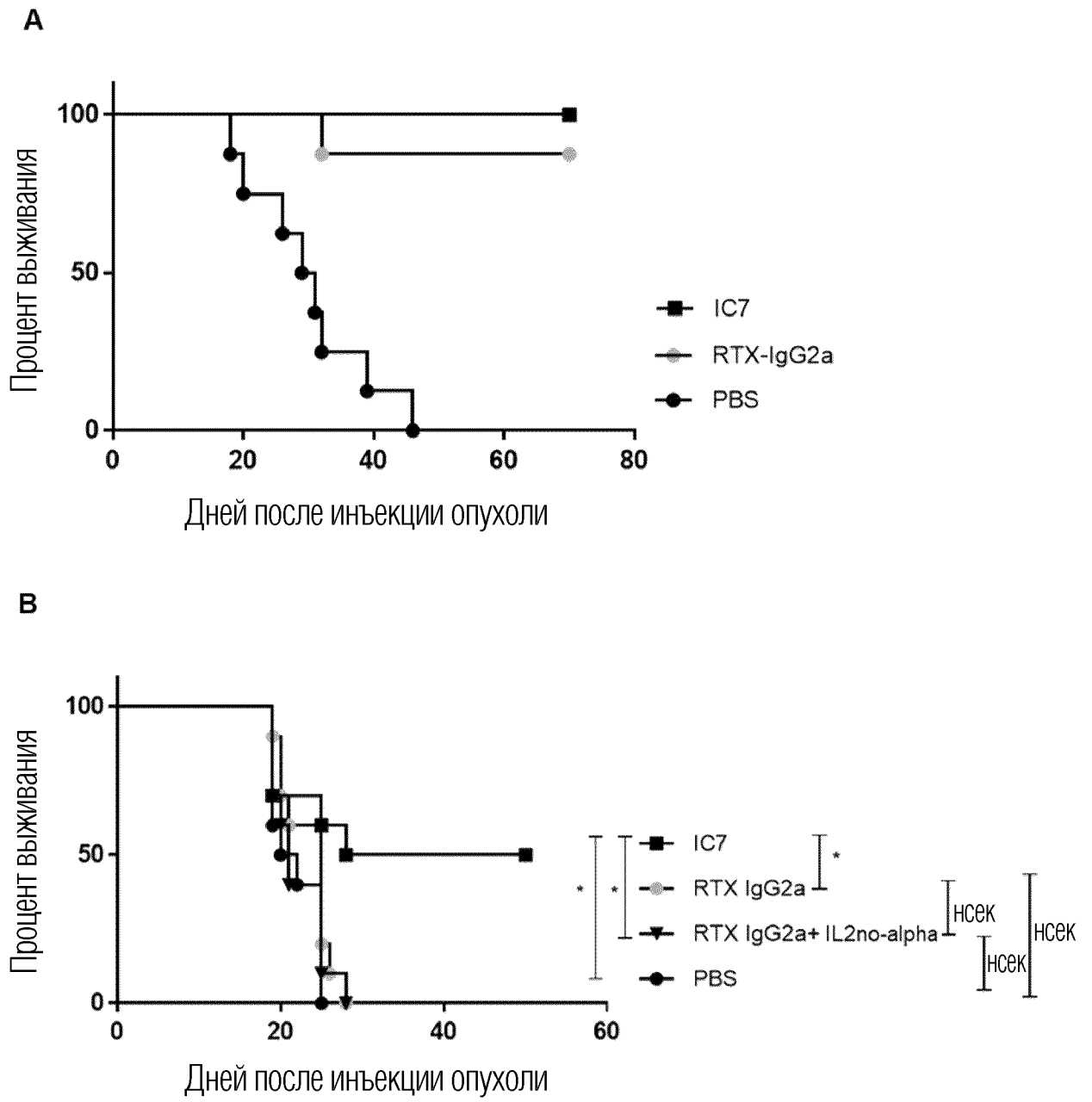
□ необработанные

■ RTX

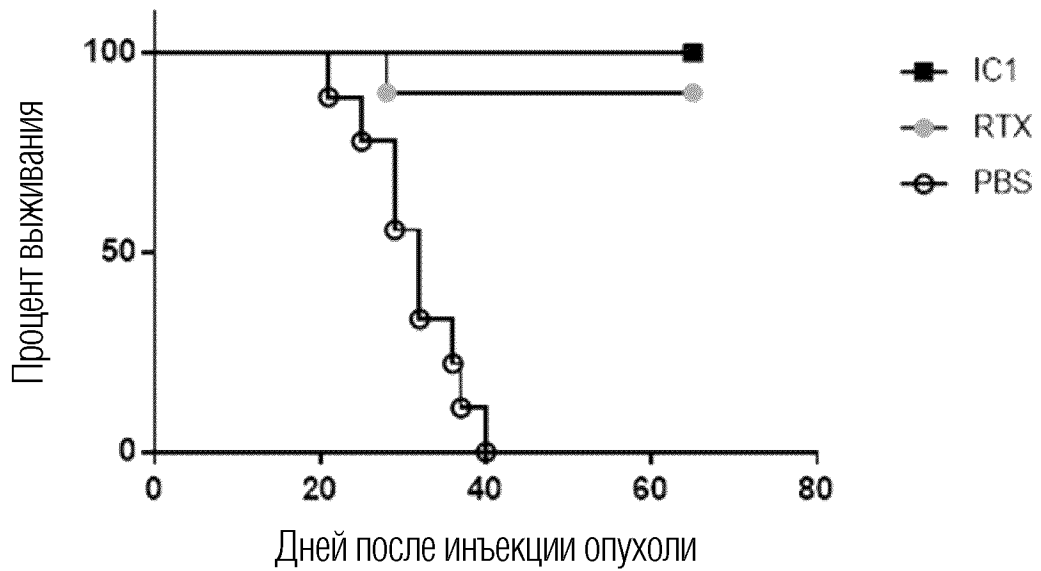
■ IC1

▨ иммуноцитокин изотипического контроля

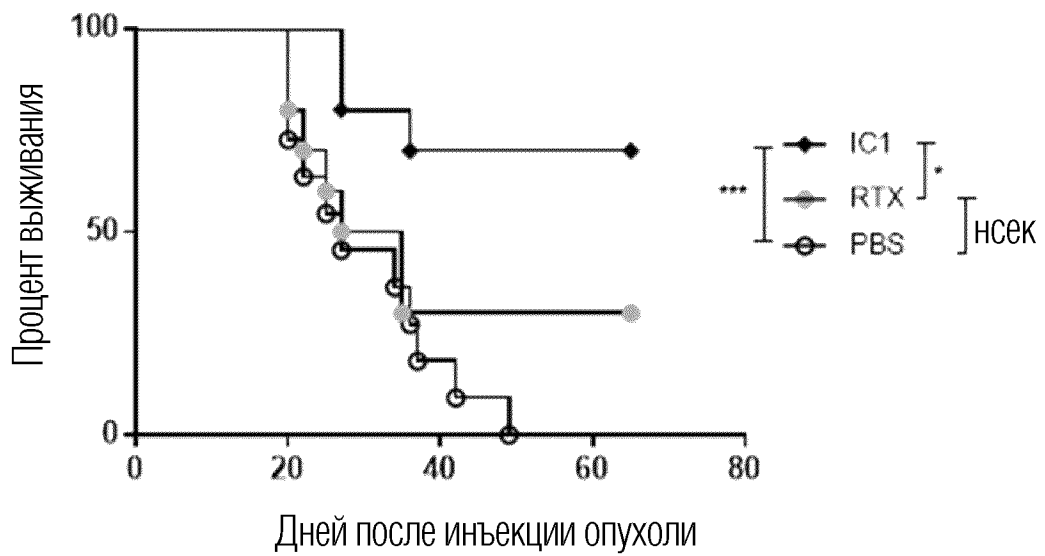
ФИГ. 22



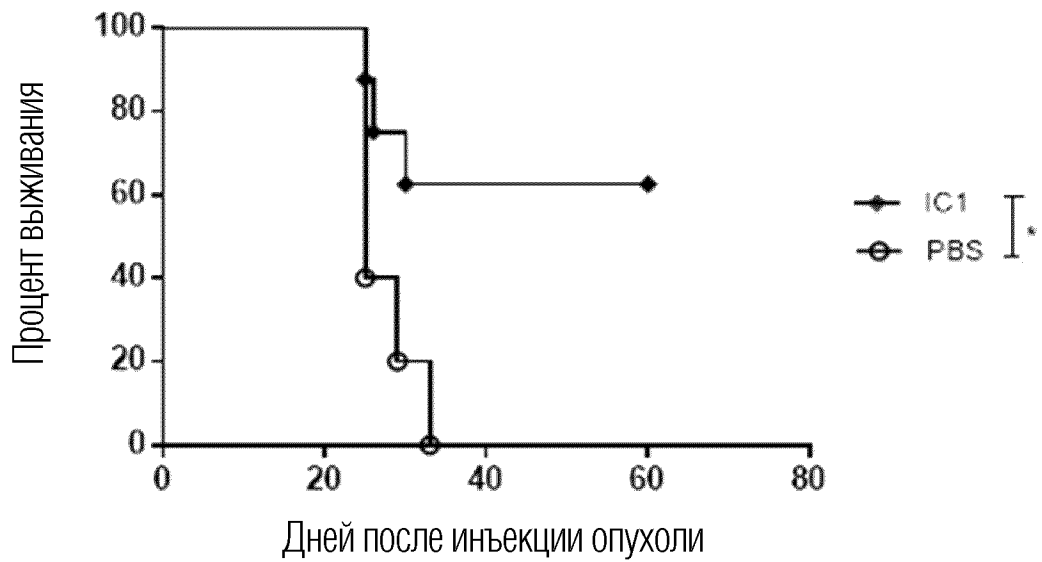
ФИГ. 23А



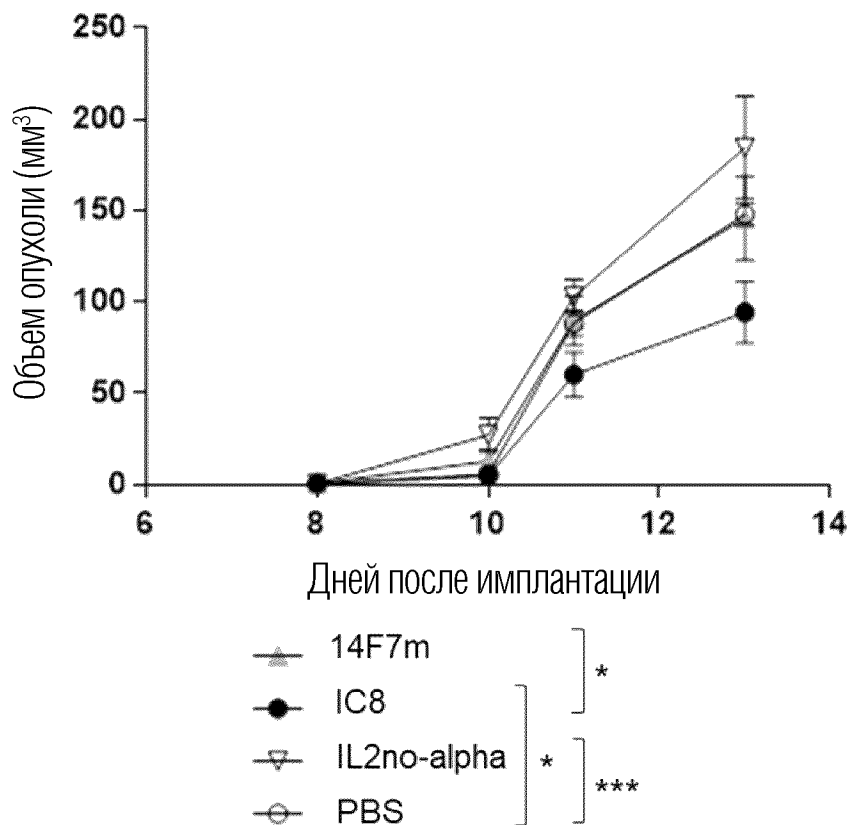
ФИГ. 23В



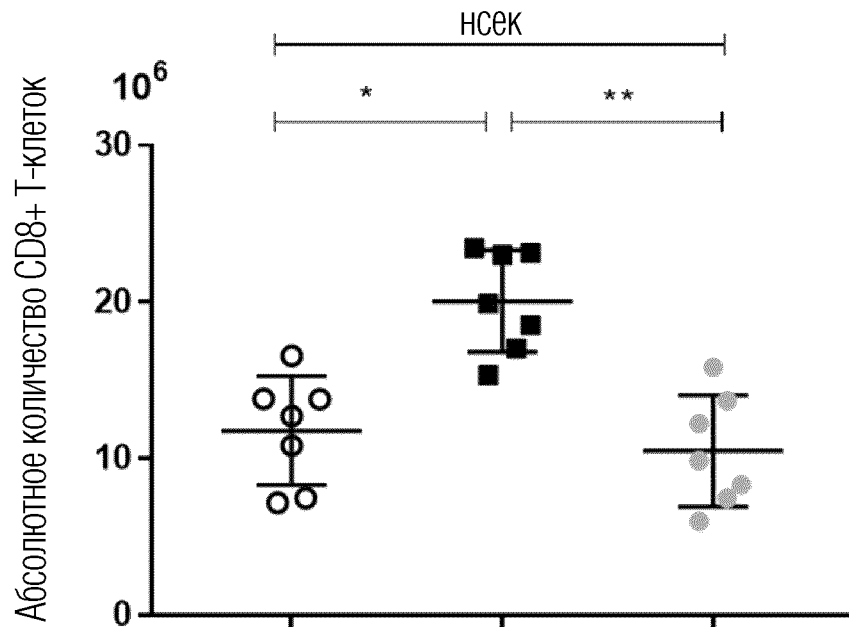
ФИГ. 23С



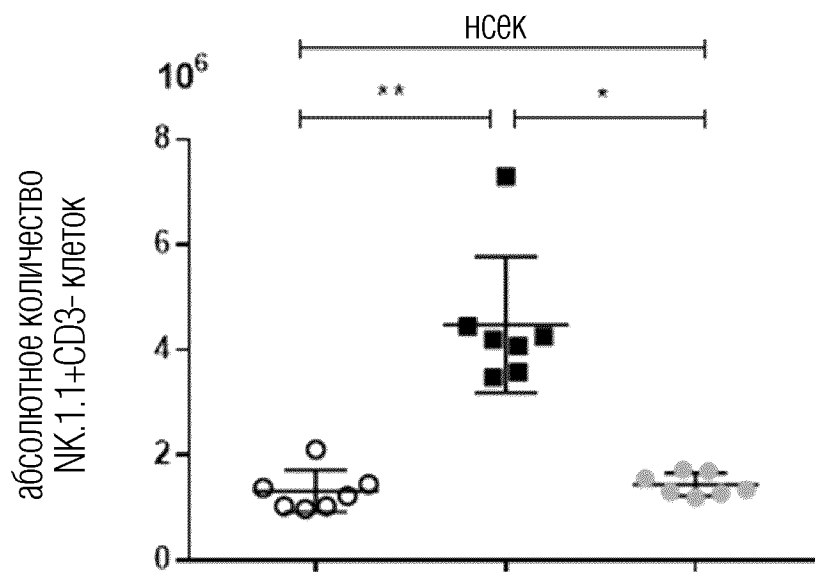
ФИГ. 23D



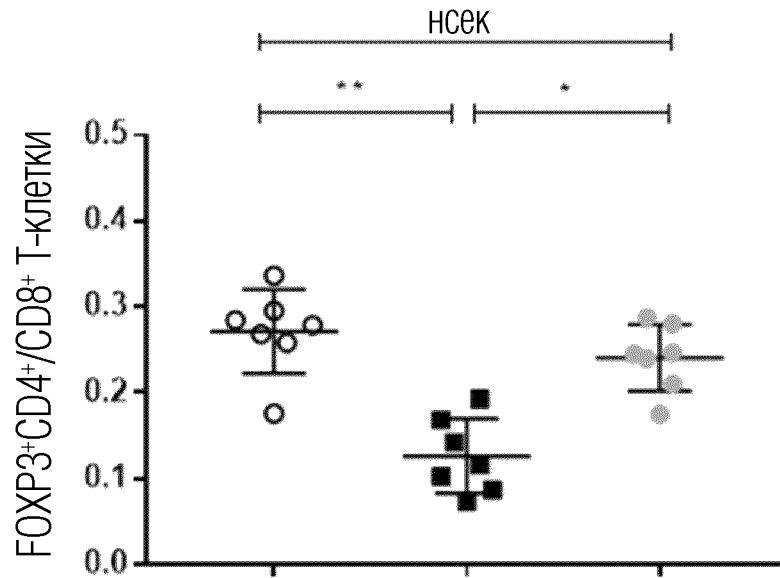
ФИГ. 24А



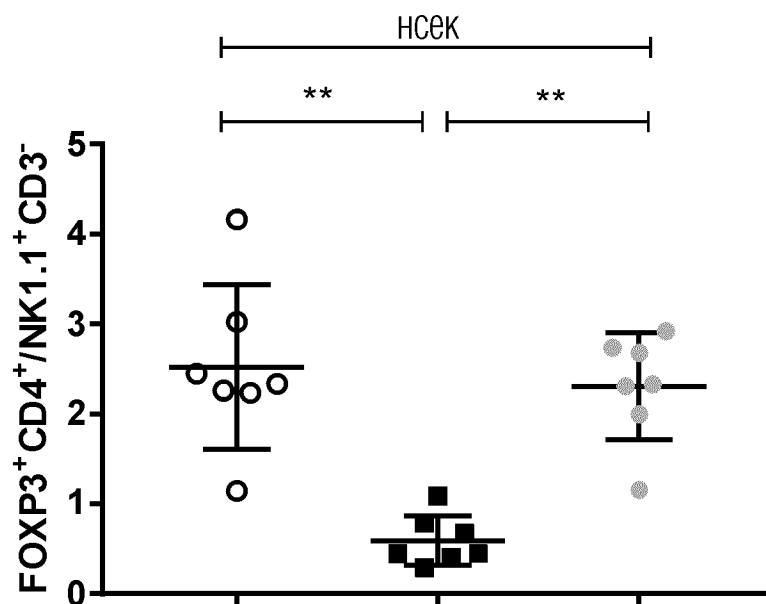
ФИГ. 24В



ФИГ. 24С



ФИГ. 24D



ФИГ. 24Е

