

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491543 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.03

(22) Дата подачи заявки
2022.12.13

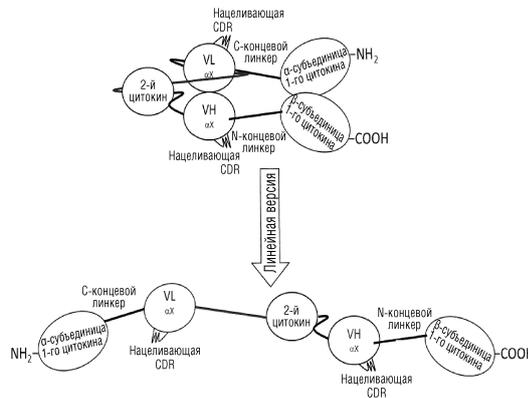
(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(54) СЛИТЫЕ БЕЛКИ С ДВУМЯ ЦИТОКИНАМИ, СОДЕРЖАЩИЕ МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНЫЕ ЦИТОКИНЫ

(31) 63/265,339; 63/320,750; 63/328,990
(32) 2021.12.13; 2022.03.17; 2022.04.08
(33) US
(86) PCT/US2022/081460
(87) WO 2023/114775 2023.06.22
(88) 2023.09.21

(71) Заявитель:
ДЕКА БАЙОСАЙЕНСИЗ, ИНК. (US)
(72) Изобретатель:
Мамм Джон (US)
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к композиции слитого белка с двумя цитокинами, фармацевтической композиции и/или их составу, содержащим мультисубъединичные цитокины с субъединицами альфа и бета, такие как IL-12 или IL-27, слитые с каркасной системой на основе одноцепочечного переменного фрагмента, где второй цитокин присоединен в шарнирной области scFv. Также изобретение относится к способам применения композиции слитого белка с двумя цитокинами для лечения злокачественной опухоли, воспалительных заболеваний или нарушений и иммунных или иммуноопосредуемых заболеваний или нарушений.



202491543

A1

A1

202491543

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 581528EA/081

СЛИТЫЕ БЕЛКИ С ДВУМЯ ЦИТОКИНАМИ, СОДЕРЖАЩИЕ МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНЫЕ ЦИТОКИНЫ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке США номер 63/265339, поданной 13 декабря 2021 года, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

ССЫЛКА НА ЭЛЕКТРОННЫЙ СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Содержание электронного списка последовательностей (039451-00083_Sequence-Listing.xml; размер: 76662 байт; и дата создания: 13 декабря 2022 года) включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, и, более конкретно, к новому слитому белку с двумя цитокинами, содержащему интерлейкин 12 ("IL-12") или интерлейкин IL-27 в комбинации с другими регулирующими иммунитет цитокинами, к способам лечения воспалительных и иммунных заболеваний или состояний, и/или к способам лечения злокачественной опухоли.

ВВЕДЕНИЕ

[0004] IL-12 представляет собой гетеродимерный цитокин массой 70 кДа, который является прототипным поляризующим Т-хелперы 1 (Th1) цитокином (Mossman, 1989; Athie-Morales, 2004). IL-12 демонстрирует мощный противоопухолевый иммунитет через активацию CD8⁺ Т-клеток (Henry, 2008; Vacaflores, 2017; Chowdhury, 2011), NK-клеток (Martinović, 2015; Parihar, 2002; Zhang, 2008), CD4⁺ Т-клеток (Yoo, 2002; Vacaflores1, 2016) и в ограниченной степени моноцитов (Coma, 2006). Таким образом, IL-12 преимущественно усиливает антигенспецифическую активацию Т-клеток, и одновременно имеет частичное сопряжение с врожденной иммунной системой через умеренную стимуляцию как NK-клеток, так и моноцитов.

[0005] Интерферон-альфа (IFN α -2a) представляет собой мономерный интерферон типа I, который прямо индуцирует созревание дендритных клеток (Simmons, 2012; Gessani, 2014; Padovan, 2002) и усиливает цитотоксическую функцию CD8⁺ Т-клеток (Hiroishi, 2000; Kolumam, 2005; 2019). Таким образом, IFN α -2a имеет более выраженную функцию во врожденной иммунной системе по сравнению с его более ограниченным воздействием на адаптивный иммунный ответ.

[0006] Противоопухолевые эффекты IL-12 оценивались доклинически и клинически (Brunda, 1993; Atkins, 1997), где вследствие токсичности проводилась оценка прямой внутриопухолевой инъекции и было выявлено, что она является лучшей, чем клиническое введение (Herpen, 2004; Li S., 2005; Sabel, 2004).

[0007] Аналогичным образом, IFN α -2a был оценен доклинически и в пегилированной форме клинически (Lyrdal, 2009; Sunela, 2009; Medrano, 2017) и одобрен

для использования при некоторых видах злокачественной опухоли (How, 2020).

[0008] Таким образом, учитывая необходимость как запуска противоопухолевого иммунного ответа (Nemunaitis, 2005), так и стимуляции CD8⁺, CD4⁺ и NK-клеток для обеспечения надежной противоопухолевой функции, автор изобретения обнаружил, что комбинирование IFN α -2a и IL-12 на системе нацеливания с использованием двойного цитокинового каркаса (известной как "DiakineTM" ("DK"), которая в общем описана в одновременно рассматриваемой заявке США номер 17/110104), для нацеливания этих двух цитокинов на микроокружение опухоли, усиливает стимуляцию *in situ* за счет индукции дифференцировки моноцитов M2 в функциональные антигенпрезентирующие клетки (Vidarthi, 2018) и усиливает функцию T- и NK-клеток. Комбинация этих двух цитокинов объединяет стимуляцию адаптивной и врожденной иммунной систем.

[0009] Интерлейкин 10 (IL-10) представляет собой нековалентный гомодимерный цитокин со структурным сходством с интерфероном γ (IFN γ). Рецептор IL-10 состоит из двух молекул рецептора 1 IL-10 (IL10R1) и двух молекул рецептора 2 IL-10 (IL10R2) (Moore, 2001). Рецептор IL-10 экспрессируется на поверхности большинства гемопоэтических клеток и в высокой степени экспрессируется на макрофагах и T-клетках.

[0010] Хотя сообщалось, что IL-10 является как иммуносупрессивным (Schreiber, 2000), так и иммуностимулирующим цитокином (Mumm, 2011), клиническая оценка IL-10 для лечения пациентов с болезнью Крона привела к обратному дозозависимому эффекту (Fedorak, 2000; Schreiber, 2000), тогда как лечение онкологических пациентов пегилированным IL-10 приводило к титруемым по дозе мощным противоопухолевым ответам (Naing, 2018).

[0011] Сообщалось, что IL-10 подавляет IL-2-индуцируемую выработку IFN γ , секретируемого как NK, так и CD4⁺ T-клетками (Scott, 2006), но также сообщается, что он действует в качестве кофактора для IL-2-индуцируемой пролиферации CD8⁺ T-клеток (Groux, 1998).

[0012] Автор изобретения также обнаружил, что объединение IL-10 и IL-12 в системе нацеливания цитокиновой каркасной системе DK для нацеливания этих двух цитокинов в микроокружение опухоли усиливает функцию NK- и T-клеток.

[0013] IL-27 является представителем семейства IL-12 и представляет собой гетеродимерный цитокин, состоящий из двух субъединиц, p28 и гена 3, индуцируемого вирусом Эпштейна-Барр ("EIB3"). Известно, что IL-27 индуцирует IL-10. IL-28 представляет собой интерферон 3 типа, который вызывает высвобождение IFN α -2a, стимулируя CD8⁺ T-клетки. IL-28 включает две изоформы: IL-28A и IL-28B. IL-29, который имеет гомологичную последовательность с IL-28, также представляет собой интерферон 3 типа, который вовлечен как во врожденный, так и в адаптивный иммунный ответ.

[0014] Автор изобретения также обнаружил, что другие комбинации цитокинов, включая, но не ограничиваясь ими, IL-12 с интерлейкином-28 (IL-28) или интерлейкином-29 (IL-29), интерлейкин-27 (IL-27) с IFN α -2a, IL-28 или IL-29, могут быть включены в

описанную в настоящем описании систему двойного цитокинового каркаса (см., например, фиг.1). Кратко, система двойного цитокинового каркаса позволяет слияние мультисубъединичных цитокинов (например, включая, но не ограничиваясь ими, IL-12, IL-27) с концами каркасной системы, содержащей антигенсвязывающий домен или одноцепочечную переменную область (scFv) моноклонального антитела человека против ВИЧ или против вируса Эбола в комбинации со вторым цитокином (например, IL-2, IL-4, IFN α -2a, IL-10), где второй цитокин слит с шарнирной областью антигенсвязывающего домена или scFv.

[0015] Автор изобретения также обнаружил, что система двойного цитокинового каркаса позволяет слияние мультисубъединичных цитокинов (например, IL-12, IL-27) с концами каркасной системы, содержащей антигенсвязывающий домен или scFv моноклонального антитела человека против ВИЧ или против вируса Эбола, в комбинации с мономерным цитокином (например, IFN α , IL-28, IL-29) или другим мультисубъединичным цитокином (например, IL-10, IL-12, IL-27).

[0016] Как описано ранее в патенте США 10858412, каркасная система, включающая неиммуногенные переменные области тяжелой цепи ("VH") и переменные области легкой цепи ("VL"), обеспечивала получение вариантных молекул IL-10 с увеличенным временем полужизни, которые надлежащим образом сворачивались и оставались функционально активными. Включение IL-10 в каркасную систему продемонстрировало усиление функции IL-10 как в отношении воспалительных клеток (например, моноциты/макрофаги/дендритные клетки), так и в отношении иммунных клеток (например, CD8+ Т-клетки). См., патент США 10858412; поданный 6 марта 2020 года в качестве заявки США 16/811718, включенной в качестве ссылки в полном объеме. Настоящая заявка совершенствует ранее открытую систему двойного цитокинового каркаса на основе IL-10 путем подстановки других цитокинов на мультисубъединичной основе (например, IL-12, IL-27, среди многих других) вместо IL-10 и дополнительного включения второго цитокина в новый слитый белок, который аддитивно или синергически усиливает биологию мультисубъединичного цитокина (например, IL-12 или IL-27), для лечения воспалительных заболеваний, иммунных заболеваний и/или злокачественной опухоли.

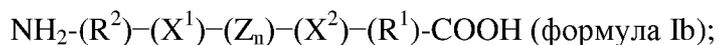
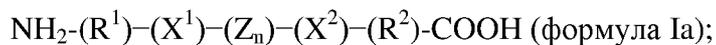
ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ АСПЕКТОВ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0017] Настоящее изобретение, в общем, относится к слитому белку с двумя цитокинами.

[0018] Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку с двумя цитокинами, содержащему первый цитокин, который представляет собой мультисубъединичный цитокин, такой как, но не ограничиваясь ими, IL-10, IL-12 или IL-27 и их варианты, причем каждая из субъединиц слита либо с переменной областью тяжелой цепи ("VH"), либо с переменной областью легкой цепи ("VL") scFv или антигенсвязывающего фрагмента, полученного из моноклонального антитела, и второй цитокин, причем второй цитокин присоединен между областями VH и VL scFv или

антигенсвязывающего фрагмента. В определенных вариантах осуществления первый цитокин представляет собой любой мультисубъединичный цитокин, такой как, но не ограничиваясь ими, IL-10, IL-12 или IL-27, или их функциональные варианты, которые включают одну или несколько аминокислотную замену(замен), которые усиливают функцию IL-10, IL-12 или IL-27. Слитый белок, кроме того, включает второй цитокин, который представляет собой цитокин, который действует в тандеме с мультисубъединичным цитокином (например, IL-10, IL-12 или IL-27), так что возникает аддитивный или синергический эффект, когда первый и вторые цитокины нацеливаются на специфический антиген посредством областей VH и VL scFv или антигенсвязывающего фрагмента. Эти вторые цитокины могут представлять собой любой цитокин, который включает, среди прочих, IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-15, IL-21 IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, интерфероны- α , - β , - γ , TGF- β или факторы некроза опухоли - α , - β , основной FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11 или IL-13. Слитый белок с двумя цитокинами также может включать пересадку или замену определяющих комплементарность областей ("CDR") в scFv с CDR из любого нацеливающего антитела, которое нацеливает слитый белок с двумя цитокинами на антиген-мишень.

[0019] В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку с двумя цитокинами формулы (Ia) или (Ib):



где

"R¹" представляет собой альфа-субъединицу из любого первого мультисубъединичного цитокина, предпочтительно либо альфа-субъединицу (p35) IL-12, либо альфа-субъединицу (p28) IL-27, более предпочтительно субъединицу SEQ ID No: 1, или 5, или 17, или 19;

"R²" представляет собой бета-субъединицу из любого первого мультисубъединичного цитокина, предпочтительно либо субъединицу (p40) IL-12, либо бета-субъединицу (EBI3) IL-27, более предпочтительно субъединицу SEQ ID No: 3, или 7, или 18, или 20;

где, когда R¹ представляет собой альфа-субъединицу первого цитокина, R² представляет собой бета-субъединицу первого цитокина; или, когда R¹ представляет собой p35, R² представляет собой p40; или, когда R¹ представляет собой p28, R² представляет собой EBI3; или, когда R¹ представляет собой SEQ ID No: 1, 17 или 19, R² представляет собой SEQ ID No: 3, 18 или 20; или, когда R¹ представляет собой SEQ ID No: 5, R² представляет собой SEQ ID No: 7;

"X¹" представляет собой область VL или VH, полученную из первого моноклонального антитела; "X²" представляет собой область VH или VL, полученную из первого моноклонального антитела; где, когда X¹ представляет собой VL, X² представляет собой VH, или, когда X¹ представляет собой VH, X² представляет собой VL;

"Z" представляет собой любой цитокин, который усиливают биологическую функцию мультисубъединичного цитокина, предпочтительно IFN α -2a, IL-28, IL-29; и

"n" представляет собой целое число, выбранное из 0-2.

В одном варианте осуществления VH и VL имеют форму scFv, полученного из антитела человека против вируса Эбола. В другом варианте осуществления 6 CDR (CDR 1-3 из VH и CDR 1-3 из VL) scFv, полученного из антитела человека против вируса Эбола, заменены или подвергнуты пересадке на 6 CDR из второго моноклонального антитела, которое позволяет нацеливание слитого белка с двумя цитокинами на конкретную мишень, такую как, но не ограничиваясь ими, ферменты, рецепторы, внеклеточные белки или внутриклеточный белок, такой как белки, ассоциированные с опухолями (например, опухолеассоциированные антигены (ТАА)), воспалительным ответом или аутоиммунными заболеваниями. Второе антитело может включать, но не ограничиваясь ими, антитело против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различных мишеней иммунных точек контроля, таких как, но не ограничиваясь ими, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β Trap; MAdCAM, субъединицы интегрин β 7; интегрин α 4 β 7; интегрин α 4; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1 или SR-J1.

[0020] В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку с двумя цитокинами, содержащему IL-12, причем указанный слитый белок имеет формулу (IIa) или (IIb):

$\text{NH}_2\text{-(p35)-(L)-(X}^1\text{)-(L)-(Z}_n\text{)-(L)-(X}^2\text{)-(L)-(p40)-COOH}$ (формула IIa);

$\text{NH}_2\text{-(p40)-(L)-(X}^1\text{)-(L)-(Z}_n\text{)-(L)-(X}^2\text{)-(L)-(p35)-COOH}$ (формула IIb);

где

"p35" представляет собой альфа-субъединицу IL-12, имеющую последовательность SEQ ID No: 1, 17 или 19;

"p40" представляет собой бета-субъединицу IL-12, имеющую последовательность SEQ ID No: 3, 18 или 20;

"L" представляет собой любой линкер;

"X¹" представляет собой область VL или VH, полученную из первого моноклонального антитела; "X²" представляет собой область VH или VL, полученную из первого моноклонального антитела; где, когда X¹ представляет собой VL, X² представляет собой VH, или, когда X¹ представляет собой VH, X² представляет собой VL;

"Z" представляет собой цитокин, выбранный из IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, мономера IL-10, IL-15, IL-21 IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, интерферонов- α , - β , - γ , TGF- β или факторов некроза опухоли - α , - β , основного FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11 или IL-13; и

"n" представляет собой целое число, выбранное из 0-2.

В одном варианте осуществления VH и VL имеют форму scFv, полученного из

антитела человека против вируса Эбола. В другом варианте осуществления 6 CDR (CDR 1-3 из VH и CDR 1-3 из VL) scFv, полученного из антитела человека против вируса Эбола, заменены или подвергнуты пересадке на 6 CDR из второго моноклонального антитела, которое позволяет нацеливание слитого белка с двумя цитокинами на конкретную мишень, такую как, но не ограничиваясь ими, ферменты, рецепторы, внеклеточные белки или внутриклеточный белок, такой как белки, ассоциированные с опухолями (например, опухолеассоциированные антигены (ТАА)), воспалительным ответом или аутоиммунными заболеваниями. Второе антитело может включать, но не ограничиваясь ими, антитело против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различных мишеней иммунных точек контроля, таких как, но не ограничиваясь ими, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β Trap; MAdCAM, субъединицы интегрин β 7; интегрин α 4 β 7; интегрин α 4; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1 или SR-J1.

[0021] В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку с двумя цитокинами, содержащему IL-27, прием указанный слитый белок имеет формулу (IIIa) или (IIIb):

$\text{NH}_2\text{-(p28)-(L)-(X}^1\text{)-(L)-(Z}_n\text{)-(L)-(X}^2\text{)-(L)-(EBI3)-COOH}$ (формула IIIa);

$\text{NH}_2\text{-(EBI3)-(L)-(X}^1\text{)-(L)-(Z}_n\text{)-(L)-(X}^2\text{)-(L)-(p28)-COOH}$ (формула IIIb);

где

"p28" представляет собой альфа-субъединицу IL-27, имеющую последовательность SEQ ID No: 5;

"EBI3" представляет собой бета-субъединицу IL-27, имеющую а последовательность SEQ ID No: 7;

"L" представляет собой любой линкер;

"X¹" представляет собой область VL или VH, полученную из первого моноклонального антитела; "X²" представляет собой область VH или VL, полученную из первого моноклонального антитела; где, когда X¹ представляет собой VL, X² представляет собой VH, или, когда X¹ представляет собой VH, X² представляет собой VL;

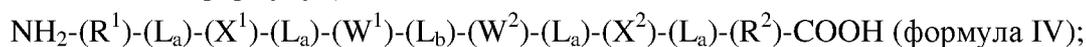
"Z" представляет собой цитокин, выбранный из IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, мономера IL-10, IL-15, IL-21 IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, интерферонов- α , - β , - γ , TGF- β или факторов некроза опухоли - α , - β , основного FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11 или IL-13; и

"n" представляет собой целое число, выбранное из 0-2.

В одном варианте осуществления VH и VL имеют форму scFv, полученного из антитела человека против вируса Эбола. В другом варианте осуществления 6 CDR (CDR 1-3 из VH и CDR 1-3 из VL) scFv, полученного из антитела человека против вируса Эбола, заменены или подвергнуты пересадке на 6 CDR из второго моноклонального антитела, которое позволяет нацеливание слитого белка с двумя цитокинами на конкретную

мишень, такую как, но не ограничиваясь ими, ферменты, рецепторы, внеклеточные белки или внутриклеточный белок, такой как белки, ассоциированные с опухолями (например, опухолеассоциированные антигены (ТАА)), воспалительным ответом или аутоиммунными заболеваниями. Второе антитело может включать, но не ограничиваться ими, антитело против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различных мишеней иммунных точек контроля, таких как, но не ограничиваясь ими, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β Trap; MAdCAM, субъединицы интегрин β 7; интегрин α 4 β 7; интегрин α 4; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1 или SR-J1.

[0022] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к слитому белку с двумя цитокинами, содержащему два мультисубъединичных белка, причем указанный слитый белок имеет формулу (IV):



где

"R¹" представляет собой альфа-субъединицу первого цитокина, такого как IL-12 или IL-27, или первый мономер гомодимерного цитокина, такого как IL-10, где R¹ предпочтительно представляет собой p40;

"R²" представляет собой бета-субъединицу первого цитокина, такого как IL-12 или IL-27, или второй мономер гомодимерного цитокина, такого как IL-10, где R² предпочтительно представляет собой p35;

"L_a" представляет собой любой линкер; предпочтительно (GGGGS)₄ SEQ ID No: 45, или (GGGGS)₅ SEQ ID No: 44;

"L_b" представляет собой любой линкер; предпочтительно GGGSGGG SEQ ID No: 43 или (GGGGS)₃ SEQ ID No: 46;

"X¹" представляет собой область VL или VH, полученную из первого моноклонального антитела; "X²" представляет собой область VH или VL, полученную из первого моноклонального антитела; где, когда X¹ представляет собой VL, X² представляет собой VH, или, когда X¹ представляет собой VH, X² представляет собой VL;

"W¹" представляет собой альфа-субъединицу первого цитокина, такого как IL-12 или IL-27, или первый мономер гомодимерного цитокина, такого как IL-10, предпочтительно первый мономер IL-10;

"W²" представляет собой бета-субъединицу первого цитокина, такого как IL-12 или IL-27, или второй мономер гомодимерного цитокина, такого как IL-10, предпочтительно второй мономер IL-10.

В одном варианте осуществления VH и VL имеют форму scFv, полученного из антитела человека против вируса Эбола. В другом варианте осуществления 6 CDR (CDR 1-3 из VH и CDR 1-3 из VL) scFv, полученного из антитела человека против вируса Эбола, заменены или подвергнуты пересадке на 6 CDR из второго моноклонального антитела,

которое позволяет нацеливание слитого белка с двумя цитокинами на конкретную мишень, такую как, но не ограничиваясь ими, ферменты, рецепторы, внеклеточные белки или внутриклеточный белок, такой как белки, ассоциированные с опухолями (например, опухолеассоциированные антигены (ТАА)), воспалительным ответом или аутоиммунными заболеваниями. Второе антитело может включать, но не ограничиваться ими, антитело против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различных мишеней иммунных точек контроля, таких как, но не ограничиваясь ими, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β Trap; MAdCAM, субъединицы интегрин β 7; интегрин α 4 β 7; интегрин α 4; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1 или SR-J1.

[0023] В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку с двумя цитокинами, содержащему два мультисубъединичных белка, причем указанный слитый белок имеет формулу (V):

$$\text{NH}_2\text{-(P35)\text{-}(L_a)\text{-}(X^1)\text{-}(L_a)\text{-}(IL10_{\text{мономер}})\text{-}(L_b)\text{-}(IL10_{\text{мономер}})\text{-}(L_a)\text{-}(X^2)\text{-}(L_a)\text{-}(P40)\text{-COOH}$$

(формула Va);

$$\text{NH}_2\text{-(P40)\text{-}(L_a)\text{-}(X^1)\text{-}(L_a)\text{-}(IL10_{\text{мономер}})\text{-}(L_b)\text{-}(IL10_{\text{мономер}})\text{-}(L_a)\text{-}(X^2)\text{-}(L_a)\text{-}(P35)\text{-COOH}$$

(формула Vb);

где

"p35" представляет собой альфа-субъединицу IL-12, имеющую последовательность SEQ ID No: 1, 17 или 19;

"p40" представляет собой бета-субъединицу IL-12, имеющую последовательность SEQ ID No: 3, 18 или 20;

"L_a" представляет собой любой линкер; предпочтительно (GGGGS)₄ SEQ ID No: 45 или (GGGGS)₅ SEQ ID No: 44;

"L_b" представляет собой любой линкер; предпочтительно GGGSGGG SEQ ID No: 43 или (GGGGS)₃ SEQ ID No: 46;

"X¹" представляет собой область VL или VH, полученную из первого моноклонального антитела; "X²" представляет собой область VH или VL, полученную из первого моноклонального антитела; где, когда X¹ представляет собой VL, X² представляет собой VH, или, когда X¹ представляет собой VH, X² представляет собой VL;

"IL10_{мономер}" представляет собой мономер IL-10, имеющий последовательность SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 14 или 16, предпочтительно SEQ ID No: 16.

В одном варианте осуществления VH и VL имеют форму scFv, полученного из антитела человека против вируса Эбола. В другом варианте осуществления 6 CDR (CDR 1-3 из VH и CDR 1-3 из VL) scFv, полученного из антитела человека против вируса Эбола, заменены или подвергнуты пересадке на 6 CDR из второго моноклонального антитела, которое позволяет нацеливание слитого белка с двумя цитокинами на конкретную мишень, такую как, но не ограничиваясь ими, ферменты, рецепторы, внеклеточные белки

или внутриклеточный белок, такой как белки, ассоциированные с опухолями (например, опухолеассоциированные антигены (ТАА)), воспалительным ответом или аутоиммунными заболеваниями. Второе антитело может включать, но не ограничиваться ими, антитело против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различных мишеней иммунных точек контроля, таких как, но не ограничиваясь ими, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β Trap; MAdCAM, субъединицы интегрин β 7; интегрин α 4 β 7; интегрин α 4; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1 или SR-J1.

[0024] В других аспектах настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует мультисубъединичный слитый белок с двумя цитокинами. Она может включать молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует слитый белок с двумя цитокинами, соответствующий формулам (Ia), (Ib), (IIa), (IIb), (IIIa), (IIIb), (IV), (Va) и (Vb).

[0025] В других аспектах настоящее изобретение относится к способам получения и очистки слитого белка с двумя цитокинами. В одном варианте осуществления способ получения слитого белка с двумя цитокинами включает рекомбинантную экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок с двумя цитокинами.

[0026] В других аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли, включающему введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества слитого белка с двумя цитокинами.

[0027] В других аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительных заболеваний или состояний, включающему введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества слитого белка с двумя цитокинами. Предпочтительно, воспалительное заболевание представляет собой болезнь Крона, псориаз и/или ревматоидный артрит.

[0028] В других аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения иммунных заболеваний или состояний, включающему введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества слитого белка с двумя цитокинами.

[0029] В других аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения, ингибирования и/или облегчения сепсиса и/или септического шока и ассоциированных с ними симптомов.

[0030] Приведенное выше упрощенное изложение репрезентативных аспектов служит для обеспечения базового понимания настоящего изобретения. Это краткое изложение не является обширным обзором всех предусматриваемых аспектов и не предназначено ни для идентификации ключевых или критических элементов всех аспектов, ни для ограничения объема каких-либо или всех аспектов настоящего изобретения. Его единственная цель состоит в том, чтобы представить один или несколько аспектов в упрощенной форме в качестве вступления к более подробному описанию

изобретения, которое следует ниже. Для достижения вышеизложенного один или несколько аспектов настоящего изобретения включают признаки, описанные и иллюстративно указанные в формуле изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0031] На фиг.1 представлена схематическая диаграмма слитого белка с двумя цитокинами в свернутой и линейной форме.

[0032] На фиг.2 представлена схематическая диаграмма, которая является репрезентативной для слитого белка с двумя цитокинами, полученного в рамках настоящего изобретения, где слитый белок с двумя цитокинами включает присоединенные на концах субъединицы IL-12 α (p35) и IL-12 β (p40), где второй цитокин включен в линкер scFv между VH и VL из антитела против X (например, из антитела против вируса Эбола). 6 CDR (3 из VH и 3 из VL) необязательно могут быть замещены или подвергнуты пересадке на 6 CDR из второго антитела (например, такого как антитела, которые нацелены на ТАА, такие как антитело против HER2, против EGFR, против VEGFR1 или против VEGFR2).

[0033] На фиг.3 представлена схематическая диаграмма, которая является репрезентативной для слитого белка с двумя цитокинами, полученного в рамках настоящего изобретения, где слитый белок с двумя цитокинами включает присоединенные на концах субъединицы IL-27 α (p28) и IL-27 β (EBI3), где второй цитокин включен в линкер scFv между VH и VL из антитела против X (например, из антитела против вируса Эбола). 6 CDR (3 из VH и 3 из VL) необязательно могут быть замещены или подвергнуты пересадке на 6 CDR из второго антитела (например, такого как антитела, которые нацелены на ТАА, такие как антитело против HER2, против EGFR, против VEGFR1 или против VEGFR2).

[0034] На фиг.4 представлена схематическая диаграмма, которая является репрезентативной для слитого белка с двумя цитокинами, содержащего IL-27 и IL-28, называемого "DK27²⁸".

[0035] На фиг.5 представлена схематическая диаграмма, которая является репрезентативной для слитого белка с двумя цитокинами, содержащего IL-27 и IL-29, называемого "DK27²⁹".

[0036] На фиг.6 представлена схематическая диаграмма, на которой изображена одна из ранее описанных конструкций слитого белка IL-10, где мономеры IL-10 присоединены на концах к каркасу, содержащему scFv, описанный в патенте США 10858412.

[0037] На фиг.7 представлена схематическая диаграмма, которая является репрезентативным примером слитого белка с двумя цитокинами, содержащего два мультисубъединичных (или димерных) цитокина, в частности, слитого белка с двумя цитокинами, содержащего IL-12 и IL-10, называемого DK12¹⁰.

[0038] На фиг.8 представлена схематическая диаграмма, которая является репрезентативным примером слитого белка с двумя цитокинами, содержащего два

мультисубъединичных (или димерных) цитокина, в частности, слитого белка с двумя цитокинами, содержащего IL-27 и IL-10, называемого DK27¹⁰.

[0039] На фиг.9 представлен график, демонстрирующий, что DK12¹⁰ (EGFR), в котором используются стандартные линкеры, такие как (GGGGGS)₃, между IL-10 и scFv и между IL-12 и scFv, имеет частичный цитолитический эффект на злокачественные клетки-мишени в комбинации с ViTE.

[0040] На фиг.10 представлен график, демонстрирующий, что DK12¹⁰ (EGFR), в котором используются удлиненные линкеры между IL-10 и scFv и между IL12 и scFv, имеет улучшенный цитолитический эффект на злокачественные клетки-мишени в комбинации с ViTE.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0041] Иллюстративные аспекты описаны в настоящем описании в контексте слитого белка с двумя цитокинами, содержащего первый мультисубъединичный цитокин (такой как IL-12 или IL-27), способов получения слитого белка с двумя цитокинами, содержащего первый мультисубъединичный цитокин (такой как IL-12 или IL-27), и способов применения слитого белка с двумя цитокинами, содержащего первый мультисубъединичный цитокин (такой как IL-12 или IL-27), для лечения воспалительных заболеваний или состояний, иммунных заболеваний или состояний, лечения и/или предупреждения злокачественной опухоли. Специалистам в данной области будет понятно, что приведенное ниже описание носит исключительно иллюстративный характер и никоим образом не предназначено для его ограничения. Другие аспекты будут легко понятны специалистам в данной области техники, которые будут пользоваться настоящим описанием. Далее будет приведено подробное описание реализации иллюстративных аспектов, как проиллюстрировано на прилагаемых чертежах. На чертежах и в приведенном ниже описании будут использоваться одни и те же ссылочные индикаторы, насколько это возможно, для обозначения одних и тех же или подобных элементов.

[0042] Хотя ряд способов и материалов, сходных или эквивалентных способам и материалам, описанным в настоящем описании, можно использовать при применении на практике различных описанных вариантов осуществления, предпочтительные материалы и способы описаны в настоящем описании.

[0043] Если нет иных указаний, в вариантах осуществления, описанных в настоящем описании, используются общепринятые способы и методики молекулярной биологии, биохимии, фармакологии, химии и иммунологии, хорошо известные специалисту в данной области. Многие из общих методов конструирования и производства слитых белков с двумя цитокинами, содержащих первый мультисубъединичный цитокин (такой как IL-12 или IL-27), а также способы анализа для тестирования экспрессии и функции слитых белков с двумя цитокинами, включающих первый мультисубъединичный цитокин (такой как IL-12 или IL-27), являются хорошо известными способами, которые легко доступны и подробно описаны в данной области. См., например, Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989);

Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); A. L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., текущее дополнение). Химия пегилирования на основе N-концевого альдегида также хорошо известна в данной области.

Определения

[0044] Следующие термины будут использоваться для описания различных вариантов осуществления, обсуждаемых в настоящем документе, и подразумевают определения, как указано ниже.

[0045] Как используют в настоящем документе при описании различных вариантов осуществления, форма единственного числа включает множественное число упоминаемых объектов, если содержание явно не указывает на иное.

[0046] Термин "приблизительно" относится к отклонению в пределах 0,0001-5% от указанного числа или диапазона чисел. В одном варианте осуществления термин "приблизительно" относится к отклонению в пределах 1-10% от указанного числа или диапазона чисел. В другом варианте осуществления термин "приблизительно" относится к отклонению вплоть до 25% от указанного числа или диапазона чисел. В более конкретном варианте осуществления термин "приблизительно" относится к отклонению 1-25% с точки зрения гомологии нуклеотидной последовательности или гомологии аминокислотной последовательности по сравнению с последовательностью дикого типа.

[0047] Термин "мультисубъединичный цитокин" относится к белку-цитокину, содержащему по меньшей мере альфа-субъединицу и бета-субъединицу, образующие гетеродимер, или два мономера, образующие гомодимер. Для справки, мультисубъединичный цитокин может включать, среди прочего, IL-10, IL-12 или IL-27. Другие мультисубъединичные цитокины известны специалистам в данной области и могут быть подставлены на концы слитых белков с двумя цитокинами, описанных в настоящем описании.

[0048] Термины "интерлейкин-12" или "IL-12" относятся к белку, содержащему субъединицы альфа (p35) и бета (p40), нековалентно соединенные с образованием гетеродимера. Как используют в настоящем описании, если нет иных указаний, "интерлейкин-12" и "IL-12" относятся к любой форме IL-12, включая, но не ограничиваясь ими, формы человека, мыши или варианты формы. Например, термин "дикий тип" или "нативный", таким образом, будет соответствовать аминокислотной последовательности, которая наиболее часто встречается в природе для альфа- и бета-субъединиц. В одном варианте осуществления p35 представляет собой последовательность SEQ ID No: 1, 17 или 19, а p40 представляет собой последовательность SEQ ID No: 3, 18 или 20.

[0049] Термин "интерлейкин-27" или "IL-27" относится к белку, содержащему субъединицы альфа (p28) и бета (EBI3), нековалентно соединенные с образованием гетеродимера. Как используют в рамках изобретения, если нет иных указаний, "интерлейкин-12" и "IL-12" относятся к любой форме IL-12, включая, но не ограничиваясь

ими, форму человека; мыши или вариантную форму. Например, термин "дикий тип" или "нативный", таким образом, соответствует аминокислотной последовательности, которая наиболее часто встречается в природе для альфа- и бета-субъединиц. В одном варианте осуществления р28 представляет собой последовательность SEQ ID No: 5, а EB13 представляет собой последовательность SEQ ID No: 7.

[0050] Термины "интерлейкин-10" или "IL-10" относятся к белку, содержащему два мономера, которые соединены с образованием гомодимера. Как используют в настоящем описании, если нет иных указаний, "интерлейкин-10" и "IL-10" относятся к любой форме IL-10, включая, но не ограничиваясь ими, форму человека; мыши или вариантную форму. Например, термин "дикий тип" или "нативный", таким образом, будет соответствовать аминокислотной последовательности, которая наиболее часто встречается в природе для альфа- и бета-субъединиц. В одном варианте осуществления IL-10 человека представляет собой последовательность SEQ ID No: 31, IL-10 мыши представляет собой последовательность SEQ ID No: 37, вирусные формы IL-10 включают IL-10 EBV, имеющий SEQ ID No: 33, и IL-10 CMV, имеющий SEQ ID No: 35.

[0051] Термины "вариант", "аналог" и "мутеин" относятся к биологически активным производным эталонной молекулы, которые сохраняют желаемую активность, например, такую как противовоспалительная активность. Обычно термины "вариант", "варианты", "аналог" и "мутеин", относящиеся к полипептиду, относятся к соединению или соединениям, имеющим нативную полипептидную последовательность и структуру с одним или несколькими аминокислотными добавлениями, заменами (которые могут быть консервативными по своей природе) и/или делециями относительно нативной молекулы. По сути, термины "вариант IL-12", "вариант IL-27", "вариант молекулы IL-12", "вариант IL-27", "вариант IL-12", "вариант IL-27" и все их грамматические варианты и формы множественного числа считаются эквивалентными терминами, которые относятся к аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) IL-12 или IL-27, которая отличается от IL-12 или IL-27 дикого типа. Отличие аминокислотной последовательности IL-12 или IL-27 может заключаться в добавлениях, делециях или заменах внутри альфа-, бета-субъединицы или обеих субъединиц, так чтобы идентичность или гомология последовательностей составляла от 1 до 25%. Эти формы вариантов включают модификации форм гликозилирования (дегликозилированные или агликозилированные) белка. Формы вариантов IL-10 могут включать формы, обладающие повышенной или сниженной аффинностью связывания по сравнению с IL-10 дикого типа. Таким образом, в одном варианте осуществления форма варианта IL-10, имеющая повышенную или более высокую аффинность связывания, включает вариант IL-10 (с внутренним обозначением DV07) с SEQ ID No: 41, или вариант IL-10, обладающий сниженной или более низкой аффинностью связывания (с внутренним обозначением DV06), включает SEQ ID No: 39.

[0052] Термин "слитый белок" относится к комбинации или конъюгации двух или более белков или полипептидов, которая приводит к новому расположению белков,

которое обычно не существует в природе. Слитый белок является результатом ковалентного соединения двух или более белков или полипептидов. Два или более белка, составляющие слитый белок, могут быть расположены в любой конфигурации от N-конца ("NH₂") до C-конца ("COOH"). Так, например, C-конец одного белка может быть ковалентно соединен либо с C-концом, либо с N-концом другого белка. Иллюстративные слитые белки могут включать комбинацию (от N-конца к C-концу) альфа-субъединицы IL-12, и VH-домена антитела, и второго цитокина (такого как IFN-альфа, IL-28 или IL-29), и VL-домена (так что домены VH и VL образуют пару VH/VL) и бета-субъединицы IL-12. Другой иллюстративный слитый белок может включать комбинацию (от N-конца к C-концу) альфа-субъединицы IL-27, и VH-домена антитела, и второго цитокина (такого как IFN-альфа, IL-28 или IL-29), и VL-домена (так что домены VH и VL образуют пару VH/VL), и бета-субъединицы IL-27. Еще один иллюстративный слитый белок может включать комбинацию (от N-конца к C-концу) альфа-субъединицы IL-12, и VH-домена антитела, и первого мономера гомодимерного цитокина (такого как IL-10), и второго мономера гомодимерного цитокина (такого как IL-10), и VL-домена (так что домены VH и VL образуют пару VH/VL), и бета-субъединицы IL-12. В одном предпочтительном варианте осуществления репрезентативные формы мультисубъединичного слитого белка с двумя цитокинами могут включать гетеродимерные цитокины, такие как IL-12 или IL-27, в комбинации с мономерными цитокинами, такими как IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, интерфероны- α , - β , - γ , TGF- β , или факторы некроза опухоли- α , - β , основной FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11 или IL-13. В другом варианте осуществления мультисубъединичный слитый белок с двумя цитокинами может включать гетеродимерный цитокин, такой как IL-12 или IL-27, в комбинации с гомодимерным цитокином, таким как IL-10, варианты IL-10, IL-10 мыши, DV07 (SEQ ID No: 41) или DV06 (SEQ ID No: 39).

[0053] Термины "гомолог", "гомология", "гомологичный" или "по существу гомологичный" относятся к процентной идентичности между по меньшей мере двумя полинуклеотидными последовательностями или по меньшей мере двумя полипептидными последовательностями. Последовательности гомологичны друг другу, если последовательности имеют по меньшей мере примерно 50%, предпочтительно по меньшей мере примерно 75%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 80-85%, предпочтительно по меньшей мере примерно 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 95%-98% идентичность последовательностей на протяжении определенной длины молекул.

[0054] Термин "идентичность последовательности" относится к точному соответствию нуклеотида к нуклеотиду или аминокислоты к аминокислоте. Идентичность последовательностей может находиться в диапазоне от 100% идентичности последовательностей до 50% идентичности последовательностей. Процентная идентичность последовательностей может быть определена с использованием различных способов, включая, но не ограничиваясь ими, прямое сравнение информации о

последовательностях двух молекул (эталонная последовательность и последовательность с неизвестной процентной идентичностью с эталонной последовательностью) путем выравнивания последовательностей, подсчета точного количества совпадений между двумя выровненными последовательностями, деления на длину эталонной последовательности и умножения на 100. Для определения процентной идентичности можно использовать свободно доступные компьютерные программы.

[0055] Термины "субъект", "индивидуум" или "пациент" используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к позвоночному, предпочтительно млекопитающему. Млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, мышей, грызунов, обезьян, людей, сельскохозяйственных животных, спортивных животных и некоторых домашних питомцев.

[0056] Термин "введение" включает пути введения, которые позволяют применяемому активному ингредиенту выполнять намеченную функцию.

[0057] "Терапевтически эффективное количество", которое относится, например, к введению слитых белков с двумя цитокинами, описанных в настоящем документе, относится к достаточному количеству слитых белков с двумя цитокинами для стимуляции определенной биологической активности. Она может включать, например, подавление функции миелоидных клеток, усиление активности купферовских клеток, и/или отсутствие какого-либо эффекта на CD8⁺ Т-клетки или усиление активности CD8⁺ Т-клеток, а также блокаду активации Fc-рецептора тучными клетками или предотвращение дегрануляции. Таким образом, "эффективное количество" улучшает или предотвращает симптом или признак заболевания. Эффективное количество также означает количество, достаточное для того, чтобы обеспечить или облегчить диагностику.

[0058] Термины "лечить" или "лечение" относятся к способу уменьшения эффектов заболевания или состояния. Лечение также может относиться к способу устранения первопричины заболевания или состояния, а не только симптомов. Лечение может представлять собой любое снижение относительно нативных уровней и может представлять собой, но не ограничиваясь этим, полное устранение заболевания, состояния или симптомов заболевания или состояния.

Структура слитого белка с двумя цитокинами

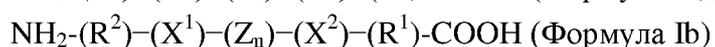
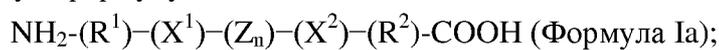
[0059] Настоящее изобретение обеспечивает усовершенствование варианта осуществления слитого белка IL-10, описанного ранее в патенте США 10858412 (поданном в качестве заявки США № 16/811718), который включен в качестве ссылки в полном объеме. На фиг.6 представлена схематическая диаграмма, на которой показана одна из ранее раскрытых конструкций слитого белка IL-10, описанных в патенте США 10858412. На фиг.1 представлено общее схематическое изображение того, как в настоящей заявке усовершенствован исходный слитый белок IL-10. Усовершенствование слитого белка IL-10 включает (1) замену мономеров IL-10 альфа- и бета-субъединицами мультисубъединичного цитокина и (2) включение второй молекулы цитокина между доменами VH и VL scFv (т.е. в шарнирной области scFv). Слитый белок с двумя

цитокинами, описанный в настоящей заявке, может быть сконструирован на каркасной системе, содержащей VH и VL (scFv), несущие альфа- и бета-субъединицу мультисубъединичного цитокина, где альфа-субъединица слита на N-конце и бета-субъединица слита на C-конце (или наоборот). В соответствии с термином, касающимся слияния с "концами", он означает, что альфа-(либо бета-) субъединица расположена на N-конце, а бета-(либо альфа)-субъединица расположена на C-конце слитого белка. Каркасная система содержит scFv, предпочтительно полученный из антитела, специфичного к ВИЧ или вирусу Эбола, предпочтительно scFv получен из антитела человека против вируса Эбола. Слитый белок с двумя цитокинами включает scFv (предпочтительно полученный из антитела человека против вируса Эбола), имеющий 6 определяющих комплементарность областей ("CDR"), где имеется 3 CDR (CDR 1-3) в VH и 3 CDR (CDR 1-3) в VL. Необязательно, области VH и VL способны нацеливать слитый белок с двумя цитокинами на специфический антиген. Это может быть достигнуто путем замены 6 областей CDR пары VH и VL (3 CDR в VH и 3 CDR в VL) на 6 областей CDR из VH и VL нацеливающего на рецептор или антиген антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Этот процесс также широко известен как пересадка CDR или трансплантация CDR. Специалисты в данной области способны заменить и оптимизировать пересадку или трансплантацию 6 CDR в каркасные области scFv или в каркас scFv, описанный в настоящем документе. Это является хорошо известными и практикуемыми способами, используемыми специалистами в данной области. 6 областей CDR, например, из scFv, полученного из антитела человека против вируса Эбола, можно заменить на 6 CDR из любого моноклонального антитела, которое любой специалист в данной области сможет определить, исходя из конкретной представляющей интерес мишени. Например, конкретная мишень может включать, но не ограничиваться ими, ферменты, рецепторы, внеклеточные белки или внутриклеточные белки, такие как белки, ассоциированные с опухолями (например, опухолеассоциированные антигены (TAA)), воспалительным ответом или аутоиммунными заболеваниями. Таким образом, 6 CDR, нацеленные на конкретную мишень, могут представлять собой любое антитело, включая, но не ограничиваясь ими, антитела, специфичные к EGFR; CD14; CD52; различным мишеням иммунных точек контроля, таким как, но не ограничиваясь ими, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β Trap; MAdCAM, субъединица интегрин β 7; интегрин α 4 β 7; интегрин α 4; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1 или SR-J1. Вышеупомянутый список является репрезентативным для возможных нацеливающих антител, которые могут быть включены в слитый белок с двумя цитокинами по настоящему изобретению, и специалист в данной области техники сможет понять, что в каркас могут быть пересажены CDR из других нацеливающих антител, особенно тех, которые нацелены на поверхностные маркеры на злокачественных опухолях или воспалительных тканях. В предпочтительном

варианте осуществления антитело представляет собой антитело против HER2, антитело против HER3, антитело против EGFR, антитело против VEGFR1, антитело против VEGFR2, антитело против BCMA, антитело против PSA, антитело против PSMA, антитело против CD19, антитело против CD20, антитело против CD22, антитело против CEA, антитело против GPC3 или антитело против CD14.

[0060] В первом аспекте настоящая заявка предусматривает слитый белок с двумя цитокинами, содержащий IL-12 или IL-27 и по меньшей мере один другой цитокин, при этом слитый белок с двумя цитокинами обладает комбинированной или синергической функциональностью по сравнению с IL-12 или IL-27 и другими слитыми конструкциями индивидуальных цитокинов. На фиг.1 представлена репрезентативная диаграмма усовершенствованного слитого белка с двумя цитокинами, содержащего альфа- и бета-субъединицы мультисубъединичного цитокина, слитые с концами слитого белка. В частности, усовершенствованный слитый белок с двумя цитокинами имеет ту же самую или практически ту же самую каркасную систему, состоящую из VH и VL scFv, при этом альфа- и бета-субъединицы IL-12 или IL-27, например, терминируют двойной слитый белок на N-конце и C-конце (см., например, фиг. 2-5). В некоторых вариантах осуществления субъединица IL-12 представляет собой альфа-субъединицу или p35 SEQ ID No: 1, 17 или 19, или бета-субъединицу или p40 SEQ ID No: 3, 18 или 20, где аминокислотная субъединица, слитая scFv, не имеет сигнального пептида или лидерной последовательности. В других вариантах осуществления субъединица IL-27 представляет собой альфа-субъединицу или p28 SEQ ID No: 5 или бета-субъединицу и EIB3 SEQ ID No: 7, где аминокислота, слитая с scFv, лишена сигнального пептида или лидерной последовательности. В определенных вариантах осуществления модификации одной или обеих субъединиц IL-12 или IL-27 могут включать добавления, делеции или замены. Эти модификации могут включать модификации, которые изменяют аффинность связывания (повышают или снижают), изменяют участки гликозилирования или снижают иммуногенность. В определенных вариантах осуществления участки гликозилирования в IL-27, предпочтительно в EIB3, модифицированы, более предпочтительно положения аминокислот 55-57 и/или 105-107 SEQ ID No: 7, еще более предпочтительно положения 57 и/или 107 SEQ ID No: 7, где замещен треонин. Второй цитокин конъюгирован со слитым белком с двумя цитокинами путем слияния между областями VH и VL scFv, т.е. в шарнирной области scFv (см., например, фиг.1-5). Слитый белок с двумя цитокинами способен образовывать функциональный белковый комплекс, в котором альфа- и бета-субъединицы гетеродимеризуются вместе со спариванием областей VH и VL с образованием пары, которая ассоциирует с образованием комплекса scFv.

[0061] В определенных вариантах осуществления слитый белок с двумя цитокинами, содержащий мультисубъединичный цитокин, представляет собой структуру, имеющую формулу Ia или Ib



где

"R¹" представляет собой альфа-субъединицу последовательности первого цитокина, выбранной из SEQ ID No: 1, 17, 19 или 5;

"R²" представляет собой бета-субъединицу последовательности первого цитокина, выбранной из SEQ ID No: 3, 18, 20 или 7;

где, когда R¹ представляет собой SEQ ID No: 1, 17 или 19, R² представляет собой SEQ ID No: 3, 18 или 20, или когда R¹ представляет собой SEQ ID No: 5, R² представляет собой SEQ ID No: 7;

"X¹" представляет собой область VL или VH, полученную из первого моноклонального антитела;

"X²" представляет собой область VH или VL, полученную из первого моноклонального антитела;

где, когда X¹ представляет собой VL, X² представляет собой VH, или, когда X¹ представляет собой VH, X² представляет собой VL.

"Z" представляет собой цитокин;

"n" представляет собой целое число, выбранное из 0-2.

[0062] В другом варианте осуществления слитый белок с двумя цитокинами представляет собой структуру, имеющую формулу IIa или IIb

NH₂-(p35)-(L)-(X¹)-(L)-(Z_n)-(L)-(X²)-(L)-(p40)-COOH (формула IIa);

NH₂-(p40)-(L)-(X¹)-(L)-(Z_n)-(L)-(X²)-(L)-(p35)-COOH (формула IIb);

где

"p35" представляет собой последовательность SEQ ID No: 1, 17 или 19;

"p40" представляет собой последовательность SEQ ID No: 3, 18 или 20;

"L" представляет собой линкер;

"X¹" представляет собой область VL или VH, полученную из первого моноклонального антитела;

"X²" представляет собой область VH или VL, полученную из первого моноклонального антитела;

где, когда X¹ представляет собой VL, X² представляет собой VH, или, когда X¹ представляет собой VH, X² представляет собой VL;

"Z" представляет собой цитокин, выбранный из IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, интерферонов-α, -β, -γ, TGF-β или факторов некроза опухоли-α, -β, основного FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11 или IL-13;

"n" представляет собой целое число, выбранное из 0-2.

[0063] В другом варианте осуществления слитый белок с двумя цитокинами представляет собой структуру, имеющую формулу IIIa или IIIb

NH₂-(p28)-(L)-(X¹)-(L)-(Z_n)-(L)-(X²)-(L)-(EVI3)-COOH (формула IIIa);

NH₂-(EVI3)-(L)-(X¹)-(L)-(Z_n)-(L)-(X²)-(L)-(p28)-COOH (формула IIIb);

где

"p28" представляет собой последовательность SEQ ID No: 5;

"EВI3" представляет собой последовательность SEQ ID No: 7;

"L" представляет собой линкер;

"X¹" представляет собой область VL или VH, полученную из первого моноклонального антитела;

"X²" представляет собой область VH или VL, полученную из первого моноклонального антитела;

где, когда X¹ представляет собой VL, X² представляет собой VH, или, когда X¹ представляет собой VH, X² представляет собой VL;

"Z" представляет собой цитокин, выбранный из IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, интерферонов- α , - β , - γ , TGF- β или факторов некроза опухоли- α , - β , основного FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11 или IL-13;

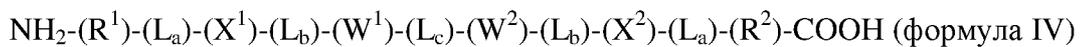
"n" представляет собой целое число, выбранное из 0-2.

[0064] В другом варианте осуществления области VH и VL происходят из антитела, фрагмента антитела или их антигенсвязывающего фрагмента. Антигенсвязывающий фрагмент включает, но не ограничивается ими, scFv, Fab, F(ab')₂, V-NAR, диатело или нанотело. Предпочтительно, VH и VL происходят из одноцепочечного переменного фрагмента ("scFv").

[0065] В другом варианте осуществления слитый белок с двумя цитокинами, содержащий первый мультисубъединичный цитокин (например, IL-12 или IL-27), включает пару VH и VL из одного антитела. Пара VH и VL выступает в качестве каркаса, к которому может быть присоединен первый мультисубъединичный цитокин, так что альфа- и бета-субъединицы мультисубъединичного цитокина могут быть способны гетеродимеризоваться в функционирующий цитокин. Поэтому специалисту в данной области техники будет понятно, что каркасы VH и VL, используемые в слитом белке, могут быть выбраны на основе желаемых физических признаков, необходимых для надлежащей гетеродимеризации первого мультисубъединичного цитокина (например, IL-12 или IL-27) и/или желая сохранить способность нацеливания на VH и VL. Аналогично, специалисту также будет понятно, что 6 CDR в паре VH и VL (3 CDR из VH и 3 CDR из VL) также могут быть заменены на 6 CDR из других антител для получения специфически нацеленного слитого белка. В одном варианте осуществления 3 CDR из VH и 3 CDR из VL (т.е. пара VH и VL) любого моноклонального антитела могут быть пересажены в каркасную систему. Также предусматривается, что, если слитый белок не предназначен для нацеливания на какой-либо конкретный антиген, пара VH и VL может быть выбрана в качестве каркаса, который не нацелен на какой-либо конкретный антиген (или представляет собой антиген с низкой распространенностью *in vivo*), например, пара VH и VL из антитела человека против ВИЧ и/или антитела человека против вируса Эбола. Слитый белок может содержать 1-4 переменных области. В другом варианте осуществления переменные области могут происходить из одного и того же антитела

или из по меньшей мере двух разных антител. Аминокислотная последовательность, кодирующая мультисубъединичные цитокины, слита с каркасом scFv без сигнальных пептидов (или лидерной последовательности).

[0066] В другом аспекте слитый белок с двумя цитокинами может содержать два мультисубъединичных белка. Например, слитый белок с двумя цитокинами может содержать первый цитокин, который представляет собой гетеродимер (такой как, но ограничиваясь ими, IL12 или IL27), а затем второй гомодимерный цитокин (такой как, но не ограничиваясь этим, IL10). Второй гомодимерный цитокин может быть слит между областями VH и VL. Репрезентативное изображение слитого белка с двумя мультисубъединичными цитокинами представлено на фиг.7 и 8. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения указанный слитый белок имеет общую формулу (IV):



где

"R¹" представляет собой альфа-субъединицу первого цитокина, такого как IL-12 или IL-27, или первый мономер гомодимерного цитокина, такого как IL-10, предпочтительно (p40);

"R²" представляет собой бета-субъединицу первого цитокина, такого как IL-12 или IL-27, или второй мономер гомодимерного цитокина, такого как IL-10, предпочтительно p35;

"L_a" представляет собой любой линкер; предпочтительно (GGGGS)₃ SEQ ID No: 46, (GGGGS)₄ SEQ ID No: 45 или (GGGGS)₅ SEQ ID No: 44;

"L_b" представляет собой любой линкер; предпочтительно (GGGGS)₃ SEQ ID No: 46, (GGGGS)₄ SEQ ID No: 45 или (GGGGS)₅ SEQ ID No: 44;

"L_c" представляет собой любой линкер; предпочтительно GGGSGGG SEQ ID No: 43 или (GGGGS)₃ SEQ ID No: 46;

"X¹" представляет собой область VL или VH, полученную из первого моноклонального антитела; "X²" представляет собой область VH или VL, полученную из первого моноклонального антитела; где, когда X¹ представляет собой VL, X² представляет собой VH, или, когда X¹ представляет собой VH, X² представляет собой VL;

"W¹" представляет собой альфа-субъединицу первого цитокина, такого как IL-12 или IL-27, или первый мономер гомодимерного цитокина, такого как IL-10, предпочтительно первый мономер IL-10 SEQ ID No: 31, 33, 35, 37, 39 или 41;

"W²" представляет собой бета-субъединицу первого цитокина, такого как IL-12 или IL-27, или второй мономер гомодимерного цитокина, такого как IL-10, предпочтительно второй мономер IL-10 SEQ ID No: 31, 33, 35, 37, 39 или 41.

В одном варианте осуществления VH и VL имеют форму scFv, полученного из антитела человека против вируса Эбола. В другом варианте осуществления 6 CDR (CDR 1-3 из VH и CDR 1-3 из VL) scFv, полученного из антитела человека против вируса Эбола, заменены или подвергнуты пересадке на 6 CDR из второго моноклонального антитела,

которое позволяет нацеливание слитого белка с двумя цитокинами на конкретную мишень, такую как, но не ограничиваясь ими, ферменты, рецепторы, внеклеточные белки или внутриклеточный белок, такой как белки, ассоциированные с опухолями (например, опухолеассоциированные антигены (ТАА)), воспалительным ответом или аутоиммунными заболеваниями. Второе антитело может включать, но не ограничиваться ими, антитело против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различных мишеней иммунных точек контроля, таких как, но не ограничиваясь ими, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β Trap; MAdCAM, субъединицы интегрин β 7; интегрин α 4 β 7; интегрин α 4; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1 или SR-J1.

В более предпочтительном варианте осуществления слитый белок с двумя цитокинами, содержащий два мультисубъединичных белка, соответствует формуле Va или Vb

$\text{NH}_2\text{-(P35)-(L}_a\text{)-(X}^1\text{)-(L}_b\text{)-(IL10}_{\text{мономер}}\text{)-(L}_c\text{)-(IL10}_{\text{мономер}}\text{)-(L}_b\text{)-(X}^2\text{)-(L}_a\text{)-(P40)-COOH}$
(формула Va);

$\text{NH}_2\text{-(P40)-(L}_a\text{)-(X}^1\text{)-(L}_a\text{)-(IL10}_{\text{мономер}}\text{)-(L}_c\text{)-(IL10}_{\text{мономер}}\text{)-(L}_b\text{)-(X}^2\text{)-(L}_a\text{)-(P35)-COOH}$
(формула Vb);

где

"p35" представляет собой альфа-субъединицу IL-12, имеющую последовательность SEQ ID No: 1, 17, 19;

"p40" представляет собой бета-субъединицу IL-12, имеющую последовательность SEQ ID No: 3, 18, 20;

"L_a" представляет собой любой линкер; предпочтительно (GGGGS)₃ SEQ ID No: 46, (GGGGS)₄ SEQ ID No: 45 или (GGGGS)₅ SEQ ID No: 44;

"L_b" представляет собой любой линкер; предпочтительно (GGGGS)₃ SEQ ID No: 46, (GGGGS)₄ SEQ ID No: 45 или (GGGGS)₅ SEQ ID No: 44;

"L_c" представляет собой любой линкер; предпочтительно GGGSGGG SEQ ID No: 43 или (GGGGS)₃ SEQ ID No: 46;

X¹" представляет собой область VL или VH, полученную из первого моноклонального антитела; X²" представляет собой область VH или VL, полученную из первого моноклонального антитела; где, когда X¹ представляет собой VL, X² представляет собой VH, или, когда X¹ представляет собой VH, X² представляет собой VL;

"IL10_{мономер}" представляет собой мономер IL-10, имеющий последовательность SEQ ID No: 31, 33, 35, 37, 39 или 41, предпочтительно SEQ ID No: 41.

Первое моноклональное антитело представляет собой антитело против вируса Эбола (опубликованная заявка США 2018/0180614, включенная в качестве ссылки в полном объеме, в частности, mAb, описанные в таблицах 2, 3 и 4), в которое могут быть пересажены 6 CDR из второго антитела, обладающего специфичностью в отношении

любого из EGFR; CD14; CD52; различных мишеней иммунных точек контроля, таких как, но не ограничиваясь ими, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β Trap; MAdCAM, субъединицы интегрина β 7; интегрина α 4 β 7; интегрина α 4; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1 или SR-J1.

В таблицах 2a-2d представлены разные комбинации слитых белков с двумя цитокинами, содержащих IL-12 и IL-10, соответствующих формуле IV.

Таблица 2a (варианты осуществления DK12¹⁰, комбинация 1)					
(R¹)	(X¹)	(W¹)	(W²)	(X²)	(R²)
P40	VH против EGFR	мономер IL10 ¹	мономер IL10 ¹	VL против EGFR	P35
	VH против HER2			VL против HER2	
	VH против HER3			VL против HER3	
	VH против VEGFR2			VL против VEGFR2	
	VH против VEGFR1			VL против VEGFR1	
	VH против PDGFR			VL против PDGFR	
	VH против EpCAM			VL против EpCAM	
	VH против CD14			VL против CD14	
	VH против CD52			VL против CD52	
	VH против PD-L1			VL против PD-L1	
	VH против PD-1			VL против PD-1	
	VH против TIM3			VL против TIM3	

VH против BTLA			VL против BTLA	
VH против LAG3			VL против LAG3	
VH против CTLA4			VL против CTLA4	
VH против CD19			VL против CD19	
VH против CD20			VL против CD20	
VH против CD22			VL против CD22	
VH против CD47			VL против CD47	
VH против CD123			VL против CD123	
VH против GD-2			VL против GD-2	
VH против ICAM1			VL против ICAM1	
VH против ICAM2			VL против ICAM2	
VH против ICAM3			VL против ICAM3	
VH против ICAM4			VL против ICAM4	
VH против VCAM			VL против VCAM	
VH против FAPa			VL против FAPa	
VH против 5T4			VL против 5T4	
VH против Trop2			VL против Trop2	

	VH против EDB-FN			VL против EDB-FN	
	VH против TGFb			VL против TGFb	
	VH против Трап			VL против Трап	
	VH против MAdCAM			VL против MAdCAM	
	VH против интегрина b7			VL против интегрина b7	
	VH против a4b7			VL против a4b7	
	VH против a4			VL против a4	
	VH против любого SR ²			VL против любого из SR ²	
	VH против ВСМА			VL против ВСМА	
	VH против PSA			VL против PSA	
	VH против PSMA			VL против PSMA	
	VH против CEA			VL против CEA	
	VH против GPC3			VL против GPC3	
Таблица 2b (варианты осуществления DK12¹⁰, комбинация 2)					
(R¹)	(X¹)	(Z¹)	(Z²)	(X²)	(R²)
P40	VL против EGFR	мономер IL10 ¹	мономер IL10 ¹	VH против EGFR	P35
	VL против HER2			VH против HER2	

VL против HER3			VH против HER3	
VL против VEGFR2			VH против VEGFR2	
VL против VEGFR1			VH против VEGFR1	
VL против PDGFR			VH против PDGFR	
VL против EpCAM			VH против EpCAM	
VL против CD14			VH против CD14	
VL против CD52			VH против CD52	
VL против PD-L1			VH против PD-L1	
VL против PD-1			VH против PD-1	
VL против TIM3			VH против TIM3	
VL против BTLA			VH против BTLA	
VL против LAG3			VH против LAG3	
VL против CTLA4			VH против CTLA4	
VL против CD19			VH против CD19	
VL против CD20			VH против CD20	
VL против CD22			VH против CD22	
VL против CD47			VH против CD47	

	VL против CD123			VH против CD123	
	VL против GD-2			VH против GD-2	
	VL против ICAM1			VH против ICAM1	
	VL против ICAM2			VH против ICAM2	
	VL против ICAM3			VH против ICAM3	
	VL против ICAM4			VH против ICAM4	
	VL против VCAM			VH против VCAM	
	VL против FAPa			VH против FAPa	
	VL против 5T4			VH против 5T4	
	VL против Trop2			VH против Trop2	
	VL против EDB-FN			VH против EDB-FN	
	VL против TGFb			VH против TGFb	
	VL против Trap			VH против Trap	
	VL против MAdCAM			VH против MAdCAM	
	VL против интегринa b7			VH против интегринa b7	
	VL против a4b7			VH против a4b7	
	VL против			VH против	

	a4			a4	
	VL против любого SR ²			VH против любого SR ²	
	VL против BCMA			VH против BCMA	
	VL против PSA			VH против PSA	
	VL против PSMA			VH против PSMA	
	VL против CEA			VH против CEA	
	VL против GPC3			VH против GPC3	
Таблица 2с (варианты осуществления DK12¹⁰, комбинация 3)					
(R¹)	(X¹)	(Z¹)	(Z²)	(X²)	(R²)
P35	VH против EGFR	мономер IL10 ¹	мономер IL10 ¹	VL против EGFR	P40
	VH против HER2			VL против HER2	
	VH против HER3			VL против HER3	
	VH против VEGFR2			VL против VEGFR2	
	VH против VEGFR1			VL против VEGFR1	
	VH против PDGFR			VL против PDGFR	
	VH против EpcAM			VL против EpcAM	
	VH против CD14			VL против CD14	
	VH против CD52			VL против CD52	
	VH против			VL против	

	PD-L1			PD-L1	
	VH против PD-1			VL против PD-1	
	VH против TIM3			VL против TIM3	
	VH против BTLA			VL против BTLA	
	VH против LAG3			VL против LAG3	
	VH против CTLA4			VL против CTLA4	
	VH против CD19			VL против CD19	
	VH против CD20			VL против CD20	
	VH против CD22			VL против CD22	
	VH против CD47			VL против CD47	
	VH против CD123			VL против CD123	
	VH против GD-2			VL против GD-2	
	VH против ICAM1			VL против ICAM1	
	VH против ICAM2			VL против ICAM2	
	VH против ICAM3			VL против ICAM3	
	VH против ICAM4			VL против ICAM4	
	VH против VCAM			VL против VCAM	
	VH против			VL против	

	FAPa			FAPa	
	VH против 5T4			VL против 5T4	
	VH против Trop2			VL против Trop2	
	VH против EDB-FN			VL против EDB-FN	
	VH против TGFb			VL против TGFb	
	VH против Трап			VL против Трап	
	VH против MAdCAM			VL против MAdCAM	
	VH против интегрина b7			VL против интегрина b7	
	VH против a4b7			VL против a4b7	
	VH против a4			VL против a4	
	VH против любого SR ²			VL против любого SR ²	
	VH против BCMA			VL против BCMA	
	VH против PSA			VL против PSA	
	VH против PSMA			VL против PSMA	
	VH против CEA			VL против CEA	
	VH против GPC3			VL против GPC3	
Таблица 2d (варианты осуществления DK12¹⁰, комбинация 4)					
(R¹)	(X¹)	(Z¹)	(Z²)	(X²)	(R²)

P35	VL против EGFR	мономер IL10 ¹	мономер IL10 ¹	VH против EGFR	P40
	VL против HER2			VH против HER2	
	VL против HER3			VH против HER3	
	VL против VEGFR2			VH против VEGFR2	
	VL против VEGFR1			VH против VEGFR1	
	VL против PDGFR			VH против PDGFR	
	VL против EpCAM			VH против EpCAM	
	VL против CD14			VH против CD14	
	VL против CD52			VH против CD52	
	VL против PD-L1			VH против PD-L1	
	VL против PD-1			VH против PD-1	
	VL против TIM3			VH против TIM3	
	VL против BTLA			VH против BTLA	
	VL против LAG3			VH против LAG3	
	VL против CTLA4			VH против CTLA4	
VL против CD19	VH против CD19				
VL против CD20	VH против CD20				

VL против CD22		VH против CD22
VL против CD47		VH против CD47
VL против CD123		VH против CD123
VL против GD-2		VH против GD-2
VL против ICAM1		VH против ICAM1
VL против ICAM2		VH против ICAM2
VL против ICAM3		VH против ICAM3
VL против ICAM4		VH против ICAM4
VL против VCAM		VH против VCAM
VL против FAPa		VH против FAPa
VL против 5T4		VH против 5T4
VL против Trop2		VH против Trop2
VL против EDB-FN		VH против EDB-FN
VL против TGFb		VH против TGFb
VL против Trop		VH против Trop
VL против MAdCAM		VH против MAdCAM
VL против интегрин b7		VH против интегрин

				b7	
	VL против a4b7			VH против a4b7	
	VL против a4			VH против a4	
	VL против любого SR ²			VH против любого SR ²	
	VL против BCMA			VH против BCMA	
	VL против PSA			VH против PSA	
	VL против PSMA			VH против PSMA	
	VL против CEA			VH против CEA	

Субъединицы IL-12, P40 и P35, как указано в таблицах 2a-2d выше, могут быть выбраны из формы IL-12 дикого типа, дегликозилированной или агликозилированной формы IL-12. Кроме того, IL-12 может происходить из IL-12 человека или IL-12 мыши, или любого варианта IL-12, который сохраняет, усиливает или снижает функцию IL-12 по сравнению с IL-12 дикого типа. Мономеры IL-10, приведенные в таблице 2a-2d выше, могут быть выбраны из IL-10 человека, IL-10 EBV, IL-10 CMV, высокоаффинных форм вариантов IL-10 (таких как DV07, SEQ ID 41) или низкоаффинных форм вариантов IL-10 (таких как DV06, SEQ ID 39). Более того, мономеры IL-10 могут представлять собой любой вариант IL-10, в котором сохранена, усилена или снижена функция IL-10 по сравнению с IL-10 дикого типа.

[0067] Согласно другому варианту осуществления в таблицах 3a-3d приведены разные комбинации слитого белка с двумя цитокинами, содержащего IL-27 и IL-10, соответствующего формуле IV.

Таблица 3a (варианты осуществления DK27¹⁰, комбинация 1)					
(R¹)	(X¹)	(Z¹)	(Z²)	(X²)	(R²)
P28	VH против EGFR	Мономер IL-10 ³	Мономер IL-10 ³	VL против EGFR	EBI3
	VH против HER2			VL против HER2	
	VH против HER3			VL против HER3	

VH против VEGFR2			VL против VEGFR2
VH против VEGFR1			VL против VEGFR1
VH против PDGFR			VL против PDGFR
VH против EpCAM			VL против EpCAM
VH против CD14			VL против CD14
VH против CD52			VL против CD52
VH против PD-L1			VL против PD-L1
VH против PD-1			VL против PD-1
VH против TIM3			VL против TIM3
VH против BTLA			VL против BTLA
VH против LAG3			VL против LAG3
VH против CTLA4			VL против CTLA4
VH против CD19			VL против CD19
VH против CD20			VL против CD20
VH против CD22			VL против CD22
VH против CD47			VL против CD47
VH против CD123			VL против CD123

VH против GD-2			VL против GD-2	
VH против ICAM1			VL против ICAM1	
VH против ICAM2			VL против ICAM2	
VH против ICAM3			VL против ICAM3	
VH против ICAM4			VL против ICAM4	
VH против VCAM			VL против VCAM	
VH против FAPa			VL против FAPa	
VH против 5T4			VL против 5T4	
VH против Trop2			VL против Trop2	
VH против EDB-FN			VL против EDB-FN	
VH против TGFb			VL против TGFb	
VH против Trap			VL против Trap	
VH против MAdCAM			VL против MAdCAM	
VH против интегринa b7			VL против интегринa b7	
VH против a4b7			VL против a4b7	
VH против a4			VL против a4	

	VH против любого SR ²			VL против любого SR ²	
	VH против BCMA			VL против BCMA	
	VH против PSA			VL против PSA	
	VH против PSMA			VL против PSMA	
	VH против CEA			VL против CEA	
	VH против GPC3			VL против GPC3	
Таблица 3b (варианты осуществления DK27¹⁰, комбинация 2)					
(R¹)	(X¹)	(Z¹)	(Z²)	(X²)	(R²)
P28	VL против EGFR	Мономер IL- 10 ³	Мономер IL- 10 ³	VH против EGFR	EBI3
	VL против HER2			VH против HER2	
	VL против HER3			VH против HER3	
	VL против VEGFR2			VH против VEGFR2	
	VL против VEGFR1			VH против VEGFR1	
	VL против PDGFR			VH против PDGFR	
	VL против EpcAM			VH против EpcAM	
	VL против CD14			VH против CD14	
	VL против CD52			VH против CD52	
	VL против PD-L1			VH против PD-L1	

VL против PD-1		VH против PD-1	
VL против TIM3		VH против TIM3	
VL против BTLA		VH против BTLA	
VL против LAG3		VH против LAG3	
VL против CTLA4		VH против CTLA4	
VL против CD19		VH против CD19	
VL против CD20		VH против CD20	
VL против CD22		VH против CD22	
VL против CD47		VH против CD47	
VL против CD123		VH против CD123	
VL против GD-2		VH против GD-2	
VL против ICAM1		VH против ICAM1	
VL против ICAM2		VH против ICAM2	
VL против ICAM3		VH против ICAM3	
VL против ICAM4		VH против ICAM4	
VL против VCAM		VH против VCAM	
VL против FAPa		VH против FAPa	

	VL против 5T4			VH против 5T4	
	VL против Trop2			VH против Trop2	
	VL против EDB-FN			VH против EDB-FN	
	VL против TGF β			VH против TGF β	
	VL против Trap			VH против Trap	
	VL против MAdCAM			VH против MAdCAM	
	VL против интегрина b7			VH против интегрина b7	
	VL против a4b7			VH против a4b7	
	VL против a4			VH против a4	
	VL против любого SR ²			VH против любого SR ²	
	VL против BCMA			VH против BCMA	
	VL против PSA			VH против PSA	
	VL против PSMA			VH против PSMA	
	VL против CEA			VH против CEA	
	VL против GPC3			VH против GPC3	
Таблица 3с (варианты осуществления DK27¹⁰, комбинация 3)					
(R¹)	(X¹)	(Z¹)	(Z²)	(X²)	(R²)
EBI3	VH против	Мономер IL-	Мономер IL-	VL против	P28

EGFR	10 ³	10 ³	EGFR
VH против HER2			VL против HER2
VH против HER3			VL против HER3
VH против VEGFR2			VL против VEGFR2
VH против VEGFR1			VL против VEGFR1
VH против PDGFR			VL против PDGFR
VH против EpCAM			VL против EpCAM
VH против CD14			VL против CD14
VH против CD52			VL против CD52
VH против PD-L1			VL против PD-L1
VH против PD-1			VL против PD-1
VH против TIM3			VL против TIM3
VH против BTLA			VL против BTLA
VH против LAG3			VL против LAG3
VH против CTLA4			VL против CTLA4
VH против CD19			VL против CD19
VH против CD20			VL против CD20
VH против			VL против

	CD22			CD22	
	VH против CD47			VL против CD47	
	VH против CD123			VL против CD123	
	VH против GD-2			VL против GD-2	
	VH против ICAM1			VL против ICAM1	
	VH против ICAM2			VL против ICAM2	
	VH против ICAM3			VL против ICAM3	
	VH против ICAM4			VL против ICAM4	
	VH против VCAM			VL против VCAM	
	VH против FAPa			VL против FAPa	
	VH против 5T4			VL против 5T4	
	VH против Trop2			VL против Trop2	
	VH против EDB-FN			VL против EDB-FN	
	VH против TGFb			VL против TGFb	
	VH против Trap			VL против Trap	
	VH против MAdCAM			VL против MAdCAM	
	VH против интегринa b7			VL против интегринa b7	

	VH против a4b7			VL против a4b7	
	VH против a4			VL против a4	
	VH против любого SR ²			VL против любого SR ²	
	VH против ВСМА			VL против ВСМА	
	VH против PSA			VL против PSA	
	VH против PSMA			VL против PSMA	
	VH против CEA			VL против CEA	
	VH против GPC3			VL против GPC3	
Таблица 3d (варианты осуществления DK27¹⁰, комбинация 4)					
(R¹)	(X¹)	(Z¹)	(Z²)	(X²)	(R²)
ЕВІЗ	VL против EGFR	мономер ІL-10 ³	мономер ІL-10 ³	VH против EGFR	Р28
	VL против HER2			VH против HER2	
	VL против HER3			VH против HER3	
	VL против VEGFR2			VH против VEGFR2	
	VL против VEGFR1			VH против VEGFR1	
	VL против PDGFR			VH против PDGFR	
	VL против ЕpСAM			VH против ЕpСAM	
	VL против CD14			VH против CD14	

	VL против CD52			VH против CD52	
	VL против PD-L1			VH против PD-L1	
	VL против PD-1			VH против PD-1	
	VL против TIM3			VH против TIM3	
	VL против BTLA			VH против BTLA	
	VL против LAG3			VH против LAG3	
	VL против CTLA4			VH против CTLA4	
	VL против CD19			VH против CD19	
	VL против CD20			VH против CD20	
	VL против CD22			VH против CD22	
	VL против CD47			VH против CD47	
	VL против CD123			VH против CD123	
	VL против GD-2			VH против GD-2	
	VL против ICAM1			VH против ICAM1	
	VL против ICAM2			VH против ICAM2	
	VL против ICAM3			VH против ICAM3	
	VL против ICAM4			VH против ICAM4	

VL против VCAM		VH против VCAM
VL против FAPa		VH против FAPa
VL против 5T4		VH против 5T4
VL против Trop2		VH против Trop2
VL против EDB-FN		VH против EDB-FN
VL против TGFb		VH против TGFb
VL против Трап		VH против Трап
VL против MAdCAM		VH против MAdCAM
VL против интегринa b7		VH против интегринa b7
VL против a4b7		VH против a4b7
VL против a4		VH против a4
VL против любого SR ²		VH против любого SR ²
VL против BCMA		VH против BCMA
VL против PSA		VH против PSA
VL против PSMA		VH против PSMA
VL против CEA		VH против CEA
VL против		VH против

	GPC3			GPC3	
--	------	--	--	------	--

[0068] Субъединицы IL-27, P28 и EB13, как указано в таблицах 3a-3d выше, могут быть выбраны из формы IL-27 дикого типа, дегликозилированной или агликозилированной форм IL-27. Кроме того, IL-27 может происходить из IL-27 человека или IL-27 мыши или любого варианта IL-27, в котором сохранена, усилена или снижена функция IL-27 по сравнению с IL-27 дикого типа. Мономеры IL-10, приведенные в таблице 2a-2d выше, могут быть выбраны из IL-10 человека, IL-10 EBV, IL-10 CMV, высокоаффинных форм вариантов IL-10 (таких как DV07, SEQ ID 41) или низкоаффинных форм вариантов IL-10 (таких как DV06, SEQ ID 39). Более того, мономеры IL-10 могут представлять собой любой вариант IL-10, в котором сохранена, усилена или снижена функция IL-10 по сравнению с IL-10 дикого типа.

[0069] В другом варианте осуществления специфичность к мишени переменных цепей антитела, или пары VH и VL, или 6 CDR пары VH и VL может включать, но не ограничиваться ими, нацеливание на белки, клеточные рецепторы и/или опухолеассоциированные антигены. В другом варианте осуществления области CDR из любой пары VH и VL могут быть пересажены в систему каркаса с двумя цитокинами, описанную выше (схематично представленную на фиг.1-5). В другом варианте осуществления переменные области, или пара VH и VL, или 6 CDR пары VH и VL получены из антител, которые нацелены на антигены, ассоциированные с различными заболеваниями (например, злокачественной опухолью), или на антигены, которые обычно не обнаруживаются или редко встречаются в сыворотке здорового индивидуума, например, из переменных областей антител, направленных на EGFR, PDGFR, VEGFR1, VEGFR2, Her2Neu, FGFR, GPC3 или другие опухолеассоциированные антигены, MAdCAM, ICAM, VCAM, CD14 или другие ассоциированные с воспалением белки клеточной поверхности, ВИЧ и/или вирус Эбола. Таким образом, в одном варианте осуществления переменные области получены или происходят, например, из антител против EGFR, MAdCAM, ВИЧ (Chan et al, J. Virol., 2018, 92(18):e006411-19), ICAM, VCAM, CD14 или против вируса Эбола (опубликованная заявка США 2018/0180614, включенная в качестве ссылки в полном объеме, в частности, моноклональные антитела, описанные в таблицах 2, 3 и 4). В другом варианте осуществления переменные области получены или происходят из антител, способных повышать концентрацию цитокинов, таких как IL-12 или IL-27 в сочетании с IFN-альфа, IL-28 или IL-29, в конкретной области-мишени, чтобы позволить IL-12 и IL-27 более эффективно проявлять свой биологический эффект. Такое антитело может включать антитела, которые нацелены на сверхэкспрессируемые или имеющие повышенную регуляцию рецепторы или антигены в определенных пораженных областях, или антитела, которые специфически экспрессируются в определенных пораженных областях. Например, переменные области или CDR могут быть получены из антител, специфичных к EGFR; CD14; CD52; различным мишеням иммунных точек контроля, таким как, но не ограничиваясь ими, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2;

VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β Trap; MAdCAM, субъединице интегрин β 7; интегрину α 4 β 7; интегрину α 4; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1 или SR-J1, среди многих других.

[0070] Слитый белок с двумя цитокинами или комплекс слитых белков с двумя цитокинами также может обладать функцией нацеливания на антиген. Слитый белок с двумя цитокинами или комплекс слитых белков с двумя цитокином содержит пару VH и VL, которые способны ассоциировать вместе с образованием антигенсвязывающего центра или ABS. Вариабельные области могут быть дополнительно модифицированы (например, путем добавления, удаления или замены) посредством изменения одной или нескольких аминокислот, которые снижают антигенность у индивидуума. Другие модификации вариабельной области могут включать замены, делеции или добавления аминокислот, которые находятся за пределами 6 областей CDR VH- и VL-областей и служат для повышения стабильности и экспрессии областей VH и VL scFv. Специалист в данной области способен определить другие модификации, которые стабилизируют scFv и/или оптимизируют последовательность для целей экспрессии.

[0071] Пара VH и VL образует каркас, в который могут быть встроены или пересажены области CDR, полученные для множества антител. Такие области CDR антител включают области антител, известных и описанных выше. Области CDR в описанных выше каркасах VH и VL включают следующее количество положений аминокислот, доступных для пересадки/встраивания CDR:

CDR1 тяжелой цепи	3-7 аминокислот
CDR2 тяжелой цепи	7-11 аминокислот
CDR3 тяжелой цепи	7-11 аминокислот
CDR1 легкой цепи	9-14 аминокислот
CDR2 легкой цепи	5-9 аминокислот
CDR3 легкой цепи	7-11 аминокислот

В предпочтительном варианте осуществления слитый белок с двумя цитокинами, содержащий первый мультисубъединичный цитокин (например, IL-12 или IL-27), включает пару VH и VL, которая происходит из антитела против вируса Эбола (опубликованная заявка США 2018/0180614, включенная в качестве ссылки в полном объеме, в частности, mAb, описанные в таблицах 2, 3 и 4), причем 6 областей CDR антитела человека против вируса Эбола удалены и вместо них пересажена пара VH и VL специфического нацеливающего антитела, такого как, но не ограничиваясь ими, антитела, которая нацелены на EGFR; CD14; CD52; различные мишени ингибиторных точек контроля, такие как, но не ограничиваясь ими, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD19; CD20; CD22; CD47; CD123; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β Trap;

MAdCAM, субъединицу интегрин $\beta 7$; интегрин $\alpha 4 \beta 7$; интегрин $\alpha 4$; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1 или SR-J1. В одном варианте осуществления 6 областей CDR человека против вируса Эбола заменены на 6 областей CDR антитела против EGFR, MAdCAM, VEGFR1, VEGFR2, PDGFR или CD14. В предпочтительном варианте осуществления второй цитокин, такой как, но не ограничиваясь ими, IL-28, IL-29, IFN α , присоединен в шарнирной области между VH и VL scFv, полученного из антитела человека против вируса Эбола. Вышеупомянутая стратегия пересадки также может использоваться для слитого белка с двумя цитокинами, содержащего два мультисубъединичных цитокина, соответствующих формулам IV, и Va, и Vb, перечисленным выше.

[0072] В другом варианте осуществления второй цитокин присоединен между VH и VL scFv, как представлено на фиг.1-5. Второй цитокин конъюгирован между областями VH или VL, так чтобы второй цитокин сохранял его функциональные свойства. В одном варианте осуществления второй цитокин отличается от первого мультисубъединичного цитокина (например, IL-12 или IL-27). В одном варианте осуществления второй цитокин представляет собой IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, интерфероны- α , - β , - γ , TGF- β или факторы некроза опухоли- α , - β , основной FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11 или IL-13. В предпочтительном варианте осуществления второй цитокин в слитом белке с двумя цитокинами включает IL-28, IL-29 или IFN-альфа.

[0073] В некоторых вариантах осуществления второй цитокин может представлять собой другой мультисубъединичный цитокин, такой как IL-10. В этом случае второй цитокин также присоединен между VH и VL каркасной системы (см. фиг.7 и 8 для репрезентативных структур). Формулы IV, Va и Vb, описанные выше, служат для описания этих типов слитых белков. В других вариантах осуществления слитый белок с двумя цитокинами, содержащий первый мультисубъединичный цитокин (например, IL-12 или IL-27), включает линкеры. Специалисту в данной области известно, что линкеры или спейсеры используют для достижения надлежащей пространственной конфигурации различных частей слитого белка, и, таким образом, они могут выбрать подходящий линкер для применения для получения слитого белка с двумя цитокинами, содержащего первый мультисубъединичный цитокин (например, IL-12 или IL-27). В более предпочтительном варианте осуществления линкер или спейсер может представлять собой случайную аминокислотную последовательность SEQ ID No: 43, 44, 45, 46, 47 и 48. Любая из описанных выше комбинаций, приведенных в таблицах 2a-2d или 3a-3d, может быть скомбинирована с линкером ("L_a") и ("L_b"), выбранным из (GGGGS)₃, (GGGGS)₄ или (GGGGS)₅, имеющим SEQ ID No: 46, 45 и 47 соответственно, и линкером ("L_c") GGGSGGG или (GGGGS)₃, соответствующим SEQ ID No: 43 и 46, соответственно. В одном предпочтительном варианте осуществления формула IV может включать комбинацию следующих линкеров, приведенных в таблице 4.

Таблица 4: Возможные комбинации линкеров для формулы IV										
p40 IL-12	L _a	V H	L _b	моном ер 1 IL-10	L _c	мономе р 2 IL- 10	L _b	V L	L _a	p35 IL-12
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 4	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 3	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 5	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 3	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 5	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 4	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 5	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 5	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X

X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 4	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 4	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 3	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 3	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 4	X

X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGSG GG	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X

X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 3	X

X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 4	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 3	X
X	GGG GS x 5	X	GGG GS x 5	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 5	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 4	X	GGG GS x 4	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 4	X	GGGG S x 5	X
X	GGG GS x 3	X	GGG GS x 3	X	GGGGS x 3	X	GGGG S x 3	X	GGGG S x 5	X

(GGGGS)₃=SEQ ID No: 46, (GGGGS)₄=SEQ ID No: 45, (GGGGS)₅=SEQ ID No: 44

В другом предпочтительном варианте осуществления формула IV может включать комбинацию предпочтительных линкеров, как указано ниже в таблице 4

Таблица 5: Предпочтительные комбинации линкеров для формулы IV			
Комбинация	"L_a"	"L_b"	"L_c"
1	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	GGGSGGG
2	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃
3	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₅	GGGSGGG
4	(GGGGS) ₄	(GGGGS) ₃	GGGSGGG
5	(GGGGS) ₄	(GGGGS) ₄	GGGSGGG

6	(GGGGS) ₄	(GGGGS) ₅	GGGSGGG
7	(GGGGS) ₄	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃
8	(GGGGS) ₄	(GGGGS) ₄	(GGGGS) ₃
9	(GGGGS) ₄	(GGGGS) ₅	(GGGGS) ₃
10	(GGGGS) ₅	(GGGGS) ₃	GGGSGGG
11	(GGGGS) ₅	(GGGGS) ₄	GGGSGGG
12	(GGGGS) ₅	(GGGGS) ₅	GGGSGGG
13	(GGGGS) ₅	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃
14	(GGGGS) ₅	(GGGGS) ₄	(GGGGS) ₃
15	(GGGGS) ₅	(GGGGS) ₅	(GGGGS) ₃
(GGGGS) ₃ =SEQ ID No: 46 (GGGGS) ₄ =SEQ ID No: 45 (GGGGS) ₅ = SEQ ID No: 44			

[0074] Предпочтительные слитые белки с двумя цитокинами, содержащие два мультисубъединичных цитокина, включают слитые белки с двумя цитокинами, приведенные под SEQ ID No: 21-30.

[0075] В других аспектах настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют слитый белок с двумя цитокинами, содержащий первый мультисубъединичный цитокин (например, IL-12 или IL-27) и второй цитокин. Они включают те последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют слитый белок с двумя цитокинами, соответствующий формулам Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, IIIb, VI, Va или Vb. Таким образом, один вариант осуществления включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, который обладает гомологией от 70% до 99% с ними. Полинуклеотидные последовательности, которые кодируют слитый белок с двумя цитокинами, содержащий первый мультисубъединичный цитокин (например, IL-12 или IL-27) и второй цитокин (например, IL-10, IFN-альфа, IL-28, IL-29), также могут включать модификации, которые не изменяют функциональные свойства описанного слитого белка с двумя цитокинами. Для таких модификаций могут использоваться общепринятые методологии и способы рекомбинантных ДНК. Например, добавление или замена конкретных аминокислотных последовательностей могут быть внесены в первую последовательность мультисубъединичного цитокина (например, IL-12 или IL-27) на уровне нуклеиновой кислоты (ДНК) с использованием способов сайт-направленного мутагенеза с применением синтетических олигонуклеотидов, и эти способы хорошо известны в данной области. В предпочтительном варианте осуществления молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие слитый белок с двумя цитокинами, могут включать вставки, делеции или замены (например, вырожденный код), которые не изменяют функциональность первого мультисубъединичного цитокина (например, IL-12 или IL-27), второго цитокина или областей VH или VL scFv. Нуклеотидные последовательности,

кодирующие слитые белки с двумя цитокинами, описанные в настоящем описании, могут отличаться от аминокислотных последовательностей из-за вырожденности генетического кода и могут быть на 70-99%, предпочтительно на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, гомологичными вышеупомянутым последовательностям.

[0076] Нуклеотидные последовательности, кодирующие слитые белки с двумя цитокинами, описанные в настоящем описании, могут дополнительно содержать хорошо известные последовательности, которые способствуют, например, экспрессии, продуцированию или секреции белков. Такие последовательности могут включать, например, лидерную последовательность, сигнальный пептид и/или участки/последовательность инициации трансляции (например, консенсусная последовательность Козака). Описанные в настоящем описании нуклеотидные последовательности также могут включать один или несколько участков для ферментов рестрикции, которые позволяют встраивание в различные системы экспрессии/векторы.

[0077] В другом варианте осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие слитый белок с двумя цитокинами, можно использовать непосредственно в генной терапии. В одном варианте осуществления слитый белок с двумя цитокинами, описанный в настоящей заявке, может быть доставлен любым способом, известным в данной области, включая прямое введение гена в вектор, кодирующий слитый белок с двумя цитокинами. Генная терапия может быть осуществлена с использованием плазмидной ДНК или вирусного вектора, такого как вектор на основе аденоассоциированного вируса, аденовирусный вектор, ретровирусный вектор и т.д. В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы, описанные в настоящей заявке, вводят в виде вирусных частиц, а в других их вводят в виде плазмид (например, в виде "голой" ДНК).

[0078] Другие способы доставки нуклеотидных последовательностей включают способы, которые уже известны в данной области. Они могут включать доставку нуклеотидных последовательностей, таких как, но не ограничиваясь ими, ДНК, РНК, миРНК, мРНК, олигонуклеотиды или их варианты, кодирующие слитый белок с двумя цитокинами, посредством проникающего в клетку пептида, гидрофобной части, электростатического комплекса, липосомы, лиганда, липосомальной наночастицы, липопротеина (предпочтительно HDL или LDL), нацеленной на фолат липосомы, антитела (такого как против рецептора фолата, рецептора трансферрина), нацеливающего пептида или аптамера. Нуклеотидные последовательности, кодирующие слитый белок с двумя цитокинами, могут быть доставлены индивидууму посредством прямой инъекции, инфузии, пластырей, повязок, миста или аэрозоля, или посредством доставки в виде тонкой пленки. Нуклеотид (или белок) может быть направлен в любую область, в которую желательна направленная доставка цитокинового стимула. Это включает, например, легкие, желудочно-кишечный тракт, кожу, печень, головной мозг через внутривенную инъекцию, глубокие метастатические опухолевые очаги посредством инъекций под ультразвуковым контролем.

[0079] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам получения и очистки слитого белка с двумя цитокинами. Например, последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют слитый белок с двумя цитокинами, описанный в настоящем описании, можно использовать для рекомбинантного получения слитых белков. Например, с использованием общепринятых способов молекулярной биологии и экспрессии белков слитый белок с двумя цитокинами, описанный в настоящем описании, может быть экспрессирован и очищен из клеточных систем млекопитающих. Эти системы включают хорошо известные системы экспрессирующих векторов для эукариотических клеток и клетки-хозяева. Можно использовать множество подходящих экспрессирующих векторов, хорошо известных специалисту в данной области, которые можно использовать для экспрессии и введения слитых белков с двумя цитокинами. Эти векторы включают, например, векторы типа pUC, векторы типа pBR, векторы типа pBI, типа pGA, pBin19, pBI121, серии pGreen, серии pCAMBRIA, серии pPZP, pPCV001, pGA482, pCLD04541, серии pBIBAC, серии pYLTAС, pSB11, pSB1, серии pGPTV, и можно использовать вирусные векторы и т.п. Хорошо известные системы клеток-хозяев включают, но не ограничиваются ими, экспрессию в клетках CHO.

[0080] Экспрессирующие векторы, содержащие слитый белок с двумя цитокинами, также могут включать другие компоненты вектора, необходимые для функциональности вектора. Например, вектор может включать сигнальные последовательности, последовательности меток, последовательности для идентификации протеазами, селективные маркеры и другие регуляторные последовательности, такие как промоторы, требуемые для правильной репликации и экспрессии слитого белка с двумя цитокинами. Конкретные промоторы, используемые в векторе, в частности, не ограничены при условии, что они могут запускать экспрессию слитого белка с двумя цитокинами в разных типах клеток-хозяев. Аналогично, тип меток не ограничен при условии, что последовательность метки упрощает или облегчает очистку экспрессируемого слитого белка с двумя цитокинами. Они могут включать, например, 6-гистидин, GST, MBP, НАТ, HN, S, TF, Trx, Nus, биотин, FLAG, мус, RCFP, GFP и т.п. Последовательности распознавания протеазами конкретно не ограничены, например, можно использовать последовательности распознавания, такие как фактор Ха, тромбин, HRV, протеаза ЗС. Выбранные маркеры конкретно не ограничены при условии, что они могут выявлять трансформированные клетки растений риса, например, можно использовать гены устойчивости к неомицину, гены устойчивости к канамицину, гены устойчивости к гигромицину и т.п.

[0081] Описанный выше слитый белок с двумя цитокинами также может включать дополнительные аминокислотные последовательности, которые способствуют выделению или очистке слитых белков в процессе производства. Они могут включать различные модификации последовательностей или аффинные метки, такие как, но не ограничиваясь ими, белок А, альбумин-связывающий белок, щелочная фосфатаза, FLAG-эпитоп, связывающий галактозу белок, гистидиновые метки и любые другие метки, которые

хорошо известны в данной области. См., например, Kimple et al (Curr. Protoc. Protein Sci., 2013, 73: раздел 9.9, таблица 9.91, включенная в качестве ссылки в полном объеме). В одном аспекте аффинная метка представляет собой гистидиновую метку, имеющую аминокислотную последовательность ННННН (SEQ ID No: 42). Гистидиновая метка можно удаляться или оставаться интактной в конечном продукте. В другом варианте осуществления аффинная метка представляет собой модификацию белка А, которая включена в слитый белок (например, в область VH слитых белков, описанных в настоящем описании). Специалисту в данной области будет понятно, что любая последовательность слитого белка с двумя цитокинами, описанная в настоящем документе, может быть модифицирована включением модификации белка А путем вставки точечных аминокислотных замен в каркасные области антитела, как описано в данной области.

[0082] В другом аспекте молекулы белков и нуклеиновых кислот, кодирующих слитый белок с двумя цитокинами, могут быть составлены в виде фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество слитого белка с двумя цитокинами и фармацевтический носитель и/или фармацевтически приемлемые эксципиенты. Фармацевтическая композиция может быть составлена с использованием обычно используемых буферов, эксципиентов, консервантов, стабилизаторов. Фармацевтические композиции, содержащие слитый белок с двумя цитокинами, смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом. В данной области известны различные фармацевтические носители, и они могут использоваться в фармацевтической композиции. Например, носитель может представлять собой любое совместимое нетоксичное вещество, подходящее для доставки композиций слитых белков с двумя цитокинами, описанных в настоящей заявке, пациенту. Примеры подходящих носителей включают нормальный солевой раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнкса. Носители также могут включать любые полоксамеры, общеизвестные специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, полоксамеры, имеющие молекулярную массу 2900 (L64), 3400 (P65), 4200 (P84), 4600 (P85), 11,400 (F88), 4950 (P103), 5900 (P104), 6500 (P105), 14600 (F108), 5750 (P123) и 12600 (F127). Носители также могут включать эмульгаторы, включая, но не ограничиваясь ими, полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60 и полисорбат 80, среди многих других. Также можно использовать неводные носители, такие как жирные масла и этилолеат. Носитель может также включать добавки, такие как вещества, которые повышают изотоничность и химическую стабильность, например, буферы и консерванты, см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences и U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Составы терапевтических и диагностических средств можно получать путем смешения с физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами, например, в форме лиофилизированных порошков, взвесей, водных растворов или суспензий.

[0083] Фармацевтическая композиция может быть составлена для введения

пациенту в терапевтически эффективном количестве, достаточном для обеспечения желаемого терапевтического результата. Предпочтительно такое количество имеет минимальные негативные побочные эффекты. В одном варианте осуществления вводимое количество слитого белка с двумя цитокинами является достаточным для лечения или предотвращения воспалительных заболеваний или состояний. В другом варианте осуществления вводимое количество слитого белка с двумя цитокинами является достаточным для лечения или предотвращения иммунных заболеваний или нарушений. В еще одном варианте осуществления вводимое количество слитого белка с двумя цитокинами является достаточным для лечения или профилактики злокачественной опухоли. Вводимое количество может варьироваться от пациента к пациенту и должно определяться с учетом заболевания или состояния индивидуума или пациента, общего состояния здоровья пациента, способа введения, тяжести побочных эффектов и т.п.

[0084] Эффективное количество для конкретного пациента может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние, подвергаемое лечению, общее состояние здоровья пациента, путь введения и доза, а также тяжесть побочных эффектов. Соответствующую дозу, вводимую пациенту, обычно определяет врач с использованием параметров или факторов, о которых известно или предполагается в данной области, что они влияют на лечение или, согласно прогнозам, будут влиять на лечение. Обычно доза начинается с количества, несколько меньшего, чем оптимальная доза, а затем ее увеличивают с небольшими приращениями до тех пор, пока не будет достигнут желаемый или оптимальный эффект относительно каких-либо негативных побочных эффектов. Важные диагностические показатели включают показатели симптомов, например, воспаления или уровня вырабатываемых воспалительных цитокинов.

[0085] Способ определения дозировки описанного в настоящем описании слитого белка с двумя цитокинами является по существу сходным со способом, описанным в патенте США 10858412. Как правило, описанный в настоящем описании слитый белок с двумя цитокинами может иметь дозировку в диапазоне от 0,5 микрограмма/килограмм до 100 микрограммов/килограмм. Слитый белок с двумя цитокинами можно вводить ежедневно, три раза в неделю, два раза в неделю, раз в неделю, раз в два месяца или раз в месяц. Эффективное количество терапевтического средства может влиять на уровень воспаления, заболевания или состояния путем облегчения симптома. Например, влияние может включать уровень влияния, составляющий по меньшей мере 10%; по меньшей мере 20%; по меньшей мере приблизительно 30%; по меньшей мере 40%; по меньшей мере 50% или более так, чтобы происходило облегчение или полное излечение заболевания или состояния.

[0086] Композиции, описанные в настоящей заявке, можно вводить перорально или путем инъекции в организм. Составы для перорального применения также могут включать соединения для дополнительной защиты слитого белка с двумя цитокинами от протеаз в желудочно-кишечном тракте. Инъекции обычно бывают внутримышечными, подкожными, внутрикожными или внутривенными. Альтернативно, в соответствующих

обстоятельствах можно использовать внутрисуставную инъекцию или другие пути введения. Парентерально вводимый слитый белок с двумя цитокинами предпочтительно составляют в единичной дозированной инъекционной форме (раствор, суспензия, эмульсия) совместно с фармацевтическим носителем и/или фармацевтически приемлемыми эксципиентами. В других вариантах осуществления композиции, описанные в настоящей заявке, могут быть введены в организм пациента с помощью имплантируемой или инъекционной системы доставки лекарственного средства.

Тестирование слитого белка с двумя цитокинами

[0087] Множество скрининговых анализов известно и доступно специалистам в данной области для тестирования желаемой биологической функции. В одном варианте осуществления желаемая биологическая функция включает, но не ограничивается ими, снижение противовоспалительного ответа, снижение стимуляции Т-клеток, усиление функции Т-клеток, усиление функциональности клеток Купфера и снижение дегрануляции тучных клеток.

[0088] Например, известно, что воздействие IL-10 побуждает Т-клетки вырабатывать и секретировать больше IFN γ при стимуляции Т-клеточного рецептора. Одновременно, воздействие IL-10 препятствует секреции TNF α , IL-6 и других провоспалительных цитокинов, секретлируемых моноцитами/макрофагами в ответ на LPS. IL-10 также подавляет пролиферацию FoxP3⁺CD4⁺ Treg. В одном варианте осуществления может быть проведена положительная селекция слитого белка с двумя цитокинами, который максимизирует подавление моноцитов/макрофагов, но не имеет эффектов на Т-клетки, включая как стимулирующие, так и супрессивные ответы. В одном варианте осуществления в скрининге проводится положительный отбор слитых белков с двумя цитокинами, которые обладают повышенным противовоспалительным действием, для лечения аутоиммунного, противовоспалительного заболевания или того и другого. В других вариантах осуществления для разработки для лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) и/или неалкогольной жировой инфильтрации печени (NAFLD) также могут быть выбраны слитые белки с двумя цитокинами, которые усиливают поглощение клетками Купфера и не подавляют Treg. В другом варианте осуществления для разработки для лечения злокачественной опухоли могут быть выбраны слитые белки с двумя цитокинами, которые максимизируют биологию Т-клеток, включая как стимулирующие, так и супрессивные ответы, а также обеспечивает усиленное поглощение клетками Купфера. Различные анализы и способы скрининга слитых белков с двумя цитокинами ранее описаны в одновременно рассматриваемом патенте США 10858412, который включен в качестве ссылки в полном объеме. См. заявку США 16/811718, описание на стр. 39-42.

Способы лечения и/или предупреждения с использованием двух цитокинов

[0089] В других аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения и/или предупреждения злокачественных заболеваний или состояний, или рака, включающим введение индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически

эффективного количества слитого белка с двумя цитокинами, содержащего первый мультисубъединичный цитокин (например, IL-12 или IL-27) и второй цитокин (такой как IFN-альфа, IL28, IL29 и IL10). В предпочтительном варианте осуществления слитый белок с двумя цитокинами содержит IL-12 или IL-27 и IL-10 или его варианты, IFN-альфа, IL28 или IL-29 и их варианты в качестве второго цитокина. В других вариантах осуществления 6 областей CDR scFv человека против вируса Эбола заменены на 6 CDR из антитела против Her2/Neu; против PDGFR; против VEGFR1 и против VEGFR2, против FGFR; против CD19, против CD20, против CD22, против BCMA, против PSA, против PSMA, против HER3; против EGFR, против CEA или против GPC3. Предпочтительно, 6 CDR получены из антитела против EGFR или против HER2. В другом предпочтительном варианте осуществления второй цитокин представляет собой IL-28, IL-29, IL-10 или IFN-альфа, где IL-10 представляет собой либо DV07, либо DV06.

[0090] В других аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения и/или предупреждения воспалительных заболеваний или состояний, включающим введение индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества слитого белка с двумя цитокинами. В предпочтительном варианте осуществления воспалительные заболевания или нарушения включают, но не ограничиваются ими, болезнь Крона, псориаз и ревматоидный артрит ("RA").

[0091] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения и/или предупреждения иммунных заболеваний или состояний, включающим введение индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества слитого белка с двумя цитокинами.

[0092] В других вариантах осуществления настоящее изобретение также предусматривает способы совместного введения или лечения с вторым терапевтическим средством, например, цитокином, стероидом, химиотерапевтическим средством, антибиотиком, противовоспалительными средствами или лучевой терапией, хорошо известными в данной области. Они могут включать комбинированное лечение с другими терапевтическими средствами, такими как, но не ограничиваясь ими, одно или несколько из следующих: химиотерапевтические средства, интерферон- β , например, IFN- β -1 α и IFN- β -1 β ; белок, имитирующий основной белок миелина; кортикостероиды; ингибиторы IL-1; ингибиторы TNF; антитела против TNF α , антитела против IL-6, слитая конструкция IL-1br-Ig, антитела против IL-23, антитела к CD40-лиганду и CD80; антагонисты IL-12 и IL-23, например, антагонисты субъединицы p40 IL-12 и IL-23 (например, ингибиторные антитела против субъединицы p40); антагонисты IL-22; низкомолекулярные ингибиторы, например, метотрексат, лефлуномид, сиролimus (рапамицин) и их аналоги, например, CCI-779; ингибиторы Cox-2 и cPLA2; NSAID; ингибиторы p38; TPL-2; Mk-2; ингибиторы NF κ β ; RAGE или растворимый RAGE; ингибиторы P-селектина или PSGL-1 (например, низкомолекулярные ингибиторы, антитела к ним, например, антитела к P-селектину); агонисты бета-рецептора эстрогена (ERB) или антагонисты ERB-NF κ β .

[0093] Кроме того, комбинированное лечение, пригодное для проведения с

введением слитого белка с двумя цитокинами, может включать ингибиторы TNF, включая, например, химерные, гуманизированные, эффективно человеческие, человеческие или полученные *in vitro* антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с TNF; растворимые фрагменты рецептора TNF, например, p55 или p75 рецептора TNF человека или их производные, например, 75 kdTNFR-IgG (слитый белок массой 75 кД рецептора TNF-IgG, ENBREL™), слитый белок p55 рецептора TNF-IgG; и антагонисты фермента TNF, например, ингибиторы TNF α -превращающего фермента (TACE). Другое комбинированное лечение противовоспалительными средствами/лекарственными средствами включает, но не ограничивается ими, стандартные нестероидные противовоспалительные средства (NSAID) и ингибиторы циклооксигеназы-2. NSAID могут включать аспирин, целекоксиб, диклофенак, дифлунизал, этодолак, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, кеторолак, набуметон, напроксен, оксапрозин, пироксикам, салсалат, сулиндак и/или толметин. Ингибитор циклооксигеназы-2, используемый в композициях согласно настоящей заявке, может представлять собой, например, целекоксиб или рофекоксиб.

[0094] Дополнительные терапевтические средства, которые можно вводить совместно и/или составлять совместно со слитым белком с двумя цитокинами, включают одно или несколько из: интерферона- β , например, IFN β -1 α и IFN β -1 β ; КОПАКСОНА®; кортикостероидов; ингибиторов IL-1; антагонистов TNF (например, растворимый фрагмент рецептора TNF, например, p55 или p75 рецептора TNF человека или их производные, например, 75 kdTNFR-IgG); антител к CD40-лиганду и CD80; и антагонистов IL-12 и/или IL-23, например, антагонистов субъединицы p40 IL-12 и IL-23 (например, ингибиторные антитела, которые связываются с субъединицей p40 IL-12 и IL-23); метотрексата, лефлуномида и сиролимуса (рапамицин) или его аналога, например, CCI-779. Другие терапевтические средства могут включать Имфимзи или Атезолизумаб.

[0095] Например, в целях лечения NASH слитый белок с двумя цитокинами можно комбинировать со средствами, снижающими уровень холестерина, такими как статины и лекарственные средства, не являющиеся статинами. Эти средства включают, но не ограничиваются ими, симвастатин, аторвастатин, розувастатин, ловастатин, правастатин, гемфиброзил, флувастатин, холестирамин, фенофибрат, ингибиторы всасывания холестерина, смолы или секвестранты, связывающие желчные кислоты, и/или ингибиторы микросомального белка-переносчика триглицеридов (MTP).

[0096] Репрезентативные химиотерапевтические средства, которые можно вводить совместно со слитым белком с двумя цитокинами, описанным в настоящем описании, могут включать следующий неисчерпывающий перечень: алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (ЦИТОКСАН™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилтиофосфорамид и триметиллоломеламин, азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид,

мехлоретамин, мехлорэтамид, оксид гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, преднемусти, трофосфамид, урацил мустард; соединения нитромочевины, такие как кармусти, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимусти; антибиотики, такие как аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, декторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марселломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пурумицин, квеламицин, родорубицин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митоган, трилостан; средства для восполнения фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоклевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатрексат; дефофамин; демекольцин; диазиквон; эльфорнитин; эллиптиния ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; теназоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид (Ara-C); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел (ТАКСОЛ® Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) и доксетаксел (Таксотер™, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоклутетин; Кселода® Roche, Швейцария; ибандронат; СРТ11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифформетилорнитин (DMFO); ретиноевая кислота; эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из вышеперечисленных. Также это определение включает антигормональные средства, которые действуют, регулируя или ингибируя действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из вышеперечисленных.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Исследование *in vitro* слитого белка с двумя цитокинами, IL-12 и IFN-альфа

[0097] Для оценки эффектов *in vitro* нацеливания двух цитокинов в опухоль конструировали слитый белок с двумя цитокинами, содержащий IL-12 и IFN-альфа (см. фиг.2 в качестве репрезентативной диаграммы структуры, называемой "DK α ¹²"), из следующих компонентов:

(а) субъединицы р35 и р40 слиты на конце с scFv человека против вируса Эбола, в который пересажены 6 CDR из любого из антител против EGFR, против HER2, против VEGFR1, против VEGFR1 или против CD14; и

(b) IFN-альфа (SEQ ID No: 9);

где IFN-альфа конъюгирован или присоединен в шарнирной (или линкерной) области между VH и VL scFv человека против вируса Эбола, в который пересажены 6 CDR из антитела против EGFR, против HER2, против VEGFR1, против VEGFR1 или против CD14.

[0098] DK α ¹² получали для оценки комбинированных эффектов этих двух цитокинов - IL-12 и IFN-альфа - на индукцию IFN γ из NK-клеток, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

[0099] Моноциты периферической крови, NK-клетки, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки выделяли способом положительной селекции на магнитных микроносителях для оценки функции DK α ¹², а затем оценивали посредством тестирования *in vitro*. Серию клеточных анализов *in vitro* использовали для имитации или моделирования иммунологической функции в разные моменты времени цикла воздействия молекулы, инъецированной подкожно в организм человека. Эти анализы описаны в патенте США 10858412 и в заявке США 17/110104.

[0100] Во-первых, эффекты IL-12 отдельно, IFN-альфа отдельно, комбинированные эффекты IL-12 и IFN-альфа, а также IL-12, включенного в каркасную систему scFv с одним цитокином (см., например, фиг. 6, где субъединицами р35 и р40 заменены мономеры IL-10 на концах каркасной системы) сравнивали с эффектами DK α ¹² на моноциты/макрофаги. IFN-альфа отдельно и включенный в DK α ¹² ингибировал опосредуемую LPS индукцию IL-10, но индуцировал высвобождение TRAIL. Обработка IFN-альфа увеличивает экспрессию МНС I и CD80 на клеточной поверхности. IL-12 не имеет эффекта на моноциты.

[0101] Во-вторых, эффекты IL-12 отдельно, IFN-альфа отдельно, комбинированные эффекты IL-12 и IFN-альфа, а также IL-12, включенного в каркасную систему scFv с одним цитокином (см., например, фиг. 6, где субъединицами р35 и р40 заменены мономеры IL-10 на концах каркасной системы) сравнивали с эффектами DK α ¹² на Т-клетки. Анализ Т-клеток использовался для непосредственного установления первичной функции IL-10 на CD8⁺ Т-клетках, преимущественно усиления IFN γ , который высвобождается только при взаимодействии с Т-клеточным рецептором (Chan, 2015; Mumm J., 2011; Emmerich, 2012). Этот же анализ также применим и к другим цитокинам,

таким как IL-12, и может использоваться для выявления стимуляции Т-клеток. В этом анализе IL-12 отдельно или включенный в DK α ¹² индуцировал секрецию IFN-альфа. Обработка Т-клеток IFN-альфа не индуцировала секрецию IFN-альфа. Обработка CD8⁺ Т-клеток IFN-альфа приводила к выраженной пролиферации. Обработка IFN-альфа и IL-12 в комбинации или в соединенном виде в DK α ¹² приводила как к увеличению пролиферации Т-клеток, так и к значительному усилению секреции IFN-альфа.

Пример 2: Исследование *in vivo* слитого белка с двумя цитокинами, IL-12 и IFN-альфа

[0102] Ранее было показано, что нацеливание высокоаффинного варианта IL-10 (называемый DV07) посредством scFv против EGFR (где DV07 слит с scFv, содержащим VH и VL, полученные из каркаса ScFv человека против вируса Эбола, содержащего 6 пересаженных CDR против EGFR; "Degfr:DV07") на микроокружение опухоли благодаря созданию клеточной линии колоректальной опухоли мыши CT26 со стабильной экспрессией EGFR человека демонстрирует лучшую противоопухолевую функцию по сравнению с ПЭГ-гHuIL-10. См. патент США 10858412. С использованием того же исследования на опухоли *in vivo*, DK α ¹² оценивали и сравнивали с Degfr:DV07 в линии опухолевых клеток мыши CT26, экспрессировавших EGFR человека.

[0103] Мышам Balb/C с нокаутом В-клеток, имевшим опухоль CT26 (hEGFR⁺) со средним объемом опухоли 100 мм³ вводили тестируемые средства в дозах и с частотой, указанных в таблице 5. Все тестируемые средства вводили подкожно в заживок. Все средства вводили ежедневно в течение 15 суток.

Таблица 5: Тестируемые средства, дозы и частоты			
№.	Тестируемые средства	Доза	Частота
1	Носитель	100 мкл (контроль)	Ежедневно
2	Degfr:IL-12	1 мг/кг	Ежедневно
3	DK α ¹²	1 мг/кг	Ежедневно
4	DK α ¹²	2 мг/кг	Ежедневно
5	DK α ¹²	4 мг/кг	Ежедневно

Длину и ширину опухолей измеряли каждые трое суток с использованием электронного штангенциркуля и вычисляли объем опухоли ((LxW²)/2)). В этом примере термин "Degfr:DV07" относится к нацеленному на EGFR человека DV07; DK α ¹²egfr сокращенно обозначается как DK α ¹² и представляет собой IFN-альфа человека, соединенный с IL-12 через CDR цетуксимаба, пересаженные в каркас scFv против вируса Эбола.

Способы

[0104] Культивирование клеток *in vitro*: Опухолевые клетки CT26^(hEGFR⁺) (ATCC) выращивают до 70% смыкания монослоя в полной RPMI с 10% FCS и 10 мкг/мл пурамицина. Перед имплантацией клетки пассируют *in vitro* не более 3 раз. Клетки

извлекают из планшета для культивирования клеток с использованием Accutase (Biolegend) и промывают полной RPMI, центрифугируя в течение 10 минут при 400g при 4°C.

[0105] Имплантация опухоли: Опухолевые клетки имплантируют в количестве $1-2 \times 10^5$ клеток/мышь в 100 мкл 50% Матригеля, обедненного факторами роста, или без него, 50-100% RPMI, подкожно в правый бок мышей с нокаутом В-клеток или мышей дикого типа.

Результаты

[0106] Сравнение Degfr:IL-12 и DK α^{12} в отношении роста опухоли: Ранее было показано, что нацеливание IL-12 в микроокружение опухоли посредством связывания с EGFR, присутствующим на стабильно трансфицированных опухолевых клетках, является эффективным. См. патент США 10858412. С использованием той же опухолевой системы проводили сравнение Degfr:IL-12 и DK α^{12} .

[0107] Опухоли измеряли три раза в неделю (таблица 2). Самкам мышей Balb/C с нокаутом В-клеток с опухолями размером 75 мм³ СТ26^(hEGFR+) вводили подкожно тестируемые средства с различной частотой дозирования. Для этого эксперимента клетки СТ26^(hEGFR+) имплантировали в количестве $1-2 \times 10^5$ клеток в 0-50% Матригеле, обедненном факторами роста, для ограничения иммунизации мышей против опухолевых антигенов.

[0108] Противоопухолевый эффект Degfr:IL-12 в дозе 1 мг/кг сравнивали с той же дозой DK α^{12} , а также с дозами 2 и 4 мг/кг.

[0109] Оценка безопасности DK α^{12} : Для тестирования безопасности дозирования DK α^{12} оценивали массу тела мышей, имевших опухоль, которым вводили DK α^{12} .

[0110] Эффект дозирования DK α^{12} на выживаемость: Оценивали выживаемость мышей, имевших опухоль СТ26^(hegfr+), которым вводили DK α^{12} .

Пример 3: Слитый белок с двумя цитокинами IL-27 и IL-28 или IL-29

[0111] Для оценки эффектов *in vitro* нацеливания двух цитокинов на опухоль конструировали слитый белок с двумя цитокинами, содержащий (1) IL-27 и IL-28 (см. фиг.4 в качестве репрезентативной диаграммы структуры, называемой "DK28²⁷") и (2) IL-27 и IL-29 (см. фиг.5 в качестве репрезентативной диаграммы структуры, называемой "DK29²⁷"), из следующих компонентов:

DK28²⁷:

(а) субъединицы p28 и EB13 слиты на конце с scFv человека против вируса Эбола, в который пересажены 6 CDR из любого из антител против EGFR, против HER2, против VEGFR1, против VEGFR1 или против CD14; и

(b) IL-28 (SEQ ID No: 11);

где IL-28 конъюгирован или присоединен в шарнирной (или линкерной) области между VH и VL scFv человека против вируса Эбола, в который пересажены 6 CDR из антитела против EGFR, против HER2, против VEGFR1, против VEGFR1 или против CD14.

DK29²⁷:

(а) субъединицы р28 и EB13 слиты на конце с scFv человека против вируса Эбола, в который пересажены 6 CDR из любого из антител против EGFR, против HER2, против VEGFR1, против VEGFR1 или против CD14; и

(b) IL-29 (SEQ ID No: 16);

где IL-29 конъюгирован или присоединен в шарнирной (или линкерной) области между VH и VL scFv человека против вируса Эбола, в который пересажены 6 CDR из антитела против EGFR, против HER2, против VEGFR1, против VEGFR1 или против CD14.

[0112] Как DK28²⁷, так и DK29²⁷ получали для оценки комбинированных эффектов двух цитокинов - IL-27 с IL-28 и IL-28 с IL-29 - на индукцию IFN γ из NK-клеток, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Методики и способы анализа, описанные выше (пример 1), повторяли для этих пар цитокинов для моноцитов/макрофагов, Т-клеток (CD4⁺ и CD8⁺) и NK-клеток.

Пример 4: Исследование *in vivo* слитого белка с двумя цитокинами, IL-27 с IL-28 и IL-27 с IL-29

[0113] С использованием того же исследования с опухолью *in vivo*, как DK28²⁷, так и DK29²⁷ оценивали и сравнивали с одним нацеленным цитокином в клеточной линии опухоли мыши CT26, экспрессировавшей EGFR человека. Методики и анализы, описанные выше (пример 2), повторяли для этих парных цитокинов.

Пример 5: Слитый белок с двумя цитокинами IL-12 и IL-10 в анализе уничтожения клеток *in vitro* в комбинации с CD19 BiTE

[0114] Это исследование было предназначено для оценки того, имеет ли длина линкера эффект на цитотоксическую функцию CD8⁺ Т-клеток в молекуле, в которой скомбинированы IL-12 и IL-10 (DV07) на каркасе против вируса Эбола, в который пересажены CDR, которые нацелены на EGFR (с внутренним обозначением DK12¹⁰EGFR), при комбинировании с направленным на CD19 биспецифическим активатором Т-клеток (CD19 BiTE).

[0115] CD8⁺ Т-клетки выделяли из свежих донорских Leukopakс посредством выделения на магнитных микроносителях с антителом против CD8 в соответствии с протоколом, предложенным изготовителем (Miltenyi).

[0116] Выделенные CD8⁺ Т-клетки высевали в количестве 2×10⁶ клеток/лунка и подвергали воздействию в течение 2 суток различных концентраций (0 или 200 нг/мл) DK12¹⁰EGFR в AIMV. После воздействия в течение 2 суток различных концентраций DK12¹⁰EGFR со стандартными линкерами или DK12¹⁰EGFR с удлиненными линкерами как на стороне IL10, так и на стороне IL-12, CD8⁺ Т-клетки собирали, подсчитывали, промывали и, наконец, ресуспендировали в соответствующей концентрации DK12¹⁰EGFR. Одновременно, клетки Raji, которые конститутивно экспрессировали зеленый флуоресцентный белок (GFP), подсчитывали, промывали и ресуспендировали в различных концентрациях (0 и 0,1 (данные не представлены) или 1 нг/мл) CD19 BiTE. Клетки CD8⁺ (эффektorные) и клетки Raji-GFP (мишени) затем комбинировали при соотношении эффектора и мишени 10:1. Смесь эффекторных клеток и клеток-мишеней, которые (1) не

подвергались обработке, (2) были обработаны только CD19 BiTE, (3) были обработаны только DK2¹⁰EGFR или (4) были обработаны комбинацией CD19 BiTE и DK2₁₀EGFR, подвергали мониторингу в течение 2 суток с использованием InCuCyte. После воздействия в течение 2 суток измеряли процент исчезновения GFP в качестве индикатора цитотоксичности.

[0117] CD19 BiTE, также известный как Блинатумомаб, в настоящее время является единственной терапией BiTE, одобренной FDA. Авторы изобретения показали (данные не представлены), что комбинация CD19 BiTE с другими слитыми белками с двумя цитокинами, включающими IL10 и IL2 (с внутренним названием DK210), усиливает цитотоксичность CD19 BiTE. В данном случае авторы изобретения использовали ту же систему анализа, чтобы определить, может ли комбинация CD19 BiTE с (1) DK12¹⁰EGFR, имеющим стандартные линкеры (например, SEQ ID No: 46), быть лучшей, чем с (2) DK12¹⁰EGFR, имеющим удлиненные линкеры (например, SEQ ID No: 44) в отношении стимуляции CD8⁺ Т-клетки нормального, здорового донора-человека к осуществлению цитолиза злокачественных клеток-мишеней. См. фиг.9 и 10.

[0118] Оценка способности CD8⁺ Т-клеток, полученных от здорового донора-человека, отвечать на CD19 BiTE как с DK12¹⁰EGFR, имеющим стандартные линкеры, так и с DK12¹⁰EGFR, имеющим удлиненные линкеры, позволяет предположить, что удлиненные линкеры, в целом, улучшают способность комбинации двух средств усиливать цитолиз CD8⁺ Т-клетками клеток-мишеней Raji.

[0119] В настоящем письменном описании используются примеры для раскрытия аспектов настоящего изобретения, включая предпочтительные варианты осуществления, а также для того, чтобы дать возможность любому специалисту в данной области применять на практике его аспекты, включая изготовление и использование любых устройств или систем и выполнение любых предусматриваемых способов. Патентуемый объем этих аспектов определяется формулой изобретения и может включать другие примеры, которые могут прийти на ум специалистам в данной области. Предполагается, что такие другие примеры входят в объем формулы изобретения, если они имеют структурные элементы, которые не отличаются от буквальной формулировки формулы изобретения, или если они включают эквивалентные структурные элементы с несущественными отличиями от буквальной формулировки формулы изобретения. Аспекты различных описанных вариантов осуществления, а также другие известные эквиваленты для каждого такого аспекта могут быть скомбинированы и подобраны специалистом в данной области для создания дополнительных вариантов осуществления и технологий в соответствии с принципами настоящей заявки.

ССЫЛКИ:

Assier, E. (2004). NK Cells and Polymorphonuclear Neutrophils Are Both Critical for IL-2-Induced Pulmonary Vascular Leak Syndrome. *Journal of Immunology*.

Athie-Morales, V. (2004). Sustained IL-12 Signaling Is Required for Th1 Development. *Journal of Immunology*.

Atkins, M. (1997). Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clinical Cancer Research*.

Balce, D. R. (2011). Alternative activation of macrophages by IL-4 enhances the proteolytic capacity of their phagosomes through synergistic mechanisms. *Blood*.

Baluna, R. (1997). Vascular leak syndrome a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology*.

Bentebibe, S.-E. (2019). A First-in-Human Study and Biomarker Analysis of NKTR-214, a Novel IL2Raf Biased Cytokine, in Patients with Advanced or Metastatic Solid Tumors. *Cancer Discovery*.

Brunda, M. J. (1993). Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *Journal of Experimental Medicine*.

Buchbinder, E. I. (2019). Therapy with high-dose Interleukin-2 (HD IL-2) in metastatic melanoma and renal cell carcinoma following PD1 or PDL1 inhibition. *Journal of Immunotherapy for Cancer*.

Chan, I. H. (2015). The Potentiation of IFN γ and Induction of Cytotoxic Proteins by Pegylated IL-10 in Human CD8 T cells. *Journal of Interferon and Cytokine Research*.

Chen, X. (2018). A novel human IL-2 mutein with minimal systemic toxicity exerts greater antitumor efficacy than wild-type IL-2. *Cell Death and Disease*.

Chinen, T. (2016). An essential role for IL-2 receptor in regulatory T cell function. *Nature Immunology*.

Chowdhury, F. Z. (2011). IL-12 selectively programs effector pathways that are stably expressed in human CD8 $^{+}$ effector memory T cells in vivo. *Blood*.

Coma, G. (2006). Treatment of monocytes with interleukin (IL)-12 plus IL-18 stimulates survival, differentiation and the production of CXC chemokine ligands (CXCL)8, CXCL9 and CXCL10. *Clinical and Experimental Immunology*.

Davis, I. D. (2009). A Phase I and Pharmacokinetic Study of Subcutaneously-Administered Recombinant Human Interleukin-4 (rhuIL-4) in Patients with Advanced Cancer. *Growth Factors*.

Emmerich, J. (2012). IL-10 Directly Activates and Expands Tumor-Resident CD8 $^{+}$ T Cells without De Novo Infiltration from Secondary Lymphoid Organs. *Cancer Research*, 3570-3581.

Fedorak, R. (2000). Recombinant Human Interleukin 10 in the Treatment of Patients with Mild to Moderately Active Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 1473-1482.

Gessani, S. (2014). Type I Interferons as Regulators of Human Antigen Presenting Cell Functions. *Toxins*.

Gooch, J. L. (1998). Interleukin 4 Inhibits Growth and Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research*.

Greve, J. M. (2000). *USA Patent No. 6028176*.

Groux, H. (1998). Inhibitory and Stimulatory Effects of IL-10 on Human CD8 $^{+}$ T cells. *The Journal of Immunology*.

Guan, H. (2007). Blockade of Hyaluronan Inhibits IL-2 Induced Vascular Leak Syndrome and Maintains Effectiveness of IL-2 Treatment in Metastatic Melanoma. *Journal of Immunology*.

Hart, P. H. (1989). Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: Suppression of human monocyte tumor necrosis factor α , interleukin 1, and prostaglandin E₂. *PNAS*.

Hart, P. H. (1991). IL-4 suppresses IL-1, TNF- α and PGE₂ production by human peritoneal macrophages. *Immunology*.

Henry, C. J. (2008). IL-12 Produced by Dendritic Cells Augments CD8⁺ T cell Activation through the Production of the Chemokines CCL1 and CCL17. *Journal of Immunology*.

Herpen, C. M. (2004). Intratumoral Administration of Recombinant Human Interleukin 12 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients Elicits a T-Helper 1 Profile in the Locoregional Lymph Nodes. *Clinical Cancer Research*.

Hiroishi, K. (2000). IFN- α -Expressing Tumor Cells Enhance Generation and Promote Survival of Tumor-Specific CTLs. *Journal of Immunology*.

How, J. (2020). Use of Interferon Alfa in the Treatment of Myeloproliferative Neoplasms: Perspectives and Review of the Literature. *Cancers*.

Jiang, T. (2016). Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*.

Kirchner, G. I. (1998). Pharmacokinetics of human Interleukin-2 in advanced renal cell carcinoma patients following subcutaneous application. *British Journal Clinical Pharmacology*.

Kolumam, G. A. (2005). Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *Journal of Experimental Medicine*.

Lee, H. L. (2016). Tumor growth suppressive effect of IL-4 through p21-mediated activation of STAT6 in IL-4R α overexpressed melanoma models. *Oncotarget*.

Li, R. (2013). Expression of recombinant human IL-4 in *Pichia pastoris* and relationship between its glycosylation and biological function. *Protein Expression and Purification*.

Li, S. (2005). Administration Route- and Immune Cell Activation-Dependent Tumor Eradication by IL12 Electrotransfer. *Molecular Therapy*.

Lu, C. (2019). Type I interferon suppresses tumor growth through activating the STAT3-granzyme B pathway in tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Immunotherapy of Cancer*.

Lyrdal, D. (2009). Metastatic renal cell carcinoma treated with PEG-interferon alfa 2b. *Acta Oncology*.

Malefyt, R. d. (1991). Interleukin 10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *JEM*.

Malefyt, R. d. (1991). Interleukin 10 Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 1209-1220.

Martinović, K. M. (2015). Favorable in vitro effects of combined IL-12 and IL-18

treatment on NK cell cytotoxicity and CD25 receptor expression in metastatic melanoma patients. *Journal of Translational Medicine*.

McGuirk, P. (2000). A Regulatory Role for Interleukin 4 in Differential Inflammatory Responses in the Lung following Infection of Mice Primed with Th1- or Th2-Inducing Pertussis Vaccines. *Infection and Immunity*.

Medrano, R. F. (2017). Immunomodulatory and antitumor effects of type I interferons and their application in cancer therapy. *Oncotarget*.

Moore, K. W. (2001). Interleukin 10 and the Interleukin 10 Receptor. *Annual Reviews Immunology*.

Mossman, T. (1989). TH1 AND TH2 CELLS: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Reviews Immunology*.

Mumm, J. (2011). IL-10 induces IFN γ -Mediated Tumor Immunity. *Cancer Cell*.

Mumm, J. B. (2011). IL-10 Elicits IFN γ -Dependent Tumor Immune Surveillance. *Cancer Cell*.

Naing, A. (2016). Safety, Antitumor Activity, and Immune Activation of Pegylated Recombinant Human Interleukin-10 (AM0010) in Patients With Advanced Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology*.

Naing, A. (2018). PEGylated IL-10 (Pegilodecakin) Induces Systemic Immune Activation, CD8+ T cell Invigoration and Polyclonal T cell Expansion in Cancer Patients. *Cancer Cell*.

Nemunaitis, J. (2005). Vaccines in Cancer: GVAX® a GM-CSF Gene Vaccine. *Vaccine*.

Padovan, E. (2002). IFN- α 2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8 effector T cells. *Journal of Leukocyte Biology*.

Parihar, R. (2002). IL-12 enhances the natural killer cell cytokine response to Ab-coated tumor cells. *Journal of Clinical Investigation*.

Ryan, J. J. (1997). Interleukin-4 and its receptor: Essential mediators of the allergic response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*.

Sabel, M. S. (2004). *Annals of Surgical Oncology*.

Schreiber, S. (2000). Safety and Efficacy of Recombinant Human Interleukin 10 in Chronic Active Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 1461-1472.

Scott, M. J. (2006). Interleukin-10 suppresses natural killer cell but not natural killer T cell activation during bacterial infection. *Cytokine*.

Simmons, D. P. (2012). Type I interferon drives a distinctive dendritic cell maturation phenotype that allows continued class II MHC synthesis and antigen processing. *Journal of Immunology*.

Sivakumar, P. V. (2013). Comparison of Vascular Leak Syndrome in Mice Treated with IL21 or IL2. *Comparative Medicine*.

Spigel, D. R. (2020). Randomized phase II study of pembrolizumab (P) alone versus pegilodecakin (PEG) in combination with P as first-line (1L) therapy in patients (pts) with stage

IV non-small cell lung cancer (NSCLC) with high PD-L1 expression (CYPRESS 1). *ASCO*, (p. 9563).

Steinke, J. W. (2001). Th2 cytokines and asthma Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respiratory Research*.

Sunela, K. L. (2009). A phase-II study of combination of pegylated interferon alfa-2a and capecitabine in locally advanced or metastatic renal cell cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*.

Vacaflares, A. (2017). Pretreatment of activated human CD8 T cells with IL-12 leads to enhanced TCR-induced signaling and cytokine production. *Molecular Immunology*.

Vacaflares1, A. (2016). Exposure of Human CD4 T Cells to IL-12 Results in Enhanced TCR-Induced Cytokine Production, Altered TCR Signaling, and Increased Oxidative Metabolism. *PLOS One*.

Varin, A. (2010). Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion. *Blood*.

Vidyarthi, A. (2018). TLR-3 Stimulation Skews M2 Macrophages to M1 Through IFN- $\alpha\beta$ Signaling and Restricts Tumor Progression. *Frontiers In Immunology*.

Woodward, E. A. (2012). The anti-inflammatory actions of IL-4 in human monocytes are not mediated by IL-10, RP105 or the kinase activity of RIPK2. *Cytokine*.

Yoo, J. K. (2002). IL-12 Provides Proliferation and Survival Signals to Murine CD4+ T Cells Through Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway. *Journal of Immunology*.

Zhang, C. (2008). Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Human Immunology*.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок с двумя цитокинами, содержащий по меньшей мере первую и вторую мономерную субъединицу первого цитокина, слитые с одноцепочечной варибельной областью (scFv) или антигенсвязывающим фрагментом моноклонального антитела, где каждая мономерная субъединица слита на конце слитого белка; и второй цитокин, где второй цитокин слит между областями VH и VL scFv или антигенсвязывающего фрагмента.

2. Слитый белок с двумя цитокинами по п.1, где первым цитокином является IL-12 или IL-27.

3. Белок с двумя цитокинами по п.1, где первой мономерной субъединицей является субъединица p35 и второй мономерной субъединицей является субъединица p40.

4. Слитый белок с двумя цитокинами по п.1, где первой мономерной субъединицей является SEQ ID No: 1, 17, 19, и второй мономерной субъединицей является SEQ ID No: 3, 18, 20.

5. Белок с двумя цитокинами по п.1, где первая мономерная субъединица представляет собой субъединицу p28 и вторая мономерная субъединица представляет собой субъединицу EB13.

6. Белок с двумя цитокинами по п.1, где первой мономерной субъединицей является SEQ ID No: 5 и второй мономерной субъединицей является SEQ ID No: 7.

7. Слитый белок с двумя цитокинами формулы (Ia) или (Ib)

$$\text{NH}_2\text{-(R}^1\text{)-(X}^1\text{)-(Z}_n\text{)-(X}^2\text{)-(R}^2\text{)-COOH (формула Ia);}$$

$$\text{NH}_2\text{-(R}^2\text{)-(X}^1\text{)-(Z}_n\text{)-(X}^2\text{)-(R}^1\text{)-COOH (формула Ib)}$$

где

"R¹" представляет собой альфа-субъединицу последовательности первого цитокина, выбранной из SEQ ID No: 1, 17, 19 или 5;

"R²" представляет собой бета-субъединицу последовательности первого цитокина, выбранной из SEQ ID No: 3, 18, 20 или 7;

где, когда R¹ представляет собой SEQ ID No: 1, 17 или 19, R² представляет собой SEQ ID No: 3, 18, 20, или когда R¹ представляет собой SEQ ID No: 5, R² представляет собой SEQ ID No: 7;

"X¹" представляет собой область VL или VH, полученную из первого моноклонального антитела;

"X²" представляет собой область VH или VL, полученную из первого моноклонального антитела;

где, когда X¹ представляет собой VL, X² представляет собой VH, или, когда X¹ представляет собой VH, X² представляет собой VL;

"Z" представляет собой цитокин;

"n" представляет собой целое число, выбранное из 0-2.

8. Слитый белок с двумя цитокинами по п.7, где X¹ и X² получены из первого моноклонального антитела, специфичного к рецептору эпидермального фактора роста

(EGFR); CD14; CD52; различным мишеням иммунных точек контроля, таким как, но не ограничиваясь ими, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD20; CD47;GD-2; VEGFR1, VEGFR2; HER2; PDGFR; EpcAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β Trap; MAdCAM, субъединице интегрин β 7; интегрину α 4 β 7; интегрину α 4; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; SR-J1; ВИЧ или вирусу Эбола.

9. Слитый белок с двумя цитокинами по п.7, где VL и VH получены из первого моноклонального антитела, которое представляет собой антитело против ВИЧ или антитело против вируса Эбола.

10. Слитый белок с двумя цитокинами по п.9, где VL и VH из моноклонального антитела против ВИЧ или против вируса Эбола включает 6 CDR, которые подвергнуты пересадке (заменены) на 6 CDR из второго антитела.

11. Слитый белок с двумя цитокинами по п.10, где второе антитело представляет собой моноклональное антитело, выбранное из антитела против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различных мишеней иммунных точек контроля, таких как, но не ограничиваясь ими, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD20; CD47;GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpcAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β Trap; MAdCAM, субъединицы интегрин β 7; интегрин α 4 β 7; интегрин α 4; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1 или SR-J1.

12. Слитый белок с двумя цитокинами по п.10, где 6 пересаженных CDR из второго моноклонального антитела включают 6 CDR из антитела против EGFR, антитела против HER2, антитела против VEGFR1 или антитела против VEGFR2, где 6 CDR включают CDR 1-3 из VL и CDR 1-3 из VH.

13. Слитый белок с двумя цитокинами по п.7, где Z представляет собой цитокин, выбранный из IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, интерферонов- α , - β , - γ , TGF- β , или факторов некроза опухоли- α , - β , основного FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11 или IL-13.

14. Слитый белок с двумя цитокинами по п.7, где Z представляет собой интерферон- α , IL-28 или IL-29.

15. Слитый белок с двумя цитокинами по п.7, где Z представляет собой целое число, равное 1.

16. Слитый белок с двумя цитокинами по п.7, дополнительно содержащий линкеры между R¹, X¹, Z, X² и R².

17. Слитый белок с двумя цитокинами, содержащий IL-12, где слитый белок имеет формулу (IIa) или (IIb)

NH₂-(p35)-(L)-(X¹)-(L)-(Z_n)-(L)-(X²)-(L)-(p40)-COOH (формула IIa);

NH₂-(p40)-(L)-(X¹)-(L)-(Z_n)-(L)-(X²)-(L)-(p35)-COOH (формула IIb);

где

"p35" представляет собой последовательность SEQ ID No: 1, 17 или 19;

"p40" представляет собой последовательность SEQ ID No: 3, 18 или 20;

"L" представляет собой линкер;

"X¹" представляет собой область VL или VH, полученную из первого моноклонального антитела;

"X²" представляет собой область VH или VL, полученную из первого моноклонального антитела;

где, когда X¹ представляет собой VL, X² представляет собой VH, или, когда X¹ представляет собой VH, X² представляет собой VL;

"Z" представляет собой цитокин, выбранный из IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, интерферонов- α , - β , - γ , TGF- β , или факторов некроза опухоли- α , - β , основного FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11 или IL-13.

"n" представляет собой целое число, выбранное из 0-2.

18. Слитый белок IL-12 по п.17, где VL и VH получены из первого антитела, специфичного к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различным мишеням иммунных точек контроля, таким как, но не ограничиваясь ими, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD20; CD47;GD-2; VEGFR1, VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β Trap; MAdCAM, субъединице интегрин β 7; интегрину α 4 β 7; интегрину α 4; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; SR-J1; ВИЧ или вирусу Эбола.

19. Слитый белок IL-12 по п.18, где VL и VH получены из первого антитела, специфичного к ВИЧ или вирусу Эбола.

20. Слитый белок IL-12 по п.19, где VL и VH из антитела против ВИЧ или против вируса Эбола включают 6 CDR, которые подвергнуты пересадке (заменены) на 6 CDR из второго антитела.

21. Слитый белок IL-12 по п.20, где второе антитело представляет собой антитело, выбранное из антитела против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различных мишеней иммунных точек контроля, таких как, но не ограничиваясь ими, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD20; CD47;GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β Trap; MAdCAM, субъединицы интегрин β 7; интегрин α 4 β 7; интегрин α 4; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1 или SR-J1.

22. Слитый белок IL-12 по п.20, где 6 пересаженных CDR из второго моноклонального антитела включают 6 CDR из антитела против EGFR, антитела против HER2, антитела против VEGFR1 или антитела против VEGFR2, где 6 CDR включают CDR 1-3 из VL и CDR 1-3 из VH.

23. Слитый белок с двумя цитокинами, содержащий IL-27, причем указанный слитый белок имеет формулу (IIIa) или (IIIb)

$\text{NH}_2\text{-(p28)-(L)-(X}^1\text{)-(L)-(Z}_n\text{)-(L)-(X}^2\text{)-(L)-(EBI3)-COOH}$ (формула IIIa);

$\text{NH}_2\text{-(EBI3)-(L)-(X}^1\text{)-(L)-(Z}_n\text{)-(L)-(X}^2\text{)-(L)-(p28)-COOH}$ (формула IIIb);

где

"p28" представляет собой последовательность SEQ ID No: 5;

"EBI3" представляет собой последовательность SEQ ID No: 7;

"L" представляет собой линкер;

"X¹" представляет собой область VL или VH, полученную из первого моноклонального антитела;

"X²" представляет собой область VH или VL, полученную из первого моноклонального антитела;

где, когда X¹ представляет собой VL, X² представляет собой VH, или, когда X¹ представляет собой VH, X² представляет собой VL;

"Z" представляет собой цитокин, выбранный из IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, интерферонов- α , - β , - γ , TGF- β , или факторов некроза опухоли- α , - β , основного FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11 или IL-13;

"n" представляет собой целое число, выбранное из 0-2.

24. Слитый белок IL-27 по п.23, где VL и VH получены из первого антитела, специфичного к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различным мишеням иммунных точек контроля, таким как, но не ограничиваясь ими, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD20; CD47;GD-2; VEGFR1, VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β Trap; MAdCAM, субъединице интегрин β 7; интегрин α 4 β 7; интегрин α 4; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1; SR-J1; ВИЧ или вирусу Эбола.

25. Слитый белок IL-27 по п.24, где VL и VH получены из первого антитела, специфичного к ВИЧ или вирусу Эбола.

26. Слитый белок IL-27 по п.25, где VL и VH из антитела против ВИЧ или антитела против вируса Эбола включают 6 CDR, которые подвергнуты пересадке (заменены) на 6 CDR из второго антитела.

27. Слитый белок IL-27 по п.26, где второе антитело представляет собой антитело, выбранное из антитела против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различных мишеней иммунных точек контроля, таких как, но не ограничиваясь ими, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD20; CD47;GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; TGF β Trap; MAdCAM, субъединицы интегрин β 7; интегрин α 4 β 7; интегрин α 4; SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-I1 или SR-J1.

28. Слитый белок IL-27 по п.27, где 6 пересаженных CDR из второго моноклонального антитела включают 6 CDR из антитела против EGFR, антитела против

HER2, антитела против VEGFR1 или антитела против VEGFR2, где 6 CDR включают CDR 1-3 из VL и CDR 1-3 из VH.

29. Способ лечения злокачественной опухоли, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества слитого белка по пп. 1, 2 или 7.

30. Способ по п.29, где слитый белок содержит области VL и VH из первого антитела, выбранного из антитела против ВИЧ или антитела против вируса Эбола, и где вместо 6 областей CDR первого антитела пересажены 6 областей CDR второго антитела, выбранного из антитела против EGFR, антитела против HER2, антитела против VEGFR1, или антитела против VEGFR2, или антитела против CD14.

31. Способ по п.30, где первое антитело представляет собой антитело против вируса Эбола и второе антитело выбрано из антитела против EGFR, антитела против HER2, антитела против VEGFR1, или антитела против VEGFR2, или антитела против CD14.

32. Способ по п.29, где первым цитокином является IL-12 или IL-27.

33. Способ по п.32, где цитокином или "Z" является IL-12.

34. Способ по п.24, где "Z" имеет величину "n", равную 1.

35. Способ по п.21, где слитый белок вводят в количестве от 0,01 нг/мл до 100 нг/мл.

36. Способ по п.21, где слитый белок вводят в количестве от 0,01 нг/мл до 10 нг/мл.

37. Способ лечения воспалительного заболевания, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества слитого белка по пп.1, 2 или 7.

38. Способ по п.37, где слитый белок содержит области VL и VH из первого антитела, выбранного из антитела против ВИЧ или антитела против вируса Эбола, и где вместо 6 областей CDR первого антитела пересажены 6 областей CDR второго антитела, выбранного из антитела против EGFR, антитела против HER2, антитела против VEGFR1, или антитела против VEGFR2, или антитела против CD14.

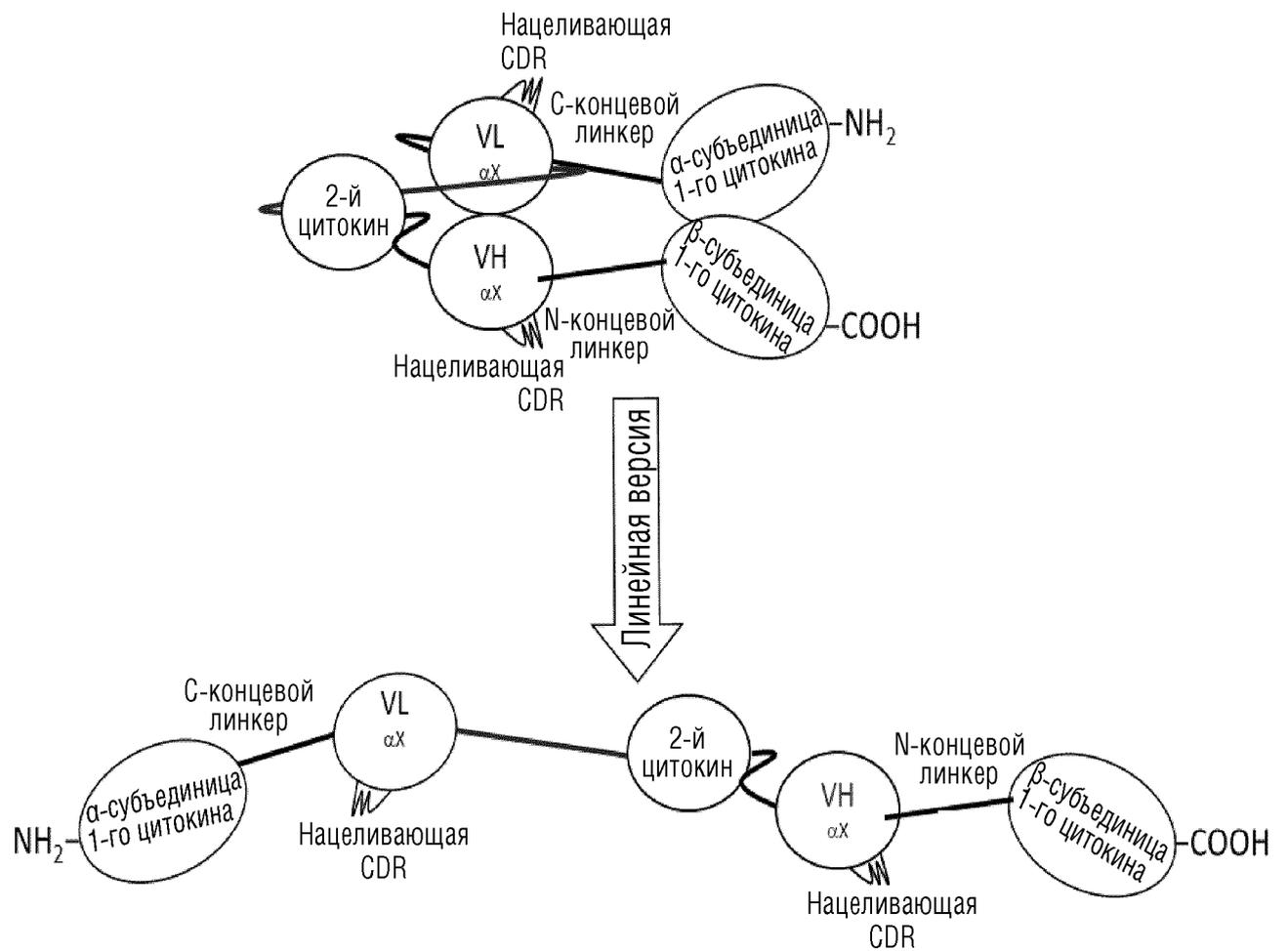
39. Способ по п.37, где "Z" имеет величину "n", равную 1.

40. Способ по п.37, где слитый белок вводят в количестве от 0,01 нг/мл до 100 нг/мл.

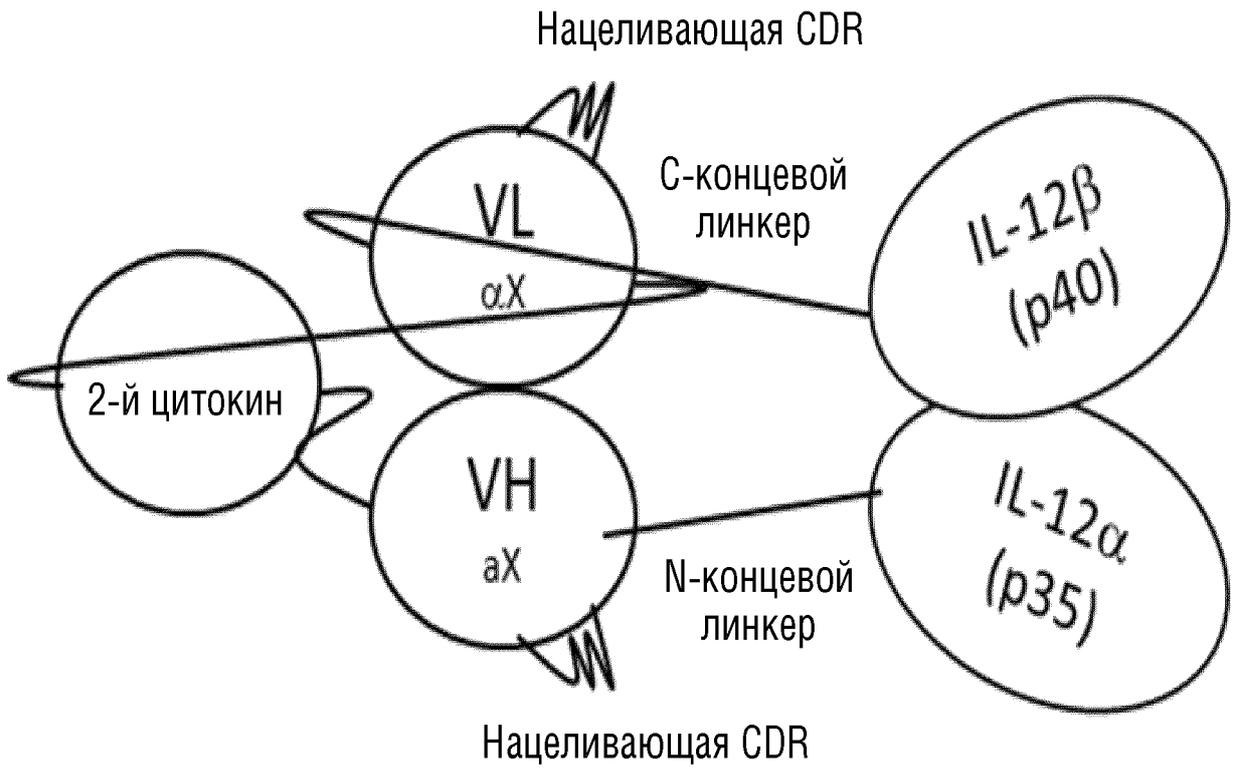
41. Способ по п.37, где воспалительное заболевание представляет собой сепсис, болезнь Крона, ревматоидный артрит, псориаз и/или воспалительное заболевание кишечника (IBD).

42. Способ лечения сепсиса, септического шока и/или симптомов, ассоциированных с ними, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества слитого белка по пп.1, 2 или 7.

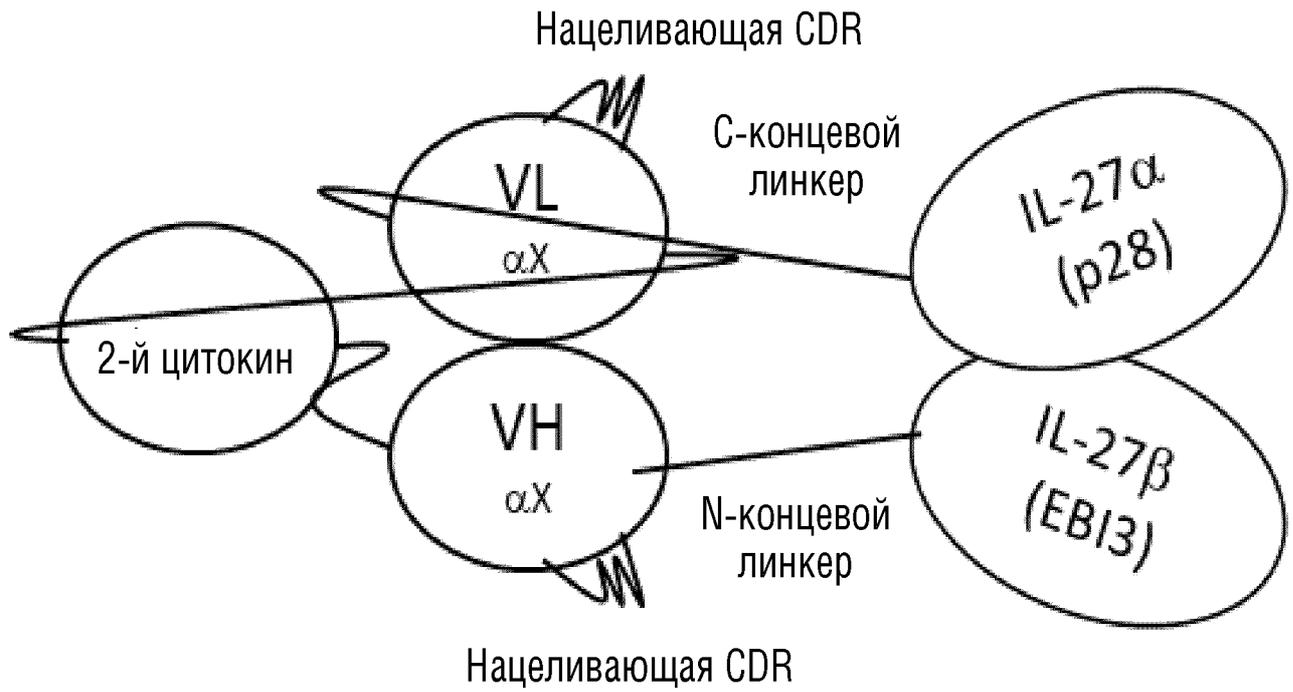
ФИГ.1



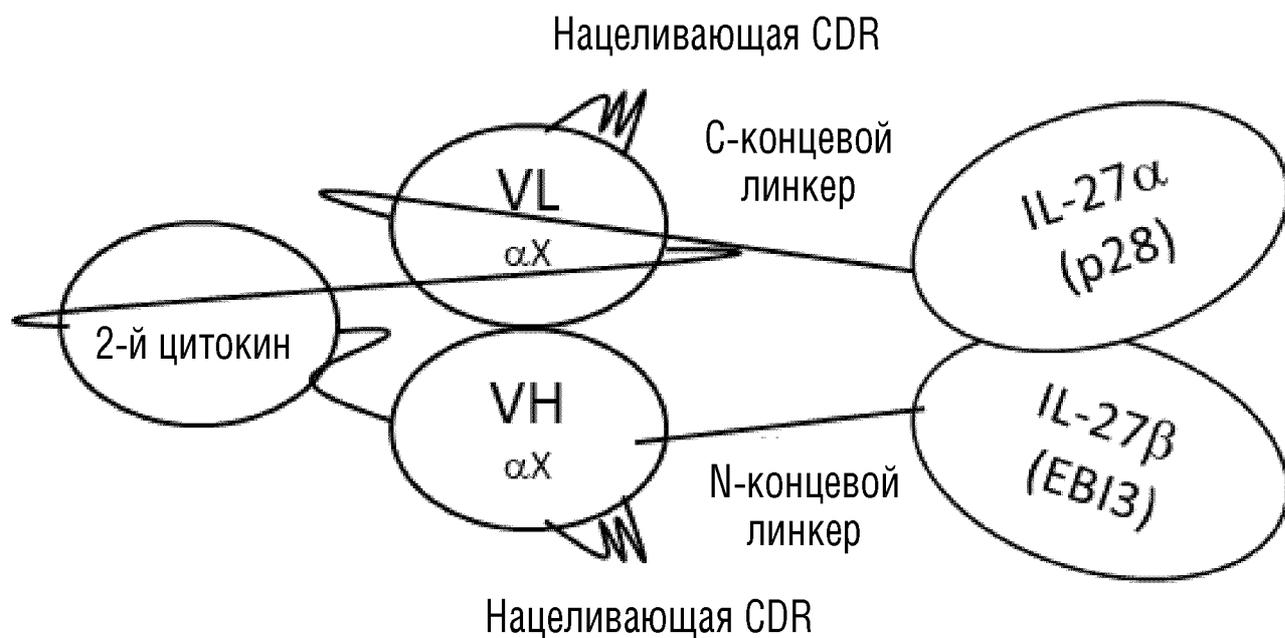
ФИГ.2



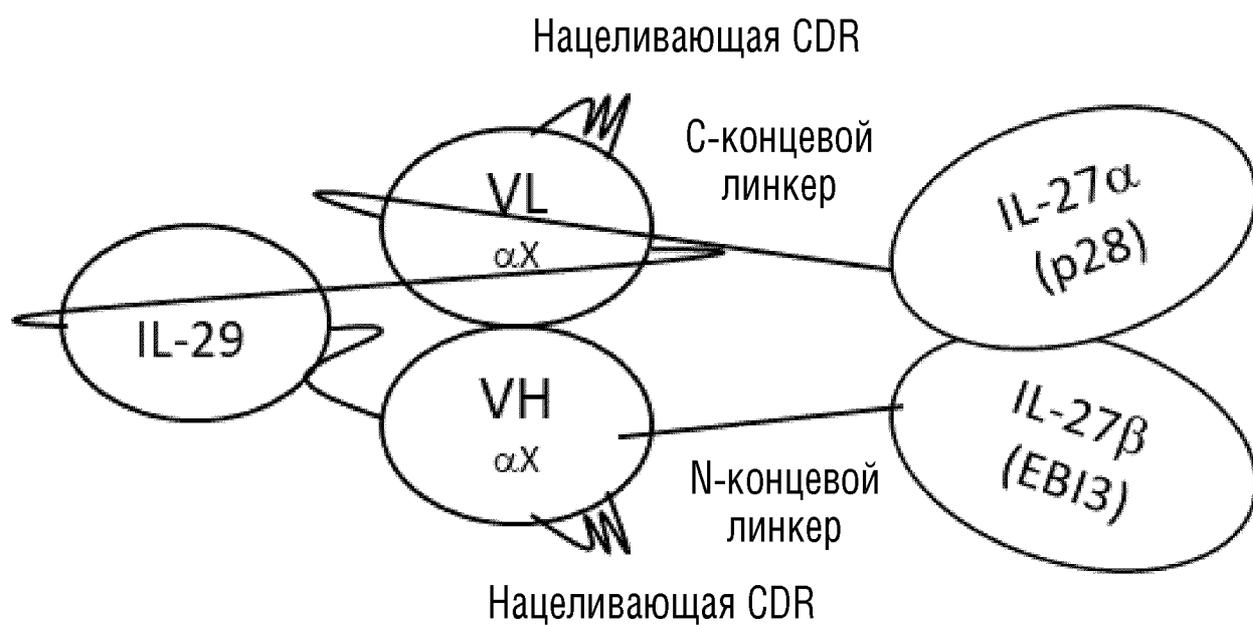
ФИГ.3



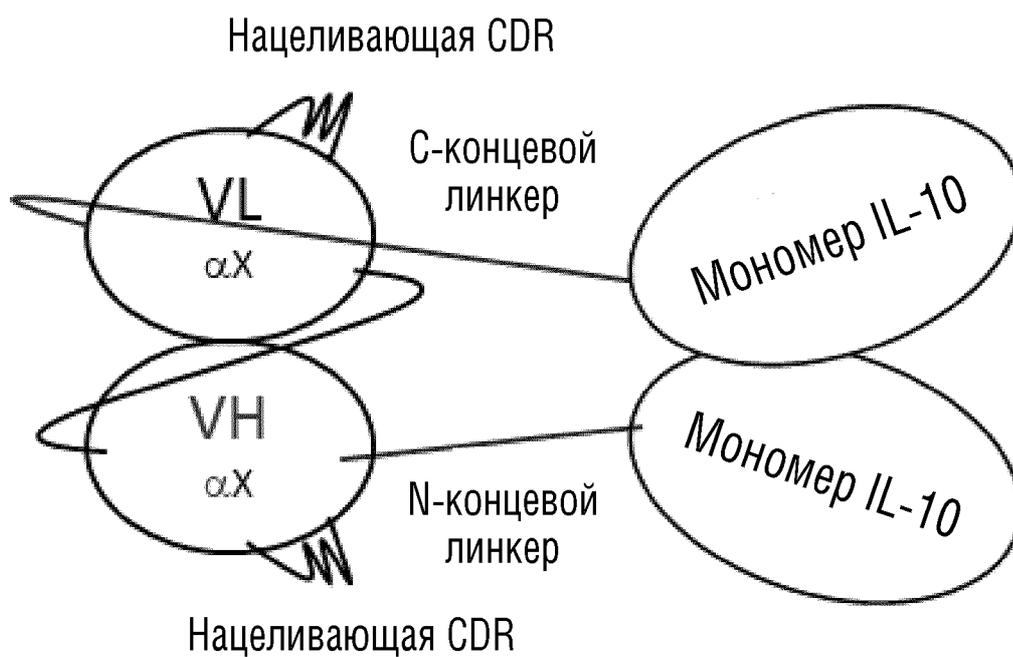
ФИГ.4



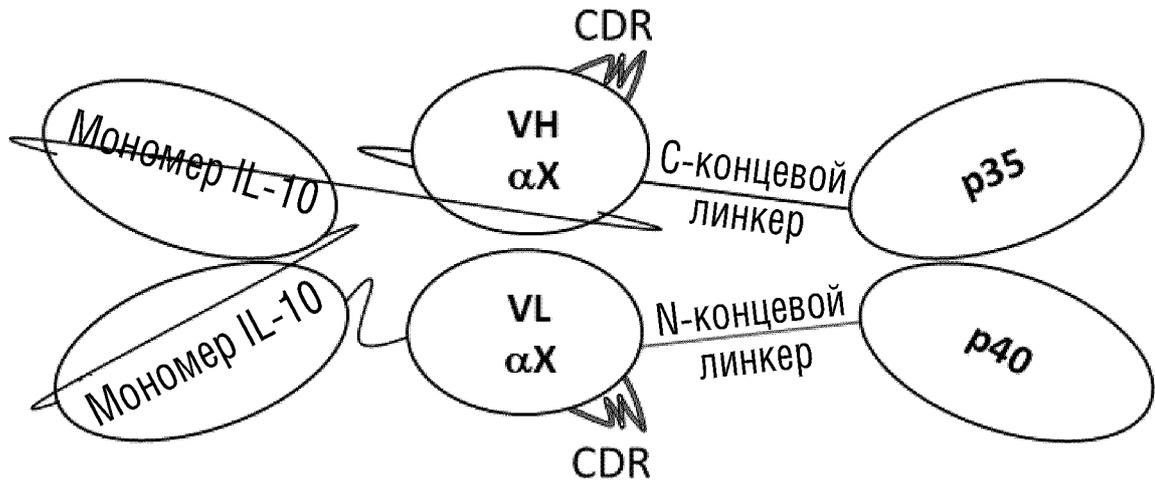
ФИГ.5



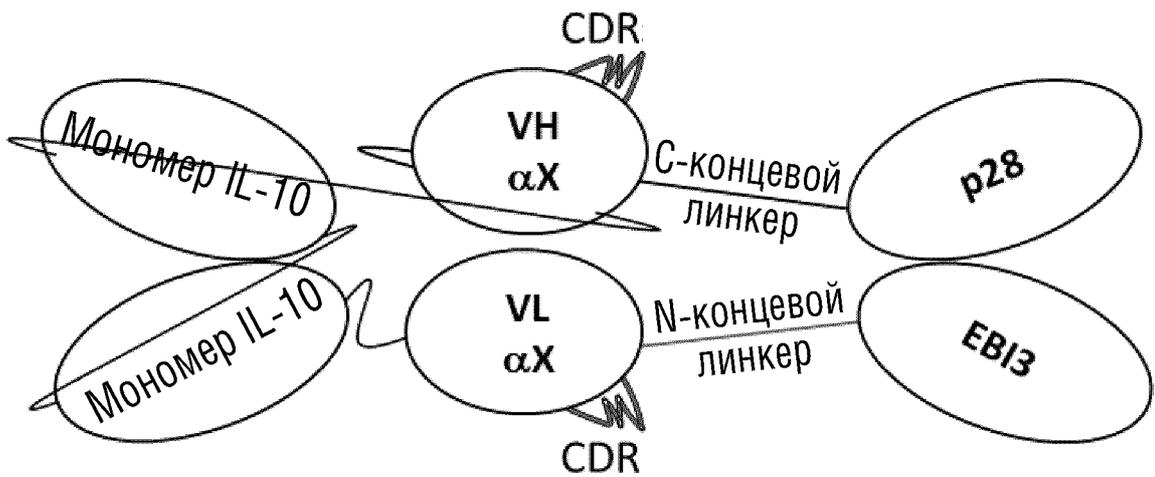
ФИГ.6



ФИГ.7

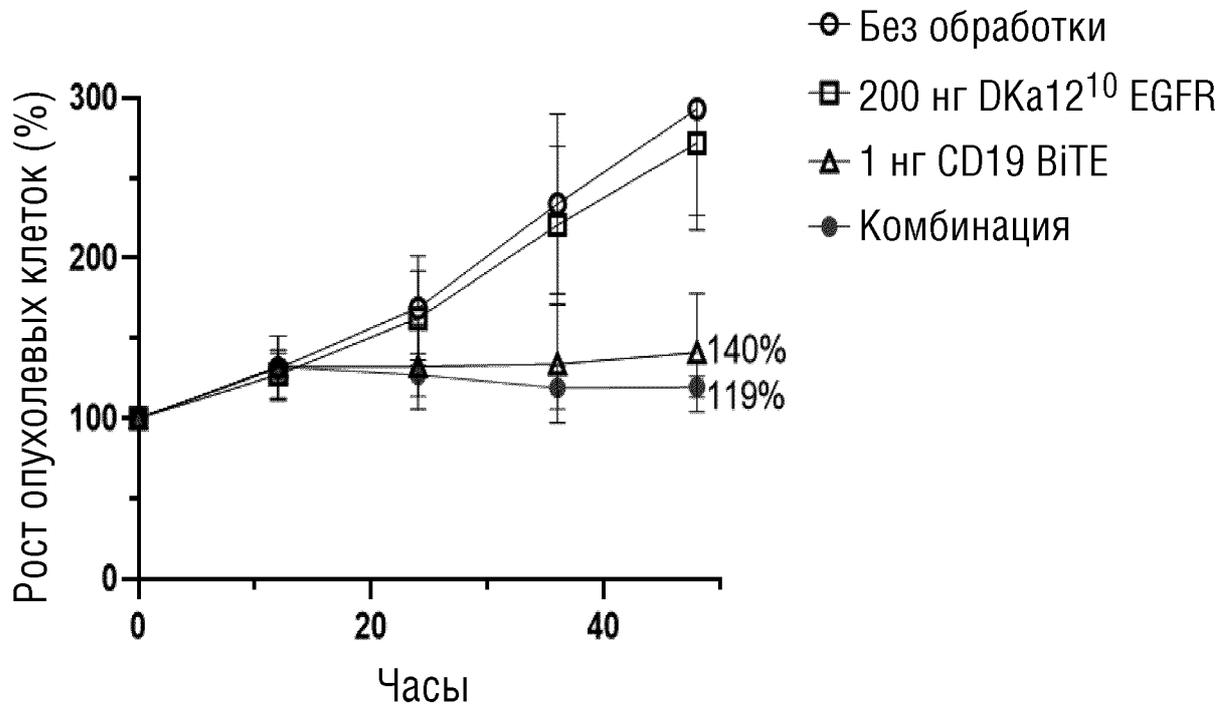


ФИГ.8



ФИГ.9

Анализ ViTE для DK12¹⁰EGFR со стандартными линкерами



ФИГ.10

Анализ ViTE для DK12¹⁰EGFR с удлинёнными линкерами

