

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491563 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.04

(22) Дата подачи заявки
2022.12.16

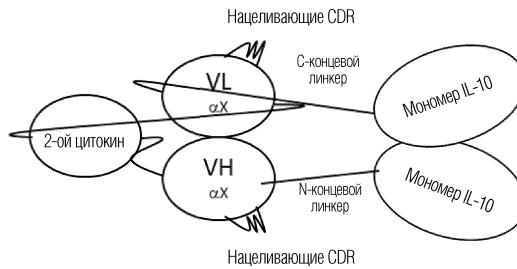
(51) Int. Cl. *A61K 38/20* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ СЛИТЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ДВУХ ЦИТОКИНОВ,
СОДЕРЖАЩИХ ИЛ-10, И ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ АДОПТИВНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ
ИЛИ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АКТИВАТОРОВ Т-КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) 63/265,521
(32) 2021.12.16
(33) US
(86) PCT/US2022/081862
(87) WO 2023/115033 2023.06.22
(88) 2023.08.17

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

(57) Настоящее изобретение относится к способу лечения рака или опухоли, включающему введение композиции слитого белка на основе двух цитокинов, ее фармацевтической композиции и/или состава, содержащих молекулы ИЛ-10 или варианта ИЛ-10, слитые с каркасной системой одноцепочечного вариабельного фрагмента, и второй цитокин, где второй цитокин связан в шарнирной области scFv, в комбинации с препаратами для адоптивной клеточной терапии или биспецифическими активаторами Т-клеток.



202491563
A1

202491563
A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581529EA/081

ПРИМЕНЕНИЕ СЛИТЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ДВУХ ЦИТОКИНОВ, СОДЕРЖАЩИХ IL-10, И ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ АДОПТИВНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ИЛИ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АКТИВАТОРОВ Т-КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США с серийным номером 63/265521, поданной 16 декабря 2021 г., содержание которой включено во всей своей полноте в настоящий документ посредством ссылки.

Список последовательностей

[0002] Содержимое электронного перечня последовательностей (039451-00085-Sequence-Listing.xml; размер: 107499 байтов; дата создания: 16 декабря 2022 г.) включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники

[0003] Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, и более конкретно, к применению нового слитого белка на основе двух цитокинов, названного диакином, содержащего интерлейкин-10 («IL-10») и интерлейкин-2 («IL-2») в комбинации с обычными препаратами для адоптивной клеточной терапии («ACT») или биспецифическими активаторами Т-клеток («ViTE») для лечения рака.

Введение

[0004] IL-10, первоначально названный фактором, ингибирующим синтез цитокинов (Malefyt, Interleukin 10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes, 1991), является плейотропным цитокином, который, как известно, подавляет воспалительную ответную реакцию (Fedorak, 2000), и позднее было установлено, что он активирует CD8⁺ Т-клетки с индукцией зависимых от интерферона-γ («IFNγ») противоопухолевых иммунных ответов (Mumm J., 2011). IL-10 представляет собой нековалентный гомодимерный цитокин со структурным сходством с IFNγ. IL-10 связывается с рецептором IL-10, который состоит из двух субъединиц рецептора 1 IL-10 (IL10R1) и двух субъединиц рецептора 2 IL-10 (IL10R2) (Moore, 2001). Рецепторный комплекс IL-10 экспрессируется на поверхности большинства гемопоэтических клеток и на наиболее высоком уровне экспрессируется на макрофагах и Т-клетках. Несмотря на сообщения о том, что IL-10 является как иммуносупрессорным (Schreiber, 2000), так и иммуностимулятором цитокином (Mumm, 2011), клиническая оценка лечения IL-10 пациентов с болезнью Крона привела к противоположному дозозависимому эффекту (Fedorak, 2000; Schreiber, 2000), в то время как лечение онкологических пациентов пегилированным IL-10 приводило к дозозависимым высоким противоопухолевым ответам (Naing, 2018). Для противоопухолевого ответа пегилированного IL-10 требуются эндогенные CD8⁺ Т-клетки и IFNγ (Mumm, 2011). Обработка животных с опухолями пегилированным IL-10 приводит

к увеличению количества интратуморальных CD8⁺ Т-клеток и увеличению IFN γ в расчете на клетку. Однако совсем недавно было установлено, что у онкологических больных, получавших пегилированный ИЛ-10, были обнаружены признаки иммунной стимуляции, но не усиление противоопухолевого ответа (Spigel, 2020).

[0005] Интерлейкин-2 («ИЛ-2») представляет собой плеiotропный цитокин из четырехспиральных пучков, который, как известно, индуцирует противоопухолевые иммунные ответы (Jiang, 2016), но также проявляет высокую токсичность за счет неконтролируемой активации и секреции IFN γ естественными клетками-киллерами («NK») и CD4⁺ Т-клетками, а также экспансию регуляторных Т-клеток (Chinen, 2016). По этой причине многие группы исследователей пытались мутировать ИЛ-2 для снижения его связывания с высокоаффинным рецептором для уменьшения токсичности ИЛ-2 (Chen, 2018). Такие мутации не привели к существенному клиническому успеху (Bentebibe, 2019). Это предполагает необходимость использования других механизмов для снижения потенциально летальной токсичности ИЛ-2.

[0006] Сообщалось, что ИЛ-10 подавляет регулируемую ИЛ-2 продукцию IFN γ , секретированного как NK, так и CD4⁺ Т-клетками (Scott, 2006), но также сообщалось, что он функционирует в качестве кофактора для индуцированной ИЛ-2 пролиферации CD8⁺ Т-клеток (Groux, 1998). Следовательно, неизвестно, насколько ИЛ-2 и ИЛ-10 будут коактивировать клетки иммунной системы или нейтрализовать друг друга.

[0007] Неожиданно было обнаружено, что варианты ИЛ-10 вируса Эпштейна-Барра («EBV») с одной и более аминокислотными заменами (в аминокислотных положениях 31, 75 или в обоих положениях аминокислотной последовательности зрелого EBV ИЛ-10 с SEQ ID NO: 3) в ключевых областях домена, связывающегося с рецептором ИЛ-10, изменяют способность EBV ИЛ-10 связываться с рецептором ИЛ-10 и активировать его. Такие модификации включали способность повышать аффинность EBV ИЛ-10 к рецептору ИЛ-10. Авторы изобретения обнаружили, что варианты молекул EBV ИЛ-10 функционируют в качестве агонистов рецептора ИЛ-10, которые способны оказывать лечебное действие в отношении заболеваний иммунной системы, воспалительных заболеваний или патологических состояний, и в лечении рака. Высокоаффинный вариант EBV ИЛ-10 (который содержит две аминокислотные замены в положениях 31 и 75, названный «DV07»), при включении в виде мономеров в каркасную систему на основе одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), включающую неиммуногенную вариабельную область тяжелой цепи («VH») и вариабельную область легкой цепи («VL»), привело к образованию молекулы с пролонгированным периодом полувыведения, которая правильно сворачивалась и оставалась функционально активной. См. патенты США № 10858412; 10975133; 10981965; 10975134; и 10981966, каждый из которых в полном объеме включен в настоящий документ посредством ссылки; см. также фиг. 1 в качестве репрезентативного схематического представления. Варианты EBV ИЛ-10, включенные в каркасную систему, показали усиление функции ИЛ-10 как в отношении воспалительных клеток (например, моноцитов/макрофагов/дендритных клеток), так и иммунных клеток

(например, CD8⁺ Т-клеток) (см. выше). В одной итерации в каркасной системе scFv использовали VH- и VL-области, первоначально полученные из человеческого антитела против вируса Эбола. Один слитый белок на основе цитокинов был назван DeboDV07. Авторы изобретения также обнаружили, что функциональные свойства IL-10 не нарушались, когда 6 определяющих комплементарность участков («CDR») из VH- и VL-областей scFv, первоначально полученных из человеческого антитела против вируса Эбола, были привиты (т.е. 6 CDR из одного антитела были заменены на 6 CDR из второго антитела) с 6 CDR из антител, распознающих различные опухолеассоциированные антигены («ТАА»), такие как анти-EGFR, анти-VEGFR1, анти-VEGFR2 и анти-HER2 антитела. См. патенты США № 10858412; 10975133; 10981965; 10975134 и 10981966.

[0008] Авторы изобретения усовершенствовали DeboDV07 посредством включения второго цитокина в один слитый белок на основе цитокинов (описанный выше; см. также находящуюся на рассмотрении заявку на патент США 17/199239, поданную 11 марта 2021 г., в полном объеме включенную в настоящий документ посредством ссылки). В частности, второй цитокин встроен в линкерную область между VH- и VL-областями scFv. См., например, фиг. 2 (репрезентативное схематическое представление слитого белка с двумя цитокинами). Слитый белок на основе двух цитокинов способен доставлять как IL-10, так и другой цитокин (например, IL-2, не ограничиваясь этим) к специфическим ТАА при прививке CDR из моноклональных антител, нацеленных на различные ТАА. В настоящей заявке авторы изобретения описывают новое применение слитого белка на основе двух цитокинов, известного как ДиакинTM («DK»), для усиления других известных иммунотерапевтических методов, таких как адоптивная клеточная терапия («ACT»), включая, не ограничиваясь Т-клетки с химерным антигенным рецептором («CAR-T»), сконструированные Т-клеточные рецепторы Т-клетки («TCR-T»), естественные клетки-киллеры («NK») и/или опухоль-инфильтрирующие лимфоциты («TIL»), и биспецифические активаторы Т-клеток («BiTE»). Как здесь используется, термин «диакин» или «диакины» представляет собой общий термин, который относится к новому классу слитых белков на основе двух цитокинов, связанных друг с другом посредством нацеленного и пролонгирующего период полувыведения scFv.

[0009] В отношении CAR-T-клеточной терапии, то эта терапия показала значительный успех в лечении гематологических злокачественных новообразований, но было ограниченное число эквивалентных примеров при использовании этих CAR-T-клеток в лечении солидных опухолей (Ma, 2019; Castellarin, 2018; Wagner, 2020).

[0010] Проблемы, связанные с нынешним подходом, вероятно, имеют сходство с большинством иммуностимулирующих методов лечения. В частности, проблемы включают нецелевую токсичность (Bonifant, 2016; Bianca Santomaso, 2019), персистенцию CAR-T-клеток (Jafarzadeh, 2020; Christopher DeRenzo, 2019) и способность инфильтрировать микроокружение опухоли («TME») (Rodriguez-Garcia, 2020; Zou, 2019).

[0011] Как IL-2 (Groux, 1998; Ross, 2018), так и IL-10 (Berman, 1996; Chan, 2015; Naing A., 2018; Naing A., Safety, Antitumor Activity, and Immune Activation of Pegylated

Recombinant Human Interleukin-10 (AM0010) in Patients With Advanced Solid Tumors, 2016; Emmerich, 2012; Mumm J., 2011), специфически усиливают противоопухолевую функцию Т-клеток. Однако, хотя сообщалось, что пегилированный ИЛ-10 повышает функцию CAR-T (McCauley, 2018), использование ИЛ-2 в комбинации с CAR-T-клеточной терапией чревато проблемами, в первую очередь за счет токсичности, связанной с ИЛ-2 (Tang, 2018).

[0012] Следовательно, настоящая заявка преодолевает эту проблему за счет применения, в одном аспекте, диакина, содержащего как (1) ИЛ-2, так и ИЛ-10, названного DK2¹⁰, который контролирует опосредованную ИЛ-2 токсичность, (2) ИЛ-12 и ИЛ-10, (3) ИЛ-7 и ИЛ-10 или (4) ИЛ-15 и ИЛ-10. Обогащая сопряженными ИЛ-2 и ИЛ-10 сосудистую сеть опухоли посредством нацеливания на ТАА, такой как EGFR2, HER2 или VEGFR2 (Smith, 2010), и это лишь некоторые из них, DK2¹⁰ будет стимулировать активацию TME CAR-T-клеток, способствуя активации, инфильтрации и персистенции при одновременном снижении токсичности как за счет опухолеспецифической активации CAR-T, так и за счет прямого подавления синдрома высвобождения цитокинов и токсичности ИЛ-2 посредством DV07. Такое же предположение считается многообещающим для АСТ и ViTE терапии.

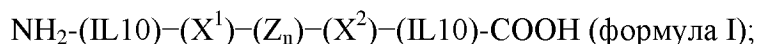
Сущность изобретения

[0013] Настоящее изобретение, в общем, относится к способу применения слитого белка на основе двух цитокинов, называемого диакином, в комбинации с обычными иммунотерапевтическими методами.

[0014] Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к способу применения диакина, содержащего ИЛ-10 или различные варианты ИЛ-10, нацеливающий домен, пролонгирующий период полувыведения, и второй цитокин, в комбинации с обычными препаратами для иммунотерапевтических методов, включая, помимо прочего, сконструированные иммунные клетки (такие как CAR-T-клетки, TCR-T-клетки, TIL или NK-клетки) или ViTE. В некоторых вариантах осуществления в способе используется диакин, содержащий ИЛ-10, такой как, помимо прочего, формы ИЛ-10 человека, мыши, цитомегаловируса («CMV») или EBV или варианты молекул ИЛ-10, где вариант ИЛ-10 имеет одну или более аминокислотных замен, которые влияют на домены, связывающиеся с рецептором ИЛ-10. В некоторых вариантах осуществления в способе используется диакин, содержащий ИЛ-10, ИЛ-12 или ИЛ-27, или их варианты. Каждый из вышеуказанных вариантов диакина, содержащий ИЛ-10, ИЛ-12 или ИЛ-27, также будет включать второй цитокин, который отличается от первого цитокина и функционирует в тандеме с ИЛ-10, ИЛ-12 или ИЛ-27 или их вариантами, так что в результате имеет место аддитивный или синергический эффект, когда первый и второй цитокины соединяются и нацеливаются вместе на специфический антиген посредством пролонгации периода полувыведения антиген-нацеливающего домена диакина. Такие вторые цитокины включают, среди прочего, ИЛ-6, ИЛ-4, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-5, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-15, ИЛ-21, ИЛ-26, ИЛ-27, ИЛ-28, ИЛ-29, GM-CSF, G-CSF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β или TNF- α , TNF- β , основной FGF, EGF, PDGF, ИЛ-4, ИЛ-11 или ИЛ-13, предпочтительно ИЛ-2. Антиген-нацеливающий домен диакина включает нацеливающий домен, выбранный из антитела,

фрагмента антитела (например, scFv, антигенсвязывающего фрагмента) или антигенсвязывающего участка, которые направляют диакин к целевому антигену, распознаваемому вариабельной областью тяжелой цепи (VH) и вариабельной областью легкой цепи (VL) антитела, фрагмента антитела или их антигенсвязывающего участка. В некоторых вариантах осуществления антиген-нацеливающий домен представляет собой scFv. В некоторых аспектах scFv обладает специфичностью к опухолеассоциированному антигену (ТАА), где ТАА выбран из множества антигенных мишеней, обнаруженных на поверхности солидных или гематологических опухолей. В одном аспекте антиген-нацеливающий домен представляет собой scFv, содержащий 3 CDR в VH-области и 3 CDR в VL-области scFv. В другом аспекте на scFv могут быть привиты 3 CDR в VH и 3 CDR в VL из другого антитела, но с сохранением исходных каркасных областей VH и VL. В еще одних вариантах осуществления сконструированная клетка включает рекомбинантный антигенный рецептор, такой как, помимо прочего, CAR, Т-клеточный рецептор («TCR») или функциональный не-TCR, предпочтительно CAR, который специфически нацелен на опухолеассоциированный антиген (ТАА). В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой Т-клетку.

[0015] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу применения диакина формулы (I) в комбинации со сконструированной иммунной клеткой или ViTE, нацеленными на ТАА, где формула (I) представляет собой:



где:

«IL10» представляет собой мономер IL-10, где IL-10 представляет собой IL-10 человека, мыши, CMV или EBV, или их вариант, более предпочтительно IL-10 представляет собой мономер, содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 7, 9 или 10,

«X¹» представляет собой VL- или VH-область, полученную из первого моноклонального антитела; «X²» представляет собой VH- или VL-область, полученную из первого моноклонального антитела; где, когда X¹ представляет собой VL, то X² представляет собой VH, или когда X¹ представляет собой VH, то X² представляет собой VL, где предпочтительно VH- и VL-области представляют собой scFv, полученный из человеческого антитела против вируса Эбола, и на VH- и VL-области привиты 6 CDR (3 из VH и 3 из VL) второго антитела;

«Z» представляет собой любой цитокин, иной чем IL-10, предпочтительно 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, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β или TNF- α , TNF- β , основной FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11 или IL-13; и

«n» представляет собой целое число, выбранное из 1-2,

где второе антитело представляет собой антитело к VEGFR2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD44, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, IL-22R1, антигену созревания В-клеток (BCMA),

лектиноподобной молекуле-1 С-типа (CLL01), CD5, CD147, латентному мембранному белку 1 (LMP-1), сигнальной молекуле активации лимфоцитов F7 (SLAMF7), NY-ESO-1, трансмембранному активатору и интерактору CAML (TACI), CS-1, CXCR4, NKG2D, B7-H3, EGFR, PD-1, PDL-1, HER2, HER3, EpCAM, PSCA, MUC1, Lewis-Y, GPC3, AXL, клаудину18.2, GD2, CTLA-4, CEA, PDGFR, мезотелину (MESO), PSCA, PSMA, BCMA или PSA.

[0016] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу применения диакина IL-10 формулы (II) в комбинации с иммунной клеткой или BiTE, нацеленных на TTA.

$\text{NH}_2\text{-(IL10)-(L)-(X}^1\text{)-(L)-(Zn)-(L)-(X}^2\text{)-(L)-(IL10)-COOH}$ (формула II);

где:

«IL-10» представляет собой мономерную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 7, 9 или 10;

«L» представляет собой любой линкер, более предпочтительно, линкер выбран из SEQ ID NO: 39, 40 или 41;

«X¹» представляет собой VL- или VH-область, полученную из первого моноклонального антитела; «X²» представляет собой VH- или VL-область, полученную из первого моноклонального антитела; где, когда X¹ представляет собой VL, то X² представляет собой VH, или когда X¹ представляет собой VH, то X² представляет собой VL, где предпочтительно VH- и VL-области представляют собой scFv, полученный из человеческого антитела против вируса Эбола, и на VH- и VL-области привиты 6 CDR (3 из VH и 3 из VL) второго антитела; где второе антитело представляет собой антитело к VEGFR2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD44, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, IL-22R1, BCMA, CLL01, CD5, CD147, ILMP-1, SLAMF7, NY-ESO-1, TACI, CS-1, CXCR4, NKG2D, B7-H3, EGFR, PD-1, PDL-1, HER2, HER3, EpCAM, PSCA, MUC1, Lewis-Y, GPC3, AXL, клаудину18.2, GD2, CTLA-4, CEA, PDGFR, MECO, PSCA, PSMA, BCMA или PSA;

«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, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β или TNF- α , TNF- β , основного FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11 или IL-13, предпочтительно IL-2; и

«n» представляет собой целое число, выбранное из 1-2.

[0017] В еще одних аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества диакина, предпочтительно DK2¹⁰, DK7¹⁰, DK12¹⁰, DK15¹⁰, DK21¹⁰, DK27¹⁰, DKIFNa¹⁰ в комбинации со сконструированными иммунными клетками, предпочтительно для CAR-T-терапии или BiTE, где DK2¹⁰, DK7¹⁰, DK12¹⁰, DK15¹⁰, DK21¹⁰, DK27¹⁰, DKIFNa¹⁰ включают каркасную систему против вируса Эбола (которая содержит пару VH/VL или scFv), на которую привиты CDR из антитела со специфичностью к VEGFR2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD44, CD52,

CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, IL-22R1, BCMA, CLL01, CD5, CD147, ILMP-1, SLAMF7, NY-ESO-1, TACI, CS-1, CXCR4, NKG2D, B7-H3, EGFR, PD-1, PDL-1, HER2, HER3, EpCAM, PSCA, MUC1, Lewis-Y, GPC3, AXL, клаудину18.2, GD2, CTLA-4, CEA, PDGFR, MESO, PSCA, PSMA, BCMA или PSA.

[0018] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу применения диакина IL-12 формулы (III) в комбинации со сконструированной иммунной клеткой или BiTE, нацеленными на ТАА.

[0019] $\text{NH}_2\text{-(R}^1\text{)-(X}^1\text{)-(Zn)-(X}^2\text{)-(R}^2\text{)-COOH}$ (формула IIIa);

[0020] $\text{NH}^2\text{-(R}^2\text{)-(X}^1\text{)-(Zn)-(X}^2\text{)-(R}^1\text{)-COOH}$ (формула IIIb);

где:

«R¹» представляет собой альфа-субъединицу любого мультисубъединичного первого цитокина, предпочтительно либо альфа-субъединицу IL-12 (p35), либо альфа-субъединицу IL-27 (p28), более предпочтительно субъединицу с SEQ ID NO: 45 или 47.

«R²» представляет собой бета-субъединицу любого мультисубъединичного первого цитокина, предпочтительно либо бета-субъединицу IL-12 (p40), либо бета-субъединицу IL-27 (EBI3), более предпочтительно субъединицу с SEQ ID NO: 46 или 48;

где R¹ представляет собой альфа-субъединицу первого цитокина, R² представляет собой бета-субъединицу первого цитокина; или когда R¹ представляет собой p35, то R² представляет собой p40; или когда R¹ представляет собой p28, то R² представляет собой EBI3; или когда R¹ представляет собой SEQ ID NO: 45 или 47, то R² представляет собой SEQ ID NO: 46 или 48; или когда R¹ представляет собой SEQ ID NO: 46 или 48, то R² представляет собой SEQ ID NO: 45 или 47;

«X¹» представляет собой VH- и VL-область, полученную из первого моноклонального антитела; «X²» представляет собой VH- и VL-область, полученную из первого моноклонального антитела; где, когда X¹ представляет собой VL, то X² представляет собой VH, или когда X¹ представляет собой VH, то X² представляет собой VL;

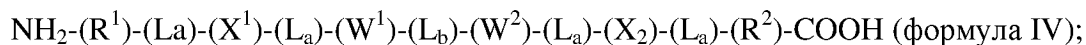
«Z» представляет собой любой цитокин, который усиливает биологическую функцию мультисубъединичного цитокина, предпочтительно IFN α -2a, IL-28, IL-29, и

«n» представляет собой целое число, выбранное из 1-2,

где первое моноклональное антитело представляет собой антитело против вируса Эбола, на которое привиты CDR из второго антитела со специфичностью к VEGFR2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD44, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, IL-22R1, BCMA, CLL01, CD5, CD147, ILMP-1, SLAMF7, NY-ESO-1, TACI, CS-1, CXCR4, NKG2D, B7-H3, EGFR, PD-1, PDL-1, HER2, HER3, EpCAM, PSCA, MUC1, Lewis-Y, GPC3, AXL, клаудину18.2, GD2, CTLA-4, CEA, PDGFR, MESO, PSCA, PSMA, BCMA или PSA.

[0021] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу применения диакина, содержащего два мультисубъединичных цитокина, таких как IL-12, IL-27 или IL-10 формулы (IV) в комбинации со сконструированной иммунной клеткой или

BiTE, нацеленными на ТАА, где указанный диакин 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-альфа-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 SEQ ID NO: 43-44;

«L_b» представляет собой любой линкер; предпочтительно GGGSGGG или SEQ ID NO: 43;

X¹» представляет собой VH- и VL-область, полученную из первого моноклонального антитела; «X²» представляет собой VH- и VL-область, полученную из первого моноклонального антитела; где, когда X¹ представляет собой VL, то X² представляет собой VH, или когда X¹ представляет собой VH, то 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-альфа-субъединицу первого цитокина, такого как IL-12 или IL-27, или второй мономер гомодимерного цитокина, такого как IL-10, предпочтительно второй мономер IL-10,

где на первое моноклональное антитело привиты CDR из антитела со специфичностью к VEGFR2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD44, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, IL-22R1, BCMA, CLL01, CD5, CD147, ILMP-1, SLAMF7, NY-ESO-1, TACI, CS-1, CXCR4, NKG2D, B7-H3, EGFR, PD-1, PDL-1, HER2, HER3, EpCAM, PSCA, MUC1, Lewis-Y, GPC3, AXL, клаудину.2, GD2, CTLA-4, CEA, PDGFR, MESO, PSCA, PSMA, BCMA или PSA.

[0022] Приведенное выше упрощенное краткое изложение репрезентативных аспектов служит для обеспечения базового понимания настоящего раскрытия. Данное резюме не является обширным обзором всех предполагаемых аспектов и не предназначено ни для определения ключевых или критических элементов всех аспектов, ни для определения объема любого или всех аспектов настоящего раскрытия. Его единственная цель состоит в том, чтобы представить один или более аспектов в упрощенной форме в качестве введения к более подробному описанию изобретения, которое следует ниже. Для достижения вышеизложенного один или более аспектов настоящего изобретения включают в себя признаки, описанные и указанные в качестве примера в формуле изобретения.

Краткое описание фигур

[0023] На фиг. 1 приведено схематическое представление одного варианта осуществления слитого белка на основе IL-10 первого поколения, который представляет собой слитый белок на основе цитокинов, ранее описанный в патенте США № 10858412.

[0024] На фиг. 2 приведено схематическое представление диакина по настоящему изобретению, где слитый белок на основе двух цитокинов содержит связанные по концам мономеры IL-10 (или варианты IL-10), где второй цитокин вставлен в линкер между VH и VL scFv.

[0025] На фиг. 3 приведено схематическое представление диакина по настоящему изобретению, где слитый белок на основе двух цитокинов содержит два мультисубъединичных цитокина, где один связан на конце (например, IL-12 или IL-27), и другой слит между областью линкера scFv (например, два мономера IL-10 или варианты IL-10).

[0026] На фиг. 4 приведено схематическое представление предполагаемого механизма применения DK2¹⁰ с привитыми CDR, нацеленными, например, на VEGFR2.

[0027] На фиг. 5A-5F представлены трансплантаты, демонстрирующие индукцию цитокинов IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-12p70, IFN α 2a и IL-6 в наивных PBMC от здоровых доноров в ответ на диакин (DK2¹⁰), IL-10 или IL-2.

[0028] На фиг. 6A-6D представлены трансплантаты, демонстрирующие индукцию цитокинов IL-4, IL-17, IL-8 и GM-CSF в наивных PBMC от здоровых доноров в ответ на диакин (DK2¹⁰), IL-10 или IL-2.

[0029] На фиг. 7 представлены результаты определения уровней гранзима B в CD8⁺ T-клетках в ответ на диакин в возрастающих концентрациях в ответ на стимуляцию анти-CD3 на 24, 48 и 72 ч.

[0030] На фиг. 8 представлены результаты определения уровней IFN- γ в CD8⁺ T-клетках в ответ на диакин в возрастающих концентрациях в ответ на стимуляцию анти-CD3 на 24, 48 и 72 ч.

[0031] На фиг. 9 представлены результаты определения уровней TNF- α в CD8⁺ T-клетках в ответ на диакин в возрастающих концентрациях в ответ на стимуляцию анти-CD3 на 24, 48 и 72 ч.

[0032] На фиг. 10A и 10B показаны эффекты комбинирования диакина (DK2¹⁰CD19) с CAR-T-клеткой (CD20 CAR T) в снижении количества опухолевых клеток-мишеней (Raji), где CD8⁺ T-клетки праймировали в присутствии диакина в течение 1 суток. На фиг. 10A представлено соотношение эффектора к мишени 3:1, и на фиг. 10B представлено соотношение эффектора к мишени 1:3.

[0033] На фиг. 11A-11F показаны эффекты комбинирования диакина (DK2¹⁰ egfr) с ViTE (CD3 \times CD19 ViTE в концентрации 0,01 нг/мл) в снижении количества опухолевых клеток-мишеней (Raji), где CD8⁺ T-клетки праймировали в присутствии диакина в течение 2 суток. На фиг. 11A-11D представлены уровни секреции цитокинов TNF-альфа, IFN-гамма, гранзима B и перфорина CD8⁺ T-клетками в присутствии DK2¹⁰ и CD19 ViTE. На

фиг. 11E и 11F представлены цитолитические профили CD8⁺ Т-клеток при комбинировании с DK2¹⁰ и CD19 ViTE.

[0034] На фиг. 12A-12F показаны эффекты комбинирования диакина (DK2¹⁰CD19) с ViTE (CD3×CD20 ViTE в концентрации 0,1 нг/мл) в снижении количества опухолевых клеток-мишеней (Raji), где CD8⁺ Т-клетки праймировались в присутствии диакина в течение 3 суток. На фиг. 12A-12D представлены уровни секреции цитокинов TNF-альфа, IFN-гамма, гранзима В и перфорина CD8⁺ Т-клетками в присутствии DK2¹⁰ и CD20 ViTE. На фиг. 12E и 12F представлены цитолитические профили CD8⁺ Т-клеток при комбинировании с DK2¹⁰ и CD20 ViTE.

[0035] На фиг. 13 показан эффект комбинирования диакина (DK7¹⁰) с CD19 ViTE. Данные показывают сравнение с контролем (т.е. без DK7¹⁰, без CD19 ViTE), только с одним DK7¹⁰, только с одним CD19 ViTE и комбинацией DK7¹⁰ и CD19 ViTE. Данные показывают, что комбинация DK7¹⁰ и CD19 ViTE усиливали цитолиз по сравнению с CD19 ViTE.

[0036] На фиг. 14 показан эффект комбинирования диакина (DK12¹⁰) с CD19 ViTE. Данные показывают сравнение с контролем (т.е. без DK12¹⁰, без CD19 ViTE), только с одним DK12¹⁰, только с одним CD19 ViTE и комбинацией DK12¹⁰ и CD19 ViTE. Данные показывают, что комбинация DK12¹⁰ и CD19 ViTE усиливали цитолиз по сравнению с CD19 ViTE.

Подробное описание изобретения

[0037] Примерные аспекты описаны в настоящем документе в контексте класса слитых белков на основе двух цитокинов, названных диакинами, где диакины содержат IL-10, IL-12 или IL-27, и способов лечения рака, включающих введение диакина, содержащего IL-10 и IL-2 (DK2¹⁰) или IL-10 и IL-7 (DK7¹⁰), IL-10 и IL-12 (DK12¹⁰), IL-10 и IL-15 (DK15¹⁰), IL-10 и IL-21 (DK21¹⁰), IL-10 и IFN-гамма (DKIFNa¹⁰) или IL-10 и IL-27 (DK27¹⁰) в комбинации со сконструированными иммунными клетками, или АСТ (например, CAR-T, ТСТ-Т, ТИЛ или NK) или ViTE, нацеленными на опухолеассоциированный антиген (ТАА). Специалистам в данной области должно быть понятно, что последующее описание является только иллюстративным и никоим образом не предназначено для ограничения. Другие аспекты будут легко понятны специалистам в данной области техники, имеющим преимущество настоящего раскрытия. Теперь будет сделана подробная ссылка на осуществление иллюстративных аспектов, как показано в последующем описании и на прилагаемых чертежах. Одни и те же ссылочные указатели будут использоваться, насколько это возможно, на чертежах и в последующем описании для обозначения одних и тех же или подобных элементов.

[0038] Несмотря на то, что ряд способов и материалов, подобных или эквивалентных тем, которые описаны в настоящем документе, могут быть использованы при практическом применении различных описанных вариантов осуществления, в настоящем документе описаны предпочтительные материалы и способы.

[0039] Если не указано иное, то в вариантах осуществления, описанных в

настоящем документе, используются общепринятые способы и методики молекулярной биологии, биохимии, фармакологии, химии и иммунологии, хорошо известные специалистам в данной области. Многие из общих методов конструирования и получения вариантов IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, IFN-альфа или IL-27, включая, помимо прочего, формы IL-10 человека, мыши, CMV и/или EBV, а также анализы для тестирования вариантов IL-10, агликозилированных или дегликозилированных форм каждого из вышеуказанных цитокинов и их вариантов, представляют собой хорошо известные способы, которые легко доступны и подробно описаны в данной области техники. 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 пэгиллирования на основе N-концевого альдегида также хорошо известна в данной области.

Определения

[0040] Следующие термины будут использоваться для описания различных вариантов осуществления, обсуждаемых в настоящем документе, и подразумевается, что они определяются, как указано ниже.

[0041] В рамках настоящего изобретения, при описании различных вариантов осуществления формы единственного числа «a», «an» и «the» включают ссылки во множественном числе, если по контексту явно не требуется иное.

[0042] Термин «примерно» относится к отклонению в пределах 0,0001-5% от указанного числа или диапазона чисел. В одном варианте осуществления термин «примерно» относится к отклонению в пределах 1-10% от указанного числа или диапазона чисел. В другом варианте осуществления термин «примерно» относится к отклонению до 25% от указанного числа или диапазона чисел. В более конкретном варианте осуществления термин «примерно» относится к различию в пределах 1-25% в отношении гомологии нуклеотидной последовательности или гомологии аминокислотной последовательности по сравнению с последовательностью дикого типа.

[0043] Термин «интерлейкин-10» или «IL-10» относится к белку, содержащему две идентичные субъединицы, нековалентно соединенные с образованием гомодимера, где IL-10 представляет собой интеркалированный димер из двух шестиспиральных пучков (спирали A-F). Как здесь используется, если не указано иное, то «интерлейкин-10» и «IL-10» относится к белку человеческого IL-10 («hIL-10»; идентификационный номер Genbank NP_000563; или патент США № 6217857) (SEQ ID NO: 1) или нуклеиновой кислоте (SEQ ID NO: 2); белку мышинового IL-10 («mIL-10»; идентификационный номер Genbank: M37897 или патент США № 6217857) (SEQ ID NO: 7) или нуклеиновой кислоте (SEQ ID NO: 8); или вирусному IL-10 («vIL-10»). Гомологи вирусного IL-10 могут быть получены из EBV или CMV (идентификационные номера Genbank NC_007605 и DQ367962 соответственно). Термин EBV-IL10 относится к гомологу EBV белка IL-10 (SEQ ID NO: 3)

или нуклеиновой кислоте (SEQ ID NO: 4). Термин CMV-IL10 относится к гомологу CMV белка IL-10 (SEQ ID NO: 5) или нуклеиновой кислоте (SEQ ID NO: 6). Термин «мономерный» или «мономер» IL-10, используемый здесь, относится к отдельным субъединицам IL-10 или вариантному IL-10, которые при нековалентном связывании образуют гомодимер IL-10 или вариантный IL-10. Термины «дикий тип», «дт» и «нативный» используются здесь взаимозаменяемо для обозначения последовательности белка (например, IL-10, CMV-IL10 или EBV IL-10), которая обычно встречается в природе у конкретного рассматриваемого IL-10 разных видов. Например, термин EBV IL-10 «дикого типа» или «нативный», таким образом, будет соответствовать аминокислотной последовательности, наиболее часто встречающейся в природе.

[0044] Термин «интерлейкин-12» или «IL-12» относится к белку, содержащему альфа- (p35) и бета- (p40) субъединицу, нековалентно соединенные с образованием гетеродимера. Как здесь используется, если не указано иное, то «интерлейкин-12» и «IL-12» относятся к человеческой, мышинной или их вариантным формам. Например, термин «дикий тип» или «нативный», таким образом, будет соответствовать аминокислотной последовательности, которая наиболее часто встречается в природе для альфа- и бета-субъединиц.

[0045] Термин «интерлейкин-27» или «IL-27» относится к белку, содержащему альфа- (p28) и бета- (EBI3) субъединицу, нековалентно соединенные с образованием гетеродимера. Как здесь используется, если не указано иное, то «интерлейкин-27» и «IL-27» относятся к человеческой, мышинной или их вариантным формам. Например, термин «дикий тип» или «нативный», таким образом, будет соответствовать аминокислотной последовательности, которая наиболее часто встречается в природе для альфа- и бета-субъединиц.

[0046] Термины «вариант», «аналог» и «мутеин» относятся к биологически активным производным референтной молекулы, которые сохраняют желаемую активность, например, такую как противовоспалительная активность. Как правило, термины «вариант», «варианты», «аналог» и «мутеин» применительно к полипептиду относятся к соединению или соединениям, имеющим нативную полипептидную последовательность и структуру с одной или более аминокислотными добавлениями, заменами (которые могут быть консервативными по своей природе) и/или делециями относительно нативной молекулы. По существу, термины «вариант IL-10», «вариантный IL-10», «молекула вариантного IL-10», а также их грамматические вариации и формы во множественном числе считаются эквивалентными терминами, которые относятся к аминокислотной последовательности IL-10 (или нуклеиновой кислоты), которая отличается от IL-10 дикого типа примерно на 1-25% по идентичности или гомологии последовательности. Так, например, молекула варианта EBV IL-10 представляет собой молекулу, которая отличается от EBV IL-10 дикого типа наличием одной или более аминокислотных (или нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислоту) добавлений, замен и/или делеций. Таким образом, в одной форме вариант EBV IL-10

представляет собой вариант, который отличается от последовательности дикого типа SEQ ID NO: 3 тем, что имеет примерно от 1% до 25% различий по гомологии последовательностей, что составляет примерно 1-42 аминокислотных различия. В одном варианте осуществления вариант IL-10 представляет собой EBV IL-10, содержащий аминокислотную мутацию A75I (обозначенный здесь «DV06»; SEQ ID NO: 14) или аминокислотные мутации как V31L, так и A75I (обозначенный здесь «DV07»; SEQ ID NO: 16). Термины «вариант IL-12», «вариантный IL-12», «молекула варианта IL-12», «вариант IL-27», «вариантный IL-27», «молекулы варианта IL-27», а также их грамматические вариации и все их формы во множественном числе 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. Разница в аминокислотной последовательности IL-12 или IL-27 может заключаться в добавлениях, делециях или заменах в альфа-, бета-субъединице или обеих субъединицах, так что идентичность или гомология последовательностей составляет 1-25%. Эти варианты форм включают модификации гликозилированных (дегликозилированных или агликозилированных) форм белка.

[0047] Термин «слитый белок» относится к комбинации или конъюгации двух или более белков или полипептидов, что приводит к новому расположению белков, которое обычно отсутствует в природе. Слитый белок является результатом ковалентного связывания двух или более белков или полипептидов. Два или более белков, составляющих слитый белок, могут располагаться в любой конфигурации от аминоконца («NH₂») к карбоксиконцу («COOH»). Так, например, карбоксиконец одного белка может быть ковалентно связан либо с карбоксиконцом, либо с аминоконцом другого белка. Примеры слитых белков могут включать объединение молекулы мономерного IL-10 или мономерной вариантной молекулы IL-10 с одним или более переменными доменами антитела (т. е. VH и/или VL) или одноцепочечного переменного фрагмента («scFv»).

[0048] Термин «гомолог», «гомология», «гомологичный» или «по существу гомологичный» относится к процентной идентичности между, по меньшей мере, двумя полинуклеотидными последовательностями или, по меньшей мере, двумя полипептидными последовательностями. Последовательности являются гомологичными 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 по определенной длине молекул.

[0049] Термин «идентичность последовательности» относится к точному соответствию нуклеотида к нуклеотиду или аминокислоты к аминокислоте. Идентичность последовательности может варьироваться от 100% идентичности последовательности до 50% идентичности последовательности. Процентную идентичность последовательности можно определить с использованием различных методов, включая, помимо прочего,

прямое сравнение информации о последовательности между двумя молекулами (референтная последовательность и последовательность с неизвестной процентной идентичностью по отношению к референтной последовательности) выравниванием последовательностей, подсчетом точного числа совпадений между двумя выровненными последовательностями, делением на длину референтной последовательности и умножением результата на 100. Для помощи в определении процентной идентичности можно использовать легкодоступные компьютерные программы.

[0050] Термины «субъект», «индивидуум» или «пациент» используются здесь взаимозаменяемо и относятся к позвоночному животному, предпочтительно к млекопитающему. Млекопитающие включают, не ограничиваясь этим, мышей, грызунов, обезьян, людей, сельскохозяйственных животных, спортивных животных и некоторых домашних животных.

[0051] Термин «введение» включает способы введения, которые позволяют активному ингредиенту по изобретению выполнять предназначенную ему функцию.

[0052] «Терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество», относящееся, например, к введению вариантов EBV IL-10, слитых белков, слитых белков на основе двух цитокинов или DK2¹⁰, DK7¹⁰, DK12¹⁰, DK15¹⁰, DK21¹⁰, DK27¹⁰ или DKIFNa¹⁰, описанных в настоящем документе, относится к количеству, достаточному для стимуляции определенных биологических активностей, в частности, в контексте комбинирования со сконструированными иммунными клетками, или АСТ, или ViTE, нацеленными на ТАА. Такие активности могут включать, например, подавление функции миелоидных клеток, повышение активности клеток Купфера и/или отсутствие какого-либо воздействия на CD8⁺ Т-клетки или повышение активности CD8⁺ Т-клеток, а также блокаду активации тучных клеток Fc-рецептора или предупреждение их дегрануляции, или для повышения или усиления эффектов комбинированной терапии (например, CAR-T-терапии или ViTE). Таким образом, «эффективное количество» должно лечить, облегчать или профилактировать симптом или признак заболевания. Эффективное количество также означает количество, достаточное для обеспечения или облегчения диагностики.

[0053] Термин «лечить» или «лечение» относится к способу снижения последствий заболевания или патологического состояния. Лечение также может относиться к способу уменьшения лежащей в основе причины самого заболевания или патологического состояния, а не только к симптомам. Лечение может представлять собой любое снижение по сравнению с естественными уровнями и может представлять собой, помимо прочего, полное устранение заболевания, патологического состояния или симптомов заболевания или патологического состояния.

[0054] Как здесь используется, термин «диакин» или «DK» относится к общему классу слитых белков на основе двух цитокинов, содержащих IL-10 (мономер IL-10), IL-12 или IL-27 или их варианты, слитые вместе с другим цитокином с доменом, нацеливающим на антиген, пролонгирующим период полувыведения. В частности, диакин

имеет форму формул I, II, IIIa, IIIb, IV.

[0055] Термин «DK2¹⁰» относится к диакину, который схематически представлен на фиг. 2, содержащий IL-10 или вариант IL-10 (например, SEQ ID NO: 10), IL-2 (например, SEQ ID NO: 9), который связан между VH- и VL-областями scFv, где диакин может быть нацеленным или ненацеленным. Из нацеленного DK2¹⁰ можно сделать нацеливающую молекулу с использованием scFv, который связывается со специфическим антигеном, таким как ТАА, или прививкой на каркас scFv CDR из антитела, нацеленного на ТАА. Такие молекулы будут обозначаться как DK2¹⁰ (название мишени). Например, DK2¹⁰, нацеленный на EGFR, будет обозначаться как «DK2¹⁰(egfr)» или «DK2¹⁰egfr». В одном варианте осуществления DK2¹⁰egfr представляет собой SEQ ID NO: 19. В другом примере DK2¹⁰, нацеленный на HER2, будет обозначаться как «DK2¹⁰(her2)» или «DK2¹⁰her2». В одном варианте осуществления DK2¹⁰her2 имеет SEQ ID NO: 21, 23 или 25.

[0056] Термин «DK7¹⁰» относится к диакину, который схематически представлен на фиг. 2, содержащий IL-7 или вариант IL-7 (такой как агликозилированная или дегликозилированная форма) и IL-10 и вариант IL-10 (например, SEQ ID NO: 10 или его агликозилированные или дегликозилированные формы), который связан между VH- и VL-областями scFv, где диакин может быть нацеленным или ненацеленным. Из нацеленного DK7¹⁰ можно сделать нацеливающую молекулу с использованием scFv, который связывается со специфическим антигеном, таким как ТАА, или прививкой на каркас scFv CDR из антитела, нацеленного на ТАА. Такие молекулы будут обозначаться как DK7¹⁰ (название мишени). Например, DK7¹⁰, нацеленный на EGFR, будет обозначаться как «DK7¹⁰(egfr)» или «DK7¹⁰egfr». В одном варианте осуществления DK7¹⁰egfr представляет собой SEQ ID NO: 36. В другом примере DK7¹⁰, нацеленный на: (a) HER2, будет обозначаться как «DK7¹⁰(her2)» или «DK12¹⁰her2»; и (b) CD20 будет обозначаться «DK7¹⁰(CD20)» или «DK12¹⁰CD20». В одном варианте осуществления DK7¹⁰her2 представляет собой SEQ ID NO: 37, и DK7¹⁰CD20 представляет собой SEQ ID NO: 38.

[0057] Термин «DK12¹⁰» относится к диакину, который схематически представлен на фиг. 3, содержащий IL-12 или вариант IL-12 (например, агликозилированную или дегликозилированную форму) и IL-10 и вариант IL-10 (например, SEQ ID NO: 10 или его агликозилированные или дегликозилированные формы), который связан между VH- и VL-областями scFv, где диакин может быть нацеленным или ненацеленным. Из нацеленного DK12¹⁰ можно сделать нацеливающую молекулу с использованием scFv, который связывается со специфическим антигеном, таким как ТАА, или прививкой на каркас scFv CDR из антитела, нацеленного на ТАА. Такие молекулы будут обозначаться как DK12¹⁰ (название мишени). Например, DK12¹⁰, нацеленный на EGFR, будет обозначаться как «DK12¹⁰(egfr)» или «DK12¹⁰egfr». В одном варианте осуществления DK12¹⁰egfr представляет собой SEQ ID NO: 26-32. В другом примере DK12¹⁰, нацеленный на: (a) HER2, будет обозначаться как «DK12¹⁰(her2)» или «DK12¹⁰her2»; и (b) CD20 будет обозначаться «DK12¹⁰(CD20)» или «DK12¹⁰CD20». В одном варианте осуществления

DK12¹⁰CD20 имеет SEQ ID NO: 34 или 35.

[0058] Термин «DK15¹⁰» относится к диакину, который схематически представлен на фиг. 2, содержащий IL-15 или вариант IL-15 (например, агликозилированную или дегликозилированную форму) и IL-10 и вариант IL-10 (например, SEQ ID NO: 10 или его агликозилированные или дегликозилированные формы), который связан между VH- и VL-областями scFv, где диакин может быть нацеленным или ненацеленным. Из нацеленного DK15¹⁰ можно сделать нацеливающую молекулу с использованием scFv, который связывается со специфическим антигеном, таким как ТАА, или прививкой на каркас scFv CDR из антитела, нацеленного на ТАА. Такие молекулы будут обозначаться как DK15¹⁰ (название мишени). Например, DK15¹⁰, нацеленный на EGFR, будет обозначаться как «DK15¹⁰(egfr)» или «DK15¹⁰egfr».

[0059] Термин «DK21¹⁰» относится к диакину, который схематически представлен на фиг. 2, содержащий IL-21 или вариант IL-21 (такой как агликозилированная или дегликозилированная форма) и IL-10 и вариант IL-10 (например, SEQ ID NO: 10 или его агликозилированные или дегликозилированные формы), который связан между VH- и VL-областями scFv, где диакин может быть нацеленным или ненацеленным. Из нацеленного DK21¹⁰ можно сделать нацеливающую молекулу с использованием scFv, который связывается со специфическим антигеном, таким как ТАА, или прививкой на каркас scFv CDR из антитела, нацеленного на ТАА. Такие молекулы будут обозначаться как DK21¹⁰ (название мишени). Например, DK21¹⁰, нацеленный на EGFR, будет обозначаться как «DK21¹⁰(egfr)» или «DK21¹⁰egfr».

[0060] Термин «DK27¹⁰» относится к диакину, который схематически представлен на фиг. 2, содержащий IL-27 или вариант IL-27 (например, агликозилированную или дегликозилированную форму) и IL-10 и вариант IL-10 (например, SEQ ID NO: 10 или его агликозилированные или дегликозилированные формы), который связан между VH- и VL-областями scFv, где диакин может быть нацеленным или ненацеленным. Из нацеленного DK27¹⁰ можно сделать нацеливающую молекулу с использованием scFv, который связывается со специфическим антигеном, таким как ТАА, или прививкой на каркас scFv CDR из антитела, нацеленного на ТАА. Такие молекулы будут обозначаться как DK27¹⁰ (название мишени). Например, DK27¹⁰, нацеленный на EGFR, будет обозначаться как «DK27¹⁰(egfr)» или «DK27¹⁰egfr».

[0061] Термин «DKIFNa¹⁰» относится к диакину, который схематически представлен на фиг. 2, содержащий IFN α или вариант IFN α (такой как агликозилированная или дегликозилированная форма) и IL-10 и вариант IL-10 (например, SEQ ID NO: 10 или его агликозилированные или дегликозилированные формы), который связан между VH- и VL-областями scFv, где диакин может быть нацеленным или ненацеленным. Из нацеленного DKIFNa¹⁰ можно сделать нацеливающую молекулу с использованием scFv, который связывается со специфическим антигеном, таким как ТАА, или прививкой на каркас scFv CDR из антитела, нацеленного на ТАА. Такие молекулы будут обозначаться как DKIFNa¹⁰ (название мишени). Например, DKIFNa¹⁰, нацеленный

на EGFR, будет обозначаться как «DKIFNa¹⁰(egfr)» или «DKIFNa¹⁰egfr».

[0062] Термин «DK12^{IFNa}» относится к диакину, который схематически представлен на фиг. 2, содержащий IFN α или вариант IFN α (например, агликозилированная или дегликозилированная форма) и IL-12 и вариант IL-12 (например, его агликозилированные или дегликозилированные формы), который связан между VH- и VL-областями scFv, где диакин может быть нацеленным или ненацеленным. Из нацеленного DK12^{IFNa} можно сделать нацеливающую молекулу с использованием scFv, который связывается со специфическим антигеном, таким как ТАА, или прививкой на каркас scFv CDR из антитела, нацеленного на ТАА. Такие молекулы будут обозначаться как DK12^{IFNa} (название мишени). Например, DK12^{IFNa}, нацеленный на EGFR, будет обозначаться как «DK12^{IFNa}(egfr)» или «DK12^{IFNa}egfr».

[0063] Как здесь используется, термин «опухоль» относится ко всем клеткам с неопластическим ростом и пролиферацией, как злокачественным, так и доброкачественным, а также ко всем предзлокачественным и злокачественным клеткам и тканям. Термины «рак», «раковый», «клеточно-пролиферативное расстройство», «пролиферативное расстройство» и «опухоль» не являются взаимоисключающими, как упоминается в настоящем документе.

[0064] Опухоль может быть доброкачественной или злокачественной. Доброкачественная опухоль характеризуется отсутствием метастазов. Злокачественная клетка представляет собой раковую клетку и может метастазировать. Опухоли, на которых могут быть применены способы по настоящему изобретению, включают, помимо прочего, аденому, ангиосаркому, астроцитому, эпителиальную карциному, герминому, глиобластому, глиому, гамартому, гемангиоэндотелиому, гемангиосаркому, гематому, гепатобластому, лейкоз, лимфому, медуллобластому, меланому, нейробластому, остеосаркому, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому и тератому. Опухоль может быть выбрана из акральной лентигозной меланомы, актинического кератоза, аденокарциномы, аденокистозной карциномы, аденомы, аденосаркомы, аденосквamousной карциномы, астроцитарных опухолей, карциномы бартолиновой железы, базальноклеточной карциномы, карциномы бронхиальных желез, капиллярной опухоли, карциноидов, карциносаркомы, кавернозной опухоли, холангиокарциномы, хондосаркомы, папилломы/карциномы хориодного сплетения, светлоклеточной карциномы, цистаденомы, опухоли эндодермального синуса, гиперплазии эндометрия, стромальной саркомы эндометрия, эндометриоидной аденокарциномы, эпендимальной опухоли, эпителиоидной опухоли, саркомы Юинга, фиброламмеллярной карциномы, фокальной узловой гиперплазии, гастриномы, герминомы, глиобластомы, глюкоганомы, гемангибластомы, гемангиоэндотелиомы, гемангиомы, аденомы печени, аденоматоза печени, гепатоцеллюлярной карциномы, инсулиномы, интраэпителиальной неоплазии, интерэпителиальной плоскоклеточной неоплазии, инвазивной плоскоклеточной карциномы, крупноклеточной карциномы, лейомиосаркомы, лентиго-меланомы, злокачественной меланомы, злокачественной мезотелиальной опухоли, медуллобластомы,

медуллоэпителиомы, меланомы, менингиомы, мезотелиомы, метастатической карциномы, мукоэпидермоидной карциномы, нейробластомы, нейроэпителиальной аденокарциномы, узловой меланомы, овсяноклеточной карциномы, олигодендроглиальной опухоли, саркомы поджелудочной железы, папиллярной серозной аденокарциномы, опухоли шишковидной железы, опухолей гипофиза, плазмоцитомы, псевдосаркомы, легочной бластомы, почечно-клеточного рака, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, саркомы, серозной карциномы, мелкоклеточной карциномы, карциномы мягких тканей, соматостатин-секретирующей опухоли, плоскоклеточного рака, субмезотелиальной опухоли, поверхностно-распространяющейся меланомы, недифференцированной карциномы, увеальной меланомы, бородавчатой карциномы, виомы, высокодифференцированной карциномы и опухоли Вильмса.

[0065] Термины «рак» и «раковый» относятся или описывают физиологическое состояние млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом/пролиферацией клеток. Примеры рака включают, помимо прочего, карциному, лимфому (например, лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому), бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких видов рака включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легких, плоскоклеточный рак легких, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак органов желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстого кишечника, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, лейкоз и другие лимфопролиферативные заболевания, а также различные виды опухоли головы и шеи.

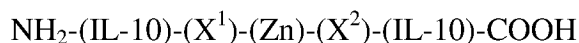
Структура слитых белков на основе двух цитокинов

[0066] Настоящее изобретение относится к применению диакина, который ранее был описан в заявке на патент США 17/199239 (поданной 11 марта 2021 г. и включенной во всей своей полноте посредством ссылки), для повышения или усиления функции известных иммунотерапевтических средств, таких как сконструированные иммунные клетки и ViTE, нацеленные на ТАА. Вкратце, диакин, используемый в способе по настоящему изобретению, который представляет собой усовершенствование варианта осуществления слитого белка IL-10, ранее описанного в патентах США № 10858412 и 10975133 (включенных в полном объеме посредством ссылки), содержит два мономера IL-10 или варианты молекулы IL-10 и молекулу второго цитокина, связанную в шарнирной области scFv. Диакин создан на основе слитой молекулы IL-10 первого поколения (фиг. 1), которая описана в патентах США № 10858412 и 10975133. Вкратце, слитый белок IL-10 первого поколения сконструирован на каркасе VH и VL scFv, содержащем два мономера IL-10 на каждом конце (т.е. первый мономер IL-10 на аминоконце и второй мономер IL-10 на карбоксиконце). Каркасная система содержит scFv, который был получен из человеческого моноклонального антитела против вируса Эбола с 6

определяющими комплементарность участками («CDR»), имеющими CDR 1-3 в VH и CDR 1-3 в VL. VH- и VL-области способны нацеливать слитый белок IL-10 на специфический антиген, что достигается посредством замены 6 CDR-участков пары VH и VL (3 CDR в VH и 3 CDR в VL) на 6 CDR-участков из VH и VL рецептора или антитела, нацеленного на антиген, или его антигенсвязывающего фрагмента. Способность заменять и оптимизировать 6 CDR и каркасные области scFv, и прививать CDR на каркас scFv, описанный в настоящем документе, хорошо известна и практикуется специалистами в данной области.

[0067] В первом аспекте настоящая заявка относится к слитому белку на основе двух цитокинов, названному диакином, содержащему IL-10 или вариант IL-10 и, по меньшей мере, один другой цитокин, где слитый белок на основе двух цитокинов имеет комбинированную или синергическую функциональность по сравнению со слитым белком IL-10, ранее описанным в патенте США № 10858412. На фиг. 2 приведено репрезентативное представление диакина, содержащего IL-10. В частности, в диакине используется каркасная система, состоящая из scFv, который содержит VH и VL, посредством чего два мономера IL-10 терминируют слитый белок на основе двух цитокинов на amino- и карбоксиконцах. Второй цитокин конъюгирован с мономерами IL-10 (или вариантами IL-10) посредством слияния между VH- и VL-областями scFv, которые представляют собой шарнирную область scFv. Диакин способен образовывать функциональный белковый комплекс, посредством чего мономеры IL-10 (или варианты IL-10) гомодимеризуются в функциональную молекулу IL-10, и VH- и VL-области образуют пару, которая связывается вместе с образованием комплекса scFv, который обеспечивает связывание и распознавание антигена.

[0068] В некоторых аспектах диакин или слитый белок на основе двух цитокинов, содержащий IL-10, представляет собой структуру, имеющую формулу I:



где:

«IL-10» представляет собой мономер IL-10, где IL-10 представляет собой IL-10 человека, мыши, CMV или EBV, или его вариант, более предпочтительно IL-10 представляет собой мономер, содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 7, 9 или 10,

«X¹» представляет собой VL- или VH-область, полученную из первого моноклонального антитела; «X²» представляет собой VL- или VH-область, полученную из первого моноклонального антитела; где, когда X¹ представляет собой VL, то X² представляет собой VH или когда X¹ представляет собой VH, то X² представляет собой VL, предпочтительно, где VL- или VH-области представляют собой scFv, полученный из человеческого антитела против вируса Эбола, и на VL- или VH-области привиты 6 CDR (3 из VH и 3 из VL) второго антитела;

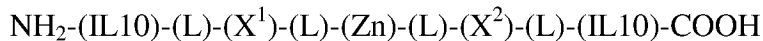
«Z» представляет собой любой цитокин, иной чем IL-10, предпочтительно IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-

CSF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β или TNF- α , TNF- β , основной FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11 или IL-13; и

«n» представляет собой целое число, выбранное из 1-2

В одном предпочтительном варианте осуществления IL-10 представляет собой высокоаффинный вариант, названный DV07, который содержит замены в аминокислотных положениях 31 и 75 SEQ ID NO: 10. В другом варианте осуществления VL- или VH-области представляют собой scFv, полученный из любого моноклонального антитела, которое способно связываться с ТАА, обнаруженным на поверхности солидной или гематологической опухоли. В еще одном аспекте scFv получен из антитела, направленного к VEGFR2. В одном аспекте scFv получают из человеческого моноклонального антитела против вируса Эбола, где 6 CDR (3 в VH и 3 в VL) антитела против вируса Эбола необязательно заменены 6 CDR из любого моноклонального антитела, которое способно связываться с ТАА. В еще одном аспекте scFv содержит каркасные VL- или VH-области человеческого моноклонального антитела против вируса Эбола, на которое привиты CDR, обладающие специфичностью к ТАА, ассоциированному с солидными или гематологическими опухолями. В одном аспекте на VL- или VH-области scFv привиты 6 CDR (3 из VH и 3 из VL) из анти-VEGFR2 антитела. В еще одном предпочтительном варианте осуществления второй цитокин представляет собой IL-2, более предпочтительно SEQ ID NO: 9.

[0069] В еще одном аспекте диакин или слитый белок на основе двух цитокинов, содержащий IL-10, представляет собой структуру, имеющую формулу II:



где:

«IL-10» представляет собой мономер IL-10, такой как, не ограничиваясь этим, IL-10 человека, мыши, CMV, EBV или их варианты;

«L» представляет собой линкер, предпочтительно линкер с SEQ ID NO: 39, 40 или 41;

«X¹» представляет собой VL- или VH-область, полученную из первого моноклонального антитела;

«X²» представляет собой VL- или VH-область, полученную из первого моноклонального антитела;

где, когда X¹ представляет собой VL, то X² представляет собой VH, или когда X¹ представляет собой VH, то X² представляет собой VL, и X¹ и X² вместе представляют собой scFv;

«Z» представляет собой второй цитокин, где второй цитокин представляет собой цитокин, иной чем IL-10; и

«n» представляет собой целое число, выбранное из 1-2.

В одном предпочтительном аспекте IL-10 представляет собой высокоаффинный вариант, названный DV07, который содержит замены в аминокислотных положениях 31 и 75 SEQ ID NO: 10. В еще одном варианте осуществления VL- или VH-области

представляют собой scFv, полученный из любого моноклонального антитела, которое способно связываться с ТАА, обнаруженным на поверхности солидной или гематологической опухоли. В еще одном аспекте scFv получают из антитела, направленного к VEGFR2. В одном аспекте scFv получен из человеческого моноклонального антитела против вируса Эбола, где 6 CDR (3 в VH и 3 в VL) антитела против вируса Эбола необязательно заменены на 6 CDR из любого моноклонального антитела, способного связываться с ТАА. В еще одном аспекте scFv содержит каркасные VL- или VH-области человеческого моноклонального антитела против вируса Эбола, на которые были привиты CDR, обладающие специфичностью к ТАА, ассоциированному с солидными или гематологическими опухолями. В одном аспекте на VL- или VH-области scFv привиты 6 CDR (3 из VH и 3 из VL) анти-VEGFR2 антитела. В еще одном предпочтительном варианте осуществления второй цитокин представляет собой IL-2, более предпочтительно SEQ ID NO: 9.

[0070] В одном варианте осуществления мономер IL-10 включает любую форму IL-10, включая человеческую (SEQ ID NO: 1), CMV (SEQ ID NO: 5), EBV (SEQ ID NO: 3) или мышиную (SEQ ID NO: 7). В еще одном варианте осуществления мономер IL-10 представляет собой модифицированную или вариантную форму IL-10 EBV (SEQ ID NO: 3), включая формы, описанные в патенте США № 10858412. В предпочтительном варианте EBV IL-10 содержит две замены в SEQ ID NO: 3 в аминокислотных положениях 31 и 75 («DV07»). В еще одном варианте осуществления мономер IL-10 представляет собой последовательность SEQ ID NO: 1, 3, 7 или 10. Каждый из первого и второго мономеров молекулы IL-10 или варианта IL-10 располагается на терминальных концах слитого белка (т.е. первый мономер на аминоконце и второй мономер на карбоксиконце), как представлено на фиг. 2.

[0071] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу применения диакина IL-12 формулы (III) в комбинации со сконструированными иммунными клетками и ViTE, нацеленными на ТАА.

[0072] $\text{NH}_2\text{-(R}^1\text{)-(X}^1\text{)-(Zn)-(X}^2\text{)-(R}^2\text{)-COOH}$ (формула IIIa);

[0073] $\text{NH}_2\text{-(R}^2\text{)-(X}^1\text{)-(Zn)-(X}^2\text{)-(R}^1\text{)-COOH}$ (формула IIIb);

где:

«R¹» представляет собой альфа-субъединицу любого мультисубъединичного первого цитокина, предпочтительно либо альфа-субъединицу IL-12 (p35), либо альфа-субъединицу IL-27 (p28), более предпочтительно субъединицу с SEQ ID NO: 45 или 47;

«R²» представляет собой бета-субъединицу любого мультисубъединичного первого цитокина, предпочтительно либо бета-субъединицу IL-12 (p40), либо бета-субъединицу IL-27 (EBI3), более предпочтительно субъединицу с SEQ ID NO: 46 или 48;

где R¹ представляет собой альфа-субъединицу первого цитокина, R² представляет собой бета-субъединицу первого цитокина; или когда R¹ представляет собой p35, то R² представляет собой p40; или когда R¹ представляет собой p28, то R² представляет собой EBI3; или когда R¹ представляет собой SEQ ID NO: 45 или 47, то R² представляет собой

SEQ ID NO: 46 или 48; или когда R^1 представляет собой SEQ ID NO: 46 или 48, то R^2 представляет собой SEQ ID NO: 45 или 47;

« X^1 » представляет собой VL- или VH-область, полученную из первого моноклонального антитела; « X^2 » представляет собой VL- или VH-область, полученную из первого моноклонального антитела; где, когда X^1 представляет собой VL, то X^2 представляет собой VH или когда X^1 представляет собой VH, то X^2 представляет собой VL;

«Z» представляет собой любой цитокин, который усиливает биологическую функцию мультисубъединичного цитокина, предпочтительно $IFN\alpha$ -2a, IL-28, IL-29, и

«n» представляет собой целое число, выбранное из 1-2,

где первое моноклональное антитело представляет собой антитело против вируса Эбола, на которое привиты CDR из второго антитела со специфичностью к VEGFR2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD44, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, IL-22R1, BCMA, CLL01, CD5, CD147, ILMP-1, SLAMF7, NY-ESO-1, TACI, CS-1, CXCR4, NKG2D, B7-H3, EGFR, PD-1, PDL-1, HER2, HER3, EpCAM, PSCA, MUC1, Lewis-Y, GPC3, AXL, клаудину.2, GD2, CTLA-4, CEA, PDGFR, MESO, PSCA, PSMA, BCMA или PSA.

[0074] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу применения диакина, содержащего два мультисубъединичных цитокина, таких как IL12, IL-27 или IL-10 формулы (IV) в комбинации со сконструированными иммунными клетками и ViTE, нацеленными на TAA, где указанный диакин имеет формулу (IV):

$NH_2-(R^1)-(L_a)-(X^1)-(L_a)-(W^1)-(L_b)-(W^2)-(L_a)-(X^2)-(L_a)-(R^2)-COOH$ (формула IV);

где:

« R^1 » представляет собой альфа-субъединицу первого цитокина, такого как IL-12 или IL-27, или первый мономер гомодимерного цитокина, такого как IL-10, где R^1 предпочтительно представляет собой p40;

« R^2 » представляет собой бета-альфа-субъединицу первого цитокина, такого как IL-12 или IL-27, или второй мономер гомодимерного цитокина, такого как IL-10, где R^2 предпочтительно представляет собой p35;

« L_a » представляет собой любой линкер; предпочтительно с SEQ ID NO: 43 или 44;

« L_b » представляет собой любой линкер; предпочтительно с SEQ ID No: GGGSGGG или SEQ ID NO: 42;

X^1 » представляет собой VL- или VH-область, полученную из первого моноклонального антитела; « X^2 » представляет собой VL- или VH-область, полученную из первого моноклонального антитела; где, когда X^1 представляет собой VL, то X^2 представляет собой VH, или когда X^1 представляет собой VH, то X^2 представляет собой VL;

« W^1 » 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-альфа-субъединицу первого цитокина, такого как IL-12 или IL-27, или второй мономер гомодимерного цитокина, такого как IL-10, предпочтительно второй мономер IL-10,

где на первое моноклональное антитело привиты CDR из антитела со специфичностью к VEGFR2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD44, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, IL-22R1, BCMA, CLL01, CD5, CD147, ILMP-1, SLAMF7, NY-ESO-1, TACI, CS-1, CXCR4, NKG2D, B7-H3, EGFR, PD-1, PDL-1, HER2, HER3, EpCAM, PSCA, MUC1, Lewis-Y, GPC3, AXL, клаудину18.2, GD2, CTLA-4, CEA, PDGFR, MESO, PSCA, PSMA, BCMA или PSA.

[0075] VL- или VH-области происходят из антитела, фрагмента антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Антигенсвязывающий фрагмент включает, не ограничиваясь этим, scFv, Fab, F(ab')₂, V-NAR, диатело или нанотело. Предпочтительно VH и VL происходят из одноцепочечного варибельного фрагмента («scFv»). В одном аспекте scFv получен из человеческого моноклонального антитела против вируса Эбола. В другом аспекте scFv содержит каркасную область антитела против вируса Эбола и 6 CDR (3 VH и 3 VL) моноклонального антитела, специфичного к любому ТАА, который экспрессируется на поверхности солидной или гематологической опухоли. Антитело scFv или привитые CDR получены из моноклонального антитела, выбранного из антитела, специфичного к VEGFR2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD44, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, IL-22R1, BCMA, CLL01, CD5, CD147, ILMP-1, SLAMF7, NY-ESO-1, TACI, CS-1, CXCR4, NKG2D, B7-H3, EGFR, PD-1, PDL-1, HER2, HER3, EpCAM, PSCA, MUC1, Lewis-Y, GPC3, AXL, клаудину18.2, GD2, CTLA-4, CEA, PDGFR, MESO, PSCA, PSMA, BCMA или PSA, или его мультитаргетных форм.

[0076] В еще одном аспекте диакин, содержащий IL-10, IL-12 или IL-27, включает пару VH и VL из одного антитела. Пара VH и VL функционирует в качестве каркаса, к которому могут быть присоединены мономеры IL-10 или его варианты, так что мономеры IL-10 или его варианты могут гомодимеризоваться в функционирующую молекулу IL-10. Следовательно, для специалистов в данной области техники должно быть понятно, что каркас VH и VL, используемый в слитом белке, может быть выбран на основе требуемых физических свойств, необходимых для правильной гомодимеризации мономеров IL-10 или вариантов мономера IL-10 и/или необходимости поддерживать нацеливающую способность VH и VL. Аналогичным образом, специалистам в данной области 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 с получением 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 привиты на каркасную систему, содержащую SEQ ID NO: 12 или 15. Каркасная система, показанная в SEQ ID NO: 12 или 15, если ее получат в виде диакина, также будет включать второй цитокин, связанный

внутри шарнирной области участков VH и VL молекулы. Также полагается, что если слитый белок на основе двух цитокинов не предназначен для нацеливания на какой-либо конкретный антиген, то пара VH и VL может быть выбрана в качестве каркаса, который не нацелен на какой-либо конкретный антиген (или представляет собой антиген с низким распространением *in vivo*), например, пара VH и VL из антитела против ВИЧ и/или против вируса Эбола. Таким образом, в одном варианте осуществления слитый белок IL-10 по настоящему изобретению может включать пару VH и VL из человеческого антитела против вируса Эбола, более предпочтительно последовательность VH и VL, показанную в SEQ ID NO: 12 или 15. Слитый белок может содержать ряд из 1-4 переменных областей. В еще одном варианте осуществления переменные области могут происходить из одного и того же антитела или, по меньшей мере, из двух разных антител.

[0077] В еще одном аспекте целевая специфичность переменных цепей антитела или пары VH и VL или 6 CDR пары VH и VL может включать, помимо прочего, такие, которые нацелены на белки, клеточные рецепторы и/или опухлеассоциированные антигены. В другом варианте осуществления CDR-участки из любой пары VH и VL могут быть привиты на каркасную систему, описанную выше, где такой каркас предпочтительно включает систему, называемую Debo (схематически представленную на фиг. 1), посредством чего мономеры IL-10 связаны с scFv, содержащим VL- или VH-области человеческого антитела против Эболы, и второй цитокин связан с шарнирной областью scFv (схематически представленную на фиг. 2). Более предпочтительно прививка на каркасную систему Debo происходит в каркасе, содержащем последовательность SEQ ID NO: 12 или 15. В еще одном варианте осуществления переменные области или пара VH и VL, или 6 CDR пары VH и VL получены из антитела, нацеленного на антигены, ассоциированные с различными заболеваниями (например, раком) или такие, которые обычно не обнаруживаются или редко обнаруживаются в сыворотке здорового субъекта, например переменные области антител нацелены на EGFR, PDGFR, VEGFR1, VEGFR2, Her2Neu, FGFR, GPC3 или другие антигены, ассоциированные с опухолью, MAdCAM, ICAM, VCAM, CD14 или другие белки клеточной поверхности, ассоциированные с воспалением, ВИЧ и/или Эбола. Таким образом, в одном варианте осуществления переменные области получены или происходят из анти-EGFR, анти-MAdCAM, анти-ВИЧ (Chan et al., J. Virol, 2018, 92(18):e006411-19), анти-ICAM, анти-VCAM, анти-CD14 или антитела против вируса Эбола (опубликованная заявка на патент США 2018/0180614, в полном объеме включенная посредством ссылки, в частности, моноклональные антитела, приведенные в таблицах 2, 3 и 4). В еще одном варианте осуществления переменные области получены или происходят из антител, способных повышать концентрацию цитокинов, таких как IL-10 и IL-2, в конкретной целевой области, чтобы дать возможность IL-10 и IL-2 индуцировать биологический эффект. Такие антитела могут включать антитела, которые нацелены на сверхэкспрессированные или положительно регулированные рецепторы или антигены в определенных пораженных участках, или те, которые специфически экспрессируются в определенных пораженных

участках. Например, вариабельные области могут быть получены из антител, специфичных к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR); CD52; CD14; различным мишеням иммунных контрольных точек, таких как, не ограничиваясь этим, 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; рецепторной ловушке TGF β ; MAdCAM, субъединице интегрин β 7; α 4 β 7 интегрину; α 4 интегрину SR-A1; 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 и SR-J1, и это лишь некоторые из них. Другие вариабельные области могут включать такие, которые получены из антител, специфичных к CD3, CD4, CD5, CD7, CD19, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, антигену созревания В-клеток (BCMA), лектиноподобной молекуле-1 С-типа (CLL01), CD5, CD147, латентному мембранному белку 1 (LMP-1), сигнальной молекуле активации лимфоцитов F7 (SLAMF7), NY-ESO-1, трансмембранному активатору и интерактору CAML (TACI), CS-1, CXCR4, NKG2D, B7-H3, EGFR, PD-1, PDL-1, HER2, HER3, EpCAM, PSCA, MUC1, Lewis-Y, GPC3, AXL, клаудину18.2, GD2, CTLA-4, CEA, PDGFR, мезотелину (MESO), PSCA, PSMA, BCMA или PSA. Мономер IL-10 (например, человека, CMV или EBV) или вариант молекулы IL-10 (описанный в настоящем документе) конъюгирован либо с аминоконцом, либо с карбоксиконцом вариабельной области (VH или VL), так что мономер IL-10 или вариант молекулы IL-10 способны димеризоваться друг с другом. В предпочтительном варианте мономеры IL-10 (или вариант IL-10) слиты с парой VH и VL в соответствии с формулой I или II, где мономер IL-10 представляет собой форму IL-10: EBV IL-10, DV05, DV06 или DV07.

[0078] Диакин, слитый белок на основе двух цитокинов или комплекс слитых белков на основе двух цитокинов также могут обладать антиген-нацеливающей функцией. Диакин или слитый белок на основе двух цитокинов или комплекс слитого белка на основе двух цитокинов будет содержать пару VH и VL, которая способна связываться вместе с образованием антигенсвязывающего сайта или ABS. В некоторых конфигурациях мономеры IL-10 или варианты мономеров IL-10 будут ковалентно связаны с концом, содержащим антигенсвязывающий сайт. Вариабельные области могут быть дополнительно модифицированы (например, посредством добавления, удаления или замены) изменением одной или более аминокислот, которые снижают антигенность у субъекта. Другие модификации вариабельной области могут включать замены, делеции или добавления аминокислот, которые находятся за пределами 6 CDR-участков VH- и VL-областей и служат для повышения стабильности и экспрессии VH- и VL-областей scFv. Например, модификации могут включать модификации, где CDR-участки получены из VH- и VL-областей анти-EGFR или анти-VEGFR1, или анти-VEGFR2 антитела, и области вне CDR оптимизированы для стабилизации scFv и/или оптимизированы для повышения экспрессии, что можно использовать в качестве основы для связывания второго цитокина между VH- и VL-областями scFv. Для иллюстрации того, что эти типы модификаций

находятся в компетенции специалистов в данной области, аналогичные модификации CDR-участков и областей за пределами CDR были сделаны в молекуле в форме DK2¹⁰, содержащей DV07 и нацеленную на HER2 человека (т.е. DK2¹⁰her2), такую как в последовательности, показанные в SEQ ID NO: 52-54 или 55, более предпочтительно SEQ ID NO: 21 (вариант 4) или 23 (вариант 5). Такие и другие модификации также могут быть внесены в молекулу в форме DK2¹⁰, содержащую DV07 и нацеленную на человеческий VEGFR1 или VEGFR2A, и специалисты в данной области техники могут определить другие модификации, которые стабилизируют scFv и/или оптимизируют последовательность для целей экспрессии.

[0079] Пара VH и VL образуют каркас, на который можно привить или трансплантировать CDR-участки, полученные для множества антител. Такие CDR-участки антитела включают те антитела, которые известны и описаны выше. CDR-участки в вышеописанных каркасах VH и VL будут включать следующее количество аминокислотных положений, доступных для прививки/вставки CDR:

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

В предпочтительном варианте осуществления слитый белок на основе двух цитокинов, содержащий IL-10, будет включать ранее описанный каркасный слитый белок IL-10, где пара VH и VL получена из антитела против вируса Эбола (последовательность которого показана в SEQ ID NO: 19), при этом 6 CDR-участков из антитела против вируса Эбола удаляются и прививаются на пару VH и VL специфического нацеливающего антитела, такого как, не ограничиваясь этим, антитело к EGFR; CD52; CD14; различным мишеням иммунных контрольных точек, таким как, помимо прочего, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD19, CD20; CD22, CD47; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpcAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, CD14, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; рецепторной ловушке TGF β ; MAdCam, β 7 субъединице интегрина; α 4 β 7 интегрину; α 4 интегрину 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 и SR-J1. В одном варианте осуществления 6 CDR-участков антитела против вируса Эбола замещены 6 CDR-участками из анти-EGFR, анти-MAdCAM, анти-VEGFR1, анти-VEGFR2, анти-PDGFR или анти-CD14, анти-CD19, анти-CD20, анти-CD22 антитела, более предпочтительно анти-VEGFR2 антитела.

[0080] В еще одном аспекте второй цитокин слит между VH и VL scFv, как показано на фиг. 2. Второй цитокин конъюгирован, слит или связан между VH- и VL-областями scFv таким образом, что второй цитокин сохраняет свои функциональные свойства. В одном варианте осуществления второй цитокин отличается от мономера IL-

10. В еще одном варианте осуществления вторым цитокином является ИЛ-10. В еще одном варианте осуществления второй цитокин представляет собой ИЛ-6, ИЛ-4, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-5, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-15, ИЛ-17, ИЛ-21, ИЛ-26, ИЛ-27, ИЛ-28a, ИЛ28b, ИЛ-29, TSLP, GM-CSF, G-CSF, интерфероны- α , - β , - γ , TGF- β или факторы некроза опухолей - α , - β , основной FGF, EGF, PDGF, ИЛ-4, ИЛ-11 или ИЛ-13, или их варианты или мутеины, такие как, не ограничиваясь этим, варианты с высокой, средней и низкой аффинностью к рецептору. В предпочтительном варианте второй цитокин в диакине, содержащем ИЛ-10, представляет собой ИЛ-2. В более предпочтительном варианте осуществления диакин или слитый белок на основе двух цитокинов находится в форме DK2¹⁰, где мономером ИЛ-10 является DV07; вариантная молекула ИЛ-10 связана с каркасной системой, содержащей каркасные VH- и VL-области человеческого антитела против вируса Эбола (т.е. Debo), и дополнительно включает прививку CDR, полученных из антитела, выбранного из анти-EGFR, анти-HER2, анти-CD14, анти-VEGFR1, анти-VEGFR2, анти-MAdCAM или анти-PDGFR, анти-Cd19, анти-Cd20, анти-CD22, анти-CD3, анти-CD4, анти-CD5, анти-CD7, анти-CD25, анти-CD30, анти-CD33, анти-CD34, анти-CD38, анти-CD40, анти-CD52, анти-CD56, анти-CD70, анти-CD79B, анти-CD117, анти-CD123, анти-CD138, анти-CD147, антитела против антигена созревания В-клеток (BCMA), лектиноподобной молекулы-1 С-типа (CLL01), анти-CD5, анти-CD147, антитела против латентного мембранного белка 1 (LMP-1), сигнальной молекулы активации лимфоцитов F7 (SLAMF7), анти-NY-ESO-1, трансмембранного активатора и интерактора CAML (TACI), анти-CS-1, анти-CXCR4, анти-NKG2D, анти-B7-H3, анти-PD-1, анти-PDL-1, анти-HER3, анти-EpCAM, анти-мезотелина, анти-PSCA, анти-MUC1, анти-Lewis-Y, анти-GPC3, анти-AXL, анти-клаудина18.2, анти-GD2, анти-CTLA-4, анти-CEA, анти-мезотелина (MESO), анти-PSCA или анти-PSA, и второй цитокин, выбранный из IFN α , ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21, ИЛ-28, ИЛ-29 или их варианты с высокой, средней или низкой аффинностью, которые связаны в шарнирной области пары VH и VL. В наиболее предпочтительном варианте осуществления диакин или слитый белок на основе двух цитокинов представляет собой слитый белок в форме DK2¹⁰, содержащий DV07 и привитые на него 6 CDR из анти-VEGFR2 антитела.

[0081] В еще одном аспекте диакин представляет собой комбинацию первого цитокина (или его вариантов с высокой аффинностью), второго цитокина (или его вариантов с высокой аффинностью) и нацеливающего scFv (или CDR, полученных из моноклональных антител и привитых на каркасную область, полученную из антитела против вируса Эбола), как показано в таблице 1 ниже:

Таблица 1

1 цитокин	2 цитокин	Антитела, scFv или CDR, полученные из антител, специфичных к:
IL10	IL2	VEGFR2
IL10	IL2	Ebola
IL10	IFN α , IL2, IL7, IL15,	CD19

	IL21, IL28, IL29	CD20 CD22
IL10	IFN α , IL2, IL7, IL15, IL21, IL28, IL29	PDGFR
IL10	IFN α , IL2, IL7, IL15, IL21, IL28, IL29	CD3, CD4, CD5, CD7, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, антигену созревания В- клеток (BCMA), лектиноподобной молекуле С- типа (CLL01), CD5, CD147, латентному мембранному белку 1 (LMP-1), сигнальной молекуле активации лимфоцитов F7 (SLAMF7), NY-ESO-1, трансмембранному активатору и интерактору CAML (TACI), CS-1, CXCR4, NKG2D, B7-H3, EGFR, PD-1, PDL-1, HER2, HER3, EpCAM, mesothelin, PSCA, MUC1, Lewis-Y, GPC3, AXL, клаудину18.2, GD2, CTLA-4, CEA, мезотелину (MESO), PSCA или PSA
IL12	IL-10, IL-28, IL-29, IFN α	VEGFR2, вирусу Эбола, CD19, CD20, CD22, PDGFR, CD3, CD4, CD5, CD7, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, антигену созревания В-клеток (BCMA), лектиноподобной молекуле С-типа (CLL01), CD5, CD147, латентному мембранному белку 1 (LMP-1), сигнальной молекуле активации лимфоцитов F7 (SLAMF7), NY-ESO-1, трансмембранному активатору и интерактору CAML (TACI), CS-1, CXCR4, NKG2D, B7-H3, EGFR, PD-1, PDL-1, HER2, HER3, EpCAM, mesothelin, PSCA, MUC1, Lewis-Y, GPC3, AXL, клаудину18.2, GD2, CTLA-4, CEA, мезотелину (MESO), PSCA или PSA
IL-27	IL-10, IL-28, IL-29, IFN α	VEGFR2, вирусу Эбола, CD19, CD20, CD22, PDGFR, CD3, CD4, CD5, CD7, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, BCMA, CLL01,

		CD5, CD147, LMP-1, SLAMF7, NY-ESO-1, TACI, CS-1, CXCR4, NKG2D, B7-H3, EGFR, PD-1, PDL-1, HER2, HER3, EpCAM, мезотелину, PSCA, MUC1, Lewis-Y, GPC3, AXL, клаудину18.2, GD2, CTLA-4, CEA, мезотелину (MESO), PSCA или PSA
--	--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

[0082] В еще одних аспектах возможный диакин или способ применения комбинации, по меньшей мере, одного из диакинов и комбинаций сконструированных иммунных клеток АСТ или ВiTE, нацеленных на ТАА, включают одно из следующего, приведенного в таблицах 2а-2е).

Таблица 2а

Первый цитокин	scFv	Второй цитокин
hIL10 (SEQ ID NO: 1)	CD19	IL-2 (SEQ ID NO: 9)
	CD20	
	CD22	
	CD3	
	CD38	
	CD44	
	BCMA	
	HER3	
	PSCA	
	PSMA	
	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
	CD70	
	CD33	
CXCR4		
CEA		
DV07 (SEQ ID NO: 3)	CD19	
	CD20	
	CD22	
	CD3	
	CD38	
	CD44	
	BCMA	

	HER3	
	PSCA	
	PSMA	
	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
	CD70	
	CD33	
	CXCR4	
	CEA	

Таблица 2b

Первый цитокин	scFv	Второй цитокин
hIL10 (SEQ ID NO: 1)	CD19	IL-7 (SEQ ID NO: 50)
	CD20	
	CD22	
	CD3	
	CD38	
	CD44	
	BCMA	
	HER3	
	PSCA	
	PSMA	
	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
	CD70	
CD33		
CXCR4		
CEA		
DV07 (SEQ ID NO: 3)	CD19	
	CD20	
	CD22	
	CD3	
	CD38	

	CD44	
	BCMA	
	HER3	
	PSCA	
	PSMA	
	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
	CD70	
	CD33	
	CXCR4	
	CEA	

Таблица 2с

Первый цитокин	scFv	Второй цитокин
hIL10 (SEQ ID NO: 1)	CD19	IL-15 (SEQ ID NO: 51)
	CD20	
	CD22	
	CD3	
	CD38	
	CD44	
	BCMA	
	HER3	
	PSCA	
	PSMA	
	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
	CD70	
	CD33	
DV07 (SEQ ID NO: 3)	CXCR4	
	CEA	
	CD19	
	CD20	
	CD22	

	CD3	
	CD38	
	CD44	
	BCMA	
	HER3	
	PSCA	
	PSMA	
	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
	CD70	
	CD33	
	CXCR4	
	CEA	

Таблица 2d

Первый цитокин	scFv	Второй цитокин
hIL10 (SEQ ID NO: 1)	CD19	IFN-альфа (SEQ ID NO: 49)
	CD20	
	CD22	
	CD3	
	CD38	
	CD44	
	BCMA	
	HER3	
	PSCA	
	PSMA	
	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
	CD70	
CD33		
CXCR4		
CEA		
DV07 (SEQ ID NO: 3)	CD19	

	CD20	
	CD22	
	CD3	
	CD38	
	CD44	
	BCMA	
	HER3	
	PSCA	
	PSMA	
	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
	CD70	
	CD33	
	CXCR4	
	CEA	

Таблица 2е

Первый цитокин	scFv	Второй цитокин
hIL10 (SEQ ID NO: 1)	CD19	IL-21 (SEQ ID NO: 49)
	CD20	
	CD22	
	CD3	
	CD38	
	CD44	
	BCMA	
	HER3	
	PSCA	
	PSMA	
	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
	CD70	
CD33		
CXCR4		

	CEA	
DV07 (SEQ ID NO: 3)	CD19	
	CD20	
	CD22	
	CD3	
	CD38	
	CD44	
	BCMA	
	HER3	
	PSCA	
	PSMA	
	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
	CD70	
	CD33	
	CXCR4	
	CEA	

[0083] В еще одних аспектах диакин или слитый белок на основе двух цитокинов, содержащий IL-10, IL-12 или IL-27, включает линкеры. Специалистам в данной области известно, что линкеры или спейсеры используются для достижения правильной пространственной конфигурации различных частей слитого белка, и, следовательно, они могут выбрать подходящий линкер для использования при формировании слитого белка на основе двух цитокинов, содержащего IL-10. В более предпочтительном варианте линкер или спейсер может представлять собой произвольную аминокислотную последовательность (такую как SEQ ID NO: 39-44) или константную область антитела. Константная область может быть получена из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgD или IgE, но не ограничивается ими. В одном варианте осуществления линкер или спейсер представляет собой константную область тяжелой цепи («СН») 1, СН2 или СН3. В еще одном аспекте линкер или спейсер может дополнительно содержать, по меньшей мере, две межцепочечные дисульфидные связи.

[0084] В еще одних аспектах настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют диакин или слитый белок на основе двух цитокинов, содержащий IL-10, IL-12 или IL-27 и второй цитокин. Эти молекулы нуклеиновой кислоты описаны в заявке на патент США № 17/110104. Полинуклеотидные последовательности, которые кодируют диакин или слитый белок на основе двух цитокинов, содержащий IL-10 и второй цитокин, также могут включать модификации,

которые не изменяют функциональные свойства описанного слитого белка на основе двух цитокинов. Для обеспечения таких модификаций будут использоваться традиционные методы и методы рекомбинантной ДНК. Например, добавление или замена определенных аминокислотных последовательностей могут быть введены в последовательность IL-10 на уровне нуклеиновой кислоты (ДНК) с использованием методов сайт-направленного мутагенеза с использованием синтетических олигонуклеотидов, такие методы также хорошо известны в данной области. В предпочтительном варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие слитый белок на основе двух цитокинов, содержащий IL-10 и второй цитокин, могут включать вставки, делеции или замены (например, вырожденный код), которые не изменяют функциональные свойства вариантной молекулы IL-10. Нуклеотидные последовательности, кодирующие вариант IL-10, IL-12, IL-27 и/или полные слитые белки, описанные в настоящем документе, могут отличаться от аминокислотных последовательностей за счет вырожденности генетического кода и могут быть на 70-99%, предпочтительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологичными вышеуказанным последовательностям. Соответственно, вариант осуществления настоящего изобретения включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок с SEQ ID NO: 35, 46-58 или 59, но отличается на 70-99% за счет вырожденности генетического кода.

[0085] Нуклеотидные последовательности, кодирующие диакин или слитый белок на основе двух цитокинов, описанные в настоящем документе, могут дополнительно включать хорошо известные последовательности, которые способствуют, например, экспрессии, продукции или секреции белков. Такие последовательности могут включать, например, лидерную последовательность, сигнальный пептид и/или сайты/последовательности инициации трансляции (например, консенсусную последовательность Козака). Нуклеотидные последовательности, описанные в настоящем документе, могут также включать один или более сайтов рестрикции, которые позволяют встраивать их в различные экспрессионные системы/векторы.

[0086] В еще одном аспекте нуклеотидные последовательности, кодирующие диакин или слитый белок на основе двух цитокинов, могут быть использованы непосредственно в генной терапии. В одном варианте осуществления вариант молекулы IL-10, IL-12 или IL-27 или слитый белок по настоящему изобретению можно доставлять любым способом, известным в данной области техники, включая прямое введение мутантных белков IL-10, IL-12 или IL-27 и генную терапию с использованием вектора, кодирующего мутантный белок IL-10. Генную терапию можно проводить с использованием плазмидной ДНК или вирусного вектора, такого как аденоассоциированный вирусный вектор, аденовирусный вектор, ретровирусный вектор и т. д. В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы по настоящему изобретению вводят в виде вирусных частиц, и в других их вводят в виде плазмид (например, в виде «голой» ДНК).

[0087] Другие способы доставки нуклеотидных последовательностей включают те,

которые уже известны в данной области. Они могут включать доставку нуклеотидных последовательностей, таких как, не ограничиваясь этим, ДНК, РНК, миРНК, мРНК, олигонуклеотиды или их варианты, кодирующие IL-10 или вариантыные молекулы IL-10 с использованием проникающего в клетки пептида, гидрофобного фрагмента, электростатического комплекса, липосомы, лиганда, липосомальной наночастицы, липопротеина (предпочтительно HDL или LDL), липосомы, нацеленной на фолаты, антитела (такого как антитело к фолатному рецептору, рецептору трансферрина), нацеливающего пептида или аптамера. Нуклеотидные последовательности, кодирующие вариантыные молекулы IL-10, могут быть доставлены субъекту посредством прямой инъекции, инфузии, пластырей, повязок, тумана или аэрозоля или доставки посредством тонкой пленки. Нуклеотид (или белок) может быть направлен в любую область, для которой требуется адресная доставка цитокинового стимула. К ним относятся, например, легкие, желудочно-кишечный тракт, кожа, печень, головной мозг с использованием внутривенной инъекции, глубокие метастатические опухолевые очаги с использованием инъекций под ультразвуковым контролем.

[0088] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения и очистки дикина или слитого белка на основе двух цитокинов, содержащего IL-10, IL-12 или IL-27. Например, последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют слитый белок на основе двух цитокинов, описанный в настоящем документе, можно использовать для рекомбинантного получения слитых белков. Например, используя обычные методы молекулярной биологии и экспрессии белков, слитый белок на основе двух цитокинов, описанный здесь, можно экспрессировать и выделить из клеточных систем млекопитающих. Такие системы включают хорошо известные экспрессионные векторные системы на основе эукариотических клеток и клетки-хозяева. Можно использовать различные подходящие экспрессионные векторы, хорошо известные специалистам в данной области, которые можно использовать для экспрессии и введения вариантыных молекул IL-10, IL-12 или IL-27 и слитых белков. Такие векторы включают, например, векторы типа pUC, векторы типа pBR, векторы типа pBI, векторы типа pGA, pBin19, pBI121, серии pGreen, серии pCAMBRIA, серии pPZP, pPCV001, pGA482, pCLD04541, серии pBIBAC, серии pYLTAС, pSB11, pSB1, серии pGPTV и вирусные векторы и т.п. Хорошо известные системы клеток-хозяев включают, не ограничиваясь этим, экспрессию в клетках CHO.

[0089] Экспрессионные векторы, несущие слитый белок на основе двух цитокинов, также могут включать другие компоненты вектора, необходимые для функциональности вектора. Например, вектор может включать сигнальные последовательности, последовательности-метки, последовательности распознавания протеаз, селективируемые маркеры и другие регуляторные последовательности, такие как промоторы, необходимые для правильной репликации и экспрессии слитого белка на основе двух цитокинов. Конкретные промоторы, используемые в векторе, особым образом не ограничиваются, при условии, что они могут направлять экспрессию слитого белка на основе двух

цитокинов в различных типах клеток-хозяев. Аналогично, тип промоторов метки не ограничивается, при условии, что последовательность метки упрощает очистку экспрессированной молекулы варианта IL-10. Они могут включать, например, 6-гистидин, GST, MBP, NAT, HN, S, TF, Trx, Nus, биотин, FLAG, мус, RCFP, GFP и т.п. Последовательности распознавания протеаз особым образом не ограничиваются, например, можно использовать последовательности распознавания, такие как фактор Ха, тромбин, HRV, протеаза 3С. Селектируемые маркеры особым образом не ограничиваются, при условии, что они могут обнаруживать трансформированные клетки растений риса, например, могут быть использованы гены устойчивости к неомицину, гены устойчивости к канамицину, гены устойчивости к гигромицину и т.п.

[0090] Диакин или слитый белок на основе двух цитокинов, описанный выше, также может включать дополнительные аминокислотные последовательности, которые облегчают выделение или очистку слитых белков в процессе производства. Они могут включать различные модификации последовательности или аффинные метки, такие как, помимо прочего, белок А, альбумин-связывающий белок, щелочная фосфатаза, эпитоп FLAG, галктоза-связывающий белок, гистидиновые метки и любые другие метки, которые хорошо известны в данной области. См., например, публикацию Kimple et al (Curr. Protoc. Protein Sci., 2013, 73:Unit 9.9, таблица 9.91, которая в полном объеме включена здесь посредством ссылки). В одном аспекте аффинная метка представляет собой гистидиновую метку, имеющую аминокислотную последовательность ННННН (SEQ ID NO: 42). Гистидиновая метка может быть удалена или оставлена интактной из конечного продукта. В еще одном варианте осуществления аффинная метка представляет собой модификацию белка А, которая включена в слитый белок (например, в VH-область слитых белков, описанных в настоящем документе). Специалистам в данной области техники будет понятно, что любая последовательность слитого белка на основе двух цитокинов, описанная в настоящем документе, может быть модифицирована для включения модификации белком А посредством вставки аминокислотных точечных замен в каркасные области антитела, как описано в данной области техники.

[0091] В еще одном аспекте белок и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие слитый белок на основе двух цитокинов, могут быть сформулированы в виде фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество слитого белка на основе двух цитокинов и фармацевтический носитель и/или фармацевтически приемлемые эксципиенты. Фармацевтическая композиция может быть сформулирована с обычно используемыми буферами, эксципиентами, консервантами, стабилизаторами. Фармацевтические композиции, содержащие слитый белок на основе двух цитокинов, смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом. Различные фармацевтические носители известны в данной области и могут быть использованы в фармацевтической композиции. Например, носитель может представлять собой любое совместимое нетоксичное вещество, подходящее для доставки пациенту композиций слитого белка на основе двух цитокинов. Примеры подходящих

носителей включают физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и раствор Хенкса. Носители могут также включать любые полуксамеры, общеизвестные специалистам в данной области, включая, не ограничиваясь этим, те, которые имеют молекулярную массу 2900 (L64), 3400 (P65), 4200 (P84), 4600 (P85), 11400 (F88), 4950 (P103), 5900 (P104), 6500 (P105), 14600 (F108), 5750 (P123) и 12600 (F127). Носители могут также включать эмульгаторы, включая, не ограничиваясь этим, полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60 и полисорбат 80, и это лишь некоторые из них. Можно также использовать неводные носители, такие как нелетучие масла и этилолеат. Носитель также может включать добавки, такие как вещества, повышающие изотоничность и химическую стабильность, например, буферы и консерванты, см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Составы терапевтических и диагностических средств могут быть приготовлены смешиванием с физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами, например, в форме лиофилизированных порошков, взвесей, водных растворов или суспензий.

[0092] Фармацевтическая композиция должна быть формулирована для введения пациенту в терапевтически эффективном количестве, достаточном для обеспечения желаемого терапевтического результата. Предпочтительно такое количество оказывает минимальные негативные побочные эффекты. В одном варианте осуществления количество вводимого слитого белка на основе двух цитокинов будет достаточным для лечения или профилактики воспалительных заболеваний или патологических состояний. В другом варианте осуществления количество вводимого слитого белка на основе двух цитокинов будет достаточным для лечения или профилактики заболеваний или расстройств иммунной системы. В еще одном варианте осуществления количество вводимого слитого белка на основе двух цитокинов будет достаточным для лечения или профилактики рака. Вводимое количество может варьироваться от пациента к пациенту, и будет определяться с учетом заболевания или патологического состояния субъекта или пациента, общего состояния здоровья пациента, способа введения, тяжести побочных эффектов и т.п.

[0093] Эффективное количество для конкретного пациента может варьироваться в зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, которое лечат, общее состояние здоровья пациента, способ введения и доза, а также тяжесть побочных эффектов. Подходящая доза для введения пациенту обычно определяется клиницистом с использованием показателей или факторов, известных или предполагаемых в данной области, влияющих на лечение или предполагаемо влияющих на лечение. Как правило, доза начинается с количества, несколько меньшего, чем оптимальная доза, и затем ее повышают небольшими приращениями до тех пор, пока не будет достигнут желаемый или оптимальный эффект по отношению к любым негативным побочным эффектам. Важные диагностические показатели включают в себя симптомы, например, воспаления, или уровень продуцированных воспалительных цитокинов.

[0094] Способ определения дозы описанного слитого белка на основе двух цитокинов будет по существу аналогичен способу, описанному в патенте США № 10858412. Как правило, описанный слитый белок на основе двух цитокинов будет иметь дозировку в диапазоне от 0,5 мкг/кг до 100 мкг/кг. Слитый белок на основе двух цитокинов 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 будет оказывать влияние на степень выраженности воспаления, заболевания или патологического состояния, облегчая их симптомы. Например, эффект лечения может включать эффект, составляющий, по меньшей мере, 10%; по меньшей мере, 20%; по меньшей мере, примерно 30%; по меньшей мере, 40%; по меньшей мере, 50% или более, так что в результате заболевание или патологическое состояние облегчается или полностью излечивается.

[0095] Композиции по изобретению можно вводить в организм перорально или инъекцией. Составы для перорального применения также могут включать соединения для дополнительной защиты молекул вариантного IL-10 от протеаз в желудочно-кишечном тракте. Инъекции обычно представляют собой внутримышечные, подкожные, внутрикожные или внутривенные. В качестве альтернативы, при соответствующих обстоятельствах можно использовать внутрисуставную инъекцию или другие пути введения. Слитый белок на основе двух цитокинов для парентерального введения предпочтительно формулируют в виде разовой инъекционной лекарственной формы (раствор, суспензия, эмульсия) в сочетании с фармацевтическим носителем и/или фармацевтически приемлемыми эксципиентами. В других вариантах композиции для применения могут быть введены в организм пациента с помощью имплантируемой или инъекционной системы доставки лекарственных препаратов.

Тестирование диакина или слитого белка на основе двух цитокинов

[0096] Множество скрининговых анализов известно и доступно специалистам в данной области для тестирования желаемой биологической функции. В одном варианте осуществления желаемая биологическая функция включает, не ограничиваясь этим, снижение противовоспалительного ответа, уменьшение стимуляции Т-клеток, усиление функции Т-клеток, усиление функциональности клеток Купфера и снижение дегрануляции тучных клеток.

[0097] Например, известно, что воздействие IL-10 праймирует Т-клетки с генерацией и секрецией более высокого уровня IFN γ при стимуляции Т-клеточного рецептора. Одновременно воздействие IL-10 предотвращает секрецию TNF α , IL-6 и других провоспалительных цитокинов, секретируемых моноцитами/макрофагами в ответ на LPS. IL-10 также подавляет пролиферацию FOXP3⁺CD4⁺ T_{reg}. В одном варианте осуществления положительно выбран слитый белок на основе двух цитокинов, который максимально подавляет моноциты/макрофаги, но не оказывает влияния на Т-клетки, включая как стимуляторные, так и супрессорные ответные реакции. В одном варианте осуществления в результате скрининга будут положительно выбраны слитые белки на

основе двух цитокинов, которые обладают повышенным противовоспалительным действием, для лечения аутоиммунного, воспалительного заболевания или того и другого. В еще одном варианте осуществления для разработки лечения рака будут выбраны слитые белки на основе двух цитокинов, которые максимально воздействуют на биологию Т-клеток, включая как стимуляторные, так и супрессорные ответы, а также обладают свойством усиливать блокирование клеток Купфера. Различные анализы и способы скрининга слитых белков на основе двух цитокинов ранее описаны в одновременно заявленном патенте США № 10858412, который в полном объеме включен здесь посредством ссылки. См. заявку США 16/811, описание 718 на стр. 39-42.

Рекомбинантно сконструированные клетки или АСТ

[0098] В одном аспекте способы, раскрытые в настоящем документе, будут включать комбинацию диакина с АКТ-терапией, например, такой как, не ограничиваясь этим, рекомбинантно сконструированная клетка включает рекомбинантный антигенный рецептор в форме химерного антигенного рецептора (CAR), TCR или функциональные не-TCR, TIL, NK-клетки, предпочтительно CAR-T, нацеленные на ТАА, ассоциированный с солидной опухолью. В некоторых вариантах осуществления антигенный рецептор содержит внеклеточный домен распознавания антигена, который специфически связывается с антигеном ТАА, и внутриклеточный сигнальный домен.

[0099] Типичный рекомбинантно экспрессированный CAR или TCR будет содержать внеклеточный домен распознавания антигена («EARD»), трансмембранный домен и внутриклеточный домен.

[0100] EARD может быть специфичным для белков, полипептидов или углеводов. Особенно пригодными для лечения рака являются EARD, нацеленные на ТАА. Например, EARD может быть нацелен на ТАА, такие как, не ограничиваясь этим, EGFR, VEGFR1, VEGFR2, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, ErbB2, 3 или 4, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелин, CEA и поверхностный антиген вируса гепатита В, антифолатный рецептор, карциноэмбриональный антиген (CEA), простат-специфический антиген (PSA), PSMA, Her2/неу, эстрогенный рецептор, прогестероновый рецептор, эфринB2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2 и MAGE A3, CD3, CD4, CD5, CD7, CD23, CD24, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD44, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, BCMA, CLL01, LMP-1, SLAMF7, NY-ESO-1, TCAI, CS-1, CCR4, ROR1, tEGFR, MUC1, MUC16, PSCA, лиганды NKG2D, MART-1, gp100, онкофетальный антиген, ROR1, TAG72, FBP, фетальный рецептор ацетихолина e, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, легкая цепь каппа, Lewis Y, молекула клеточной адгезии L1, мезотелин MAGE-AL, CE7, опухоль Вильмса 1 (WT-1) или циклин. Специалистам в данной области должно быть понятно, что рекомбинантно сконструированная клетка, содержащая EARD, будет зависеть от опухоли или рака, подлежащего лечению. Соответственно, специалисты в данной области смогут выбрать подходящий CAR-T или TCR-T с соответствующим EARD для нацеливания на рак.

[0101] Трансмембранные домены CAR или TCR представляют собой

искусственные гидрофобные области или те, которые обычно ассоциируются с EARD, или общеизвестные трансмембранные домены. Они включают, помимо прочего, домены из CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CDS, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154 или альфа, бета- или дзета-цепи TCR.

[0102] Специалистам в данной области также известно, что внутриклеточные домены CAR-T- или TCR-T-клеток будут содержать один или более из следующих внутриклеточных сигнальных доменов: ITAM (например, CD3-дзета «CD3 ξ »), костимулирующий домен I («СМ1») (например, CD28, CD134, CD137/4-1BB или ICOS) и/или костимулирующий домен II («СМII») (например, CD134 или CD137/4-1BB).

[0103] Рекombинантно сконструированная клетка может представлять собой Т-клетки, включая CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки. В других аспектах Т-клетки представляют собой либо аутологичные, либо аллогенные клетки, предпочтительно аутологичные. В некоторых вариантах осуществления соотношение CD4⁺ и CD8⁺ клеток составляет примерно от 1:5 до примерно 5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение CD4⁺ и CD8⁺ клеток составляет примерно от 1:2 до примерно 2:1. В некоторых вариантах осуществления доза клеток составляет примерно от 0,2×10⁶ клеток/кг массы тела субъекта до примерно 6×10⁶ клеток/кг, примерно от 0,5×10⁶ клеток/кг массы тела субъекта и примерно 3×10⁶ клеток/кг, примерно от 0,75×10⁶ клеток/кг до примерно 2,5×10⁶ клеток/кг или примерно от 1×10⁶ клеток/кг до примерно 2×10⁶ клеток/кг, каждый диапазон включительно.

Биспецифические моноклональные антитела

[0104] В одном аспекте способы, раскрытые в настоящем документе, будут включать комбинацию дикаина с биспецифическим моноклональным антителом (BSMab). BSMab, в общем, известны в данной области и включают, помимо прочего, биспецифические активаторы Т-клеток (BiTE), тандемные одноцепочечные вариабельные фрагменты (taFv), диатела (Db), одноцепочечные диатела (scDb), тройные тела или трехвалентные антитела или их фрагменты, перенацеливающие антитела двойной аффинности (DART) или технология Trident. Репрезентативный пример BSMab включает BiTE, которые в широком смысле описываются как биспецифические моноклональные антитела, способные связываться с двумя разными антигенными детерминантами или мишенями. Обычно BiTE состоят из двух молекул scFv, где первый scFv способен распознавать поликлональные иммунные клетки (например, CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетки или НК-клетки), и второй scFv способен распознавать опухолевую антигенную мишень или ТАА. Обычно это достигается за счет наличия первого scFv, распознающего CD3, на поверхности Т-клетки (или НК-клетки), и второго scFv, распознающего ТАА, такой как CD20.

[0105] В одном аспекте BiTE будет включать scFv, обладающий специфичностью в отношении CD3, в то время как второй scFv может обладать специфичностью в отношении различных ТАА, которые обнаруживаются на поверхности как гематологических, так и солидных опухолей. В одном варианте осуществления первый

scFv, специфичный для CD3, можно комбинировать со вторым scFv, специфичным для EGFR, VEGFR1, VEGFR2, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, ErbB2, 3 или 4, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CEA и поверхностного антигена вируса гепатита В, антифолатного рецептора, карциноэмбрионального антигена (CEA), простат-специфического антигена (PSA), PSMA, Her2/neu, HER3, эстрогенового рецептора, прогестеронового рецептора, эфринаB2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2 и MAGE A3, CD3, CD4, CD5, CD7, CD23, CD24, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD44, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, BCMA, CLL01, LMP-1, SLAMF7, NY-ESO-1, TCAI, CS-1, CCR4, ROR1, tEGFR, MUC1, MUC16, PSCA, лигандов NKG2D, B7-H3, PD-1, PD-L1, EpCAM, PSCA, GPC3, AXL, клаудина18.2, CTLA-4, CEA, PSA, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, FBP, фетального ацетихолинового рецептора, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, легкой цепи каппа, Lewis Y, молекулы клеточной адгезии L1, мезотелина MAGE-AL, CE7, опухоли Вильмса 1 (WT-1) или циклина. В одном аспекте BSMab (более конкретно, BiTE) будет обладать одной специфичностью к ТАА, в то время как диакин будет обладать специфичностью к другому ТАА. Например, BiTE может представлять собой BSMab, обладающее специфичностью к CD3 и CD20, тогда как диакин будет находиться в форме DK2¹⁰, имеющей VH и VL scFv, специфичные к CD19.

Способы лечения и/или профилактики с использованием диакина в комбинации с АСТ или BiTE

[0106] Не желая связываться с какой-либо конкретной теорией, авторы изобретения полагают, что нацеливание как IL-10, так и IL-2 на сосудистую сеть опухоли, например, посредством направления диакина на VEGFR2, обеспечит активацию, инфильтрацию и персистенцию, одновременно ограничивая токсичность за счет опухолеспецифической активации CAR-T-клеток и прямого подавления синдрома высвобождения цитокинов и токсичности IL-2 под действием DV07 (высокоаффинная форма IL-10). Также авторы изобретения полагают, что нацеливание одного IL-10 на сосудистую сеть опухоли с использованием варианта слитого белка с одним цитокином в Dvegfr2DV07, описанного в патенте США № 10858412 (см. также фиг.1 в качестве репрезентативного примера структуры), также будет способствовать быть эффективной опухолеспецифической активации CAR-T-клеток. В еще одном варианте осуществления, основанном на аналогичных гипотезах, диакины содержат комбинацию IL-10 и IL-7, или IL-12 и IL-10, или IL-10 и IL-15, или IL-10 и IFN-альфа, или IL-10 и IL-21, или IL-10 и IL-27. Согласно другой гипотезе, авторы изобретения полагают, что диакины в форме DK2¹⁰ способны праймировать иммунную систему для повышения или усиления функции обычных препаратов для АСТ или BiTE.

[0107] Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения и/или профилактики онкологических заболеваний или состояний или рака, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества диакина или слитого белка на основе двух цитокинов,

содержащего IL-10, IL-12, IL-27 и второй цитокин в комбинации с АСТ, такой как CAR-T-клетки или TCR-T-клетки, или BSMab, такое как BiTE. Такой слитый белок на основе двух цитокинов, описанный выше, предпочтительно может находиться в форме DK2¹⁰, DK7¹⁰, DK12¹⁰, DK15¹⁰, DKIFNa¹⁰, DK21¹⁰ или DK27¹⁰, с мономерами DV07 и привитыми CDR из любого антитела, нацеленного на опухолеассоциированный антиген («ТАА»). В предпочтительном варианте осуществления слитый белок на основе двух цитокинов находится в форме DK2¹⁰, содержащей DV07. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что доза диакина или слитого белка на основе двух цитокинов, описанного в настоящем документе, может быть скорректирована при необходимости или в зависимости от получения желаемого результата. В одном аспекте диакин вводят пациенту, нуждающемуся в этом, в дозе примерно от 0,001 до 0,25 мг/кг, предпочтительно в диапазоне доз от 0,01 до 0,2 мг/кг. В еще одном аспекте доза, вводимая пациенту, нуждающемуся в этом, достаточна для достижения концентрации в сыворотке или плазме от 0,0005 до 250 нг/мл, предпочтительно в диапазоне от 0,001 до 200 нг/мл.

[0108] Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что адоптивная клеточная терапия (такая как адоптивная T-клеточная терапия) хорошо известна и практикуется в соответствии с ранее описанными процедурами. См., например, патент США № 4690915. Эти способы могут включать аутологичный перенос (т.е. от самого пациента) или аллогенный перенос (т.е. от другого субъекта, иного чем пациент, подлежащий лечению).

[0109] CAR-T- или TCR-T-клетки вводят способами, известными и традиционно применяемыми специалистами, знакомыми с адоптивной клеточной терапией. В одном варианте осуществления способ введения включает, помимо прочего, болюсную инфузию, внутривенные или подкожные инъекции, внутриглазную инъекцию, периокулярную инъекцию, субретинальную инъекцию, интравитреальную инъекцию, трансептальную инъекцию, субсклеральную инъекцию, интрахориоидальную инъекцию, внутрикамерную инъекцию, субконъюнктивальную инъекцию, субконъюнктивальную инъекцию, субтеноновую инъекцию, ретробульбарную инъекцию, перибульбарную инъекцию или заднюю юкстасклеральную инъекцию. В некоторых вариантах осуществления их вводят парентеральным, внутрилегочным и интраназальным путем, либо вводят в очаг поражения, либо интратуморально. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантно сконструированный CAR-T или TCR-T вводят в виде однократного болюсного введения, многократного болюсного введения или непрерывной инфузии.

[0110] В одном варианте осуществления слитый белок на основе двух цитокинов и CAR-T вводят в отдельные последующие периоды времени, где, например, диакин (такой как DK2¹⁰vegfr2) вводят до введения рекомбинантно сконструированной CAR-T-клетки. В других вариантах осуществления слитый белок на основе двух цитокинов и CAR-T вводят одновременно. В еще одних вариантах осуществления диакин вводят за 1-3 суток до CAR-

T-терапии и затем одновременно вводят вместе с CAR-T и/или через 1-7 суток после введения CAR-T. Диакин можно вводить один раз в сутки или неделю или 2-3 раза в неделю в комбинации или вместе с CAR-T. В еще одном аспекте диакин используется в процедуре экспандирования и/или размораживания CAR-T-клеток перед введением. После восстановления CAR-T-клеток из криоконсервированного исходного материала CAR-T обычно находятся в состоянии покоя в присутствии пригодных CAR-T цитокинов (например, низких доз IL-2). В одном аспекте CAR-T-клетки могут быть праймированы или экспандированы из криоконсервированных исходных клеток в присутствии диакина. В одном аспекте CAR-T экспандируют или праймируют в присутствии от 0,001 до 300 нг/мл диакина, более предпочтительно от 0,01 до 200 нг/мл диакина.

[0111] Аналогичным образом, диакин и ViTE вводят в отдельные последующие периоды времени, где диакин (например, DK2¹⁰CD20) вводят за 1-3 суток до введения ViTE (например, CD3×CD19 ViTE). В других вариантах осуществления диакин вводят за 1-3 суток до введения ViTE, и затем одновременно вводят вместе с ViTE и/или через 1-7 суток после введения ViTE. Диакин можно вводить один раз в сутки или неделю или 2-3 раза в неделю в комбинации с ViTE.

[0112] В еще одних вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к способам совместного введения или лечения со вторым терапевтическим средством, например, цитокином, стероидом, химиотерапевтическим препаратом, антибиотиком, противовоспалительным средством или лучевой терапией, которые хорошо известны в данной области. Они могут включать комбинированное лечение с другими терапевтическими средствами, такими как, не ограничиваясь одним или более из следующего: химиотерапевтическими препаратами, интерфероном-β, например, IFNβ-1α и IFNβ-1β; белком, имитирующим основной белок миелина; кортикостероидам; ингибиторами IL-1; ингибиторами TNF; анти-TNFα антителами, анти-IL-6 антителами, слитым белком IL-1br-Ig, анти-IL-23 антителами, антителами к лиганду CD40 и CD80; антагонистами IL-12 и IL-23, например, антагонистами субъединицы p40 IL-12 и IL-23 (например, ингибирующие антитела против субъединицы p40); антагонистами IL-22; низкомолекулярными ингибиторами, например, метотрексатом, лефлуномидом, сиролimusом (рапамицином) и их аналогами, например, CCI-779; ингибиторами COX-2 и cPLA2; НПВП; ингибиторами p38; TPL-2; Mκ-2; ингибиторами NFκβ; RAGE или растворимым RAGE; ингибиторами P-селектина или PSGL-1 (например, низкомолекулярными ингибиторами, антителами к ним, например, антителами к P-селектину); агонистами бета-рецепторов эстрогена (ERB) или антагонистами ERB-NFκβ.

[0113] Кроме того, комбинированное лечение, подходящее для применения со слитым белком на основе двух цитокинов, может включать ингибиторы TNF, в том числе, 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 кДТNFR-IgG (слитый белок

75 кДа рецептор TNF-IgG, ENBREL™), слитый белок p55 кДа рецептор TNF-IgG; и ферментные антагонисты TNF, например, ингибиторы TNF α - превращающего фермента (TACE). Другое комбинированное лечение противовоспалительными агентами/лекарственными препаратами включает, помимо прочего, обычные нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) и ингибиторы циклооксигеназы-2. НПВП могут включать аспирин, целекоксиб, диклофенак, дифлунизал, этодолак, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, кеторолак, набуметон, напроксен, оксaproзин, пироксикам, салсалат, сулиндак и/или толметин. Ингибитором циклооксигеназы-2, используемым в композициях по настоящему изобретению, может быть, например, целекоксиб или рофекоксиб.

[0114] Дополнительные терапевтические средства, которые можно совместно вводить и/или совместно формулировать со слитым белком на основе двух цитокинов, включают одно или более из: интерферона- β , например, IFN β -1 α и IFN β -1 β ; COPAXONE®; 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 лиганду CD40 и CD80; и антагонистов IL-12 и/или IL-23, например, антагонистов субъединицы p40 IL-12 и IL-23 (например, ингибирующие антитела, которые связываются с субъединицей p40 IL-12 и IL-23); метотрексата, лефлуномида и сиролимуса (рапамицина) или их аналогов, например, CCI-779. Другие терапевтические средства могут включать имфинзи или атезолизумаб.

[0115] Репрезентативные химиотерапевтические препараты, которые можно вводить совместно со слитым белком на основе двух цитокинов, описанным в настоящем документе, могут включать (в качестве неисчерпывающего списка): алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид мехлорэтамина оксида, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид; урациловые иприты, нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофиллин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги

пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-ФУ; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепитиостан, тестолактон; антиадреналовые агенты, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; восполнитель фолиевой кислоты, такой как фолиевая кислота; ацеглатон; альдофосфамидгликозид; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эльфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK[®]; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин, уретан, виндезин, дакарбазин, манномустин, митобронитол, митолактол, пипоброман, гацитозин, арабинозид (Ara-C), циклофосфамид, тиотепа, таксоиды, например, паклитаксел (TAXOL Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) и доксетаксел (Taxotere[™], 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, навельбин, новантрон, тенипозид, дауномицин, аминоклутерин, Xeloda[®] Roche, Швейцария; ибандронат; СРТ11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (ДМФО); ретиноевая кислота; эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных препаратов. В данное определение также включены антигормональные агенты, которые регулируют или ингибируют действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Fareston); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных препаратов.

Пример 1: комбинация диакина и CAR-T

[0116] Тестировали различные соотношения эффектора к мишени (Е:Т) CAR-T к опухолевым клеткам для определения того, насколько комбинирование диакинов с CAR-T будет усиливать функцию цитотоксических эффектов CAR-T. Вкратце, CAR-T-клетки (Promab) подвергаются праймированию в течение 1-3 суток в присутствии диакина (DK2¹⁰CD19) в концентрации 0, 10 или 100 нг/мл. Клетки Raji, которые стабильно трансфектировали конститутивно экспрессирующимся GFP, используются в качестве модельной линии опухолевых клеток для исследования функции CAR-T. После праймирования CAR-T-клетки смешивают в соотношении Е:Т 3:1 или 1:3, дают возможность взаимодействовать с клетками Raji-GFP и контролируют с использованием системы IncuCyte S3 (Sartorius). Цитолитическую эффе́ктивность CAR-T-клеток оценивают по исчезновению GFP в течение примерно 48 ч.

[0117] Процент роста опухолевых клеток (т.е. исчезновение GFP является показателем того, что клетки-мишени подвергаются цитолизу) определяли во времени. Через 24 ч комбинация диакина (10 нг/мл или 100 нг/мл) при соотношении эффектора к мишени 3:1 CD20 CAR-T-клеток и клеток Raji продемонстрировала снижение роста опухолевых клеток примерно в 6,5 раз по сравнению с одними CAR-T-клетками. См. фиг. 9А. Аналогично, через 24 ч комбинация диакина (10 нг/мл или 100 нг/мл) при соотношении эффектора к мишени 1:3 CD20 CAR-T-клеток и клеток Raji показала снижение роста опухолевых клеток примерно в 2 раза по сравнению с одними CAR-T-клетками. Смотри, фиг. 10В. Полученные данные демонстрируют, что когда диакины используются для праймирования CAR-T-клеток перед введением, то CAR-T обладают повышенной и более высокой цитотоксической функцией.

Пример 2: лечение солидной опухоли диакином в комбинации с CAR-T

[0118] В этом способе лечения рака субъекту вводят эффективное количество диакина (например, DK2¹⁰vegfr2), который способен направлять как IL-10, так и IL-2 в микроокружение опухоли со сверхэкспрессией ТАА, такого как VEGFR2. Затем, используя стандартные протоколы адоптивной клеточной терапии, вводят CAR-T-клетку, экспрессирующую EARD, нацеленный на сверхэкспрессированные антигены на опухолевых клетках, такие как her2/neu или PSA. Перед введением пациенту, CAR-T-клетки экспандируют, необязательно в присутствии диакина. При подготовке сконструированных клеток, CAR выбирают таким образом, чтобы его EARD специфически связывался с антигенным эпитопом, специфичным для опухоли, подлежащей лечению.

Пример 3: комбинация диакина и ViTE

[0119] Обоснование для определения того, насколько диакины являются выигрышными для современных методов лечения с использованием ViTE, было инициировано пониманием того, как диакины ведут себя при воздействии PBMC. Используя модельную систему для определения ответа Т-клеток (см. патент США № 10858412, колонки 29-30), PBMC подвергают воздействию различных концентраций диакина (от 0 нг/мл до 10 мкг/мл DK2¹⁰egfr) с последующим определением профиля индукции цитокинов. Профили цитокинового ответа наивных PBMC представлены на фиг. 5А-5F для IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-12p70, IFN α 2a и IL6 соответственно, и на фиг. 6А-6D для IL-4, IL-17, IL-8 и GM-CSF соответственно. Полученные данные демонстрируют, что диакин, конфигурированный в форме DK2¹⁰, который объединяет IL-10 (DV07) и IL-2 вместе, эффективно подавляет индукцию цитокинов, связанных с одним IL-2, уступая место молекуле, способной усиливать цитотоксическую функцию без повышенного выброса воспалительных цитокинов.

[0120] Затем оценивали ответную реакцию CD8⁺ Т-клеток на праймирование диакином (DK2¹⁰). Вкратце, CD8⁺ Т-клетки подвергают иммунномагнитной сортировке и активируют анти-CD3/анти-CD28 в течение 3 суток. После активации CD8⁺ Т-клеткам предоставляют период покоя и праймируют в присутствии диакина в течение 24, 48 и 72

ч. После периода покоя и праймирования (т. е. на сременные точки 24, 48 или 72 ч) оценивают уровни гранзима В, IFN- γ и TNF- α после стимуляции анти-CD3 в течение 4, 20, 48 и 48 ч и 72 ч. Праймирование CD8⁺ Т-клеток в низкой концентрации 1 нг/мл диакина в форме DK2¹⁰ показало повышенные уровни гранзима В (фиг. 7) с одновременно повышенными уровнями IFN- γ (фиг. 8), в то время как уровни TNF- α снижались (фиг. 9). В совокупности полученные данные показывают, что когда цитотоксические Т-клетки подвергаются воздействию диакина в форме DK2¹⁰, то индукция воспалительных цитокинов относительно подавляется, а при стимуляции CD8⁺ Т-клетки становятся высокоактивными против мишени.

[0121] Используя вышеизложенное обоснование, коммерчески доступные ViTE, анти-CD3ханти-CD19 и анти-CD3ханти-CD20, тестировали в комбинации с диакинами DK2¹⁰egfr и DK2¹⁰CD19 соответственно. Вкратце, CD8⁺ Т-клетки, свежeweделенные от здоровых доноров, оценивали на предмет их способности к цитолизу на клетках Raji, стабильно трансфектированных конститутивно экспрессирующим GFP. Ранее также было установлено, что клетки Raji экспрессируют на клеточной поверхности EGFR, CD19 и CD20 (как показано с использованием FACS, данные не приводятся). CD8⁺ Т-клетки подвергают праймированию в течение 1-2 суток в присутствии от 0 до 100 нг/мл диакина (DK2¹⁰egfr и DK2¹⁰CD19). Эффективность ViTE для цитолиза клеток Raji измеряли и контролировали с помощью системы IncuCyte S3 (Sartorius) по исчезновению GFP в течение периода примерно 48 ч. Одновременно оценивали уровни аналитов IFN- γ , TNF- α , гранзима В и перформина, которые представляют собой цитокины, протеазы и белки, важные для цитотоксической функции.

[0122] На фиг. 11E-11F представлена оценка комбинирования диакина в форме DK2¹⁰egfr с самой низкой функциональной концентрацией CD3 \times CD19 ViTE (0,01 нг/мл) на временную точку 48 ч. На фиг. 12E-12F представлена оценка комбинирования диакина в форме DK2¹⁰CD19 с самой низкой функциональной концентрацией CD3 \times CD20 ViTE (0,1 нг/мл) на временную точку 48 ч. Полученные данные позволяют предположить, что комбинирование диакинов DK2¹⁰egfr или DK2¹⁰CD19 с ViTE, CD3 \times CD19 или CD3 \times CD20, соответственно, резко улучшает профиль безопасности (т.е. снижает индукцию воспалительных цитокинов или усиливает цитолитическую функцию (см. фиг. 11A-D и 12A-12D)).

[0123] Дополнительный диакин, содержащий IL-7 и IL-10 (DK7¹⁰) или IL12 и IL-10 (DK12¹⁰) в комбинации с ViTE, также оценивали с использованием того же анализа, описанного выше. См. фиг. 13 и 14. Полученные данные позволяют предположить, что комбинирование диакинов разных вариантов в сочетании с ViTE эффективно усиливает цитолитическую функцию.

Пример 4: лечение опухоли диакином в комбинации с ViTE

[0124] В этом способе лечения рака субъекту вводят эффективное количество диакина в форме DK2¹⁰, который способен направлять как IL-10, так и IL-2 в гематологическую опухоль или микроокружение опухоли, которая сверхэкспрессирует

ТАА, за 1-3 суток до введения ViTE. Затем, используя стандартные протоколы, связанные с введением ViTE, дикаин одновременно вводят пациенту, нуждающемуся в этом, вместе с ViTE.

[0125] В данном письменном описании используются примеры для раскрытия аспектов настоящего изобретения, включая предпочтительные варианты осуществления, а также для предоставления возможности любому специалисту в данной области техники применять на практике его аспекты, включая создание и применение любых устройств или систем и выполнение любых включенных способов. Патентоспособный объем этих аспектов определяется формулой изобретения и может включать другие примеры, которые очевидны для специалистов в данной области. Предполагается, что такие другие примеры входят в объем формулы изобретения, если они имеют структурные элементы, которые не отличаются от буквального языка формулы изобретения, или если они включают эквивалентные структурные элементы с несущественными отличиями от буквального языка формулы изобретения. Аспекты из различных описанных вариантов осуществления, а также другие известные эквиваленты для каждого такого аспекта могут быть смешаны и совмещены специалистами в данной области техники для создания дополнительных вариантов осуществления и способов 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*.

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*.

Berman R. (1996). Systemic administration of cellular IL-10 induces an effective specific and long lived immune response against established tumors in mice. *Journal of Immunology*.

Bianca Santomaso. (2019). The Other Side of CAR T-Cell Therapy: Cytokine Release Syndrome, Neurologic Toxicity, and Financial Burden. *ASCO Publications*.

Bonifant C. L. (2016). Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular Therapy*.

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*.

Castellarin M. (2018). Driving cars to the clinic for solid tumors. *Gene Therapy*.

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*.

Christopher DeRenzo. (2019). *Genetic Modification Strategies to Enhance CART Cell Persistence for Patients With Solid Tumors*.

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

Emmerich J. (2012). IL-10 Directly Activates and Expands Tumor-Resident CD8 β 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.

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 E $_2$. *PNAS*.

Hart P. H. (1991). IL-4 suppresses IL-1, TNF- α and PGE $_2$ production by human peritoneal macrophages. *Immunology*.

Jafarzadeh L. (2020). Prolonged Persistence of Chimeric Antigen Receptor CAR T Cell in Adoptive Cancer Immunotherapy Challenges and Ways Forward. *Frontiers in Immunology*.

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*.

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*.

Ma S. (2019). Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. *International Journal of Biological Sciences*.

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.

McCauley S. (2018). Pegilodecakin, a Pegylated Human IL-10 (AM0010), Enhances the Cytotoxicity of CAR-T Cells in Vitro and In Vivo. *Blood* (p. 703). American Society of Hematology.

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*.

Moore K. W. (2001). Interleukin 10 and the Interleukin 10 Receptor. *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. (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*.

Rodriguez-Garcia A. (2020). CART Cells Hit the Tumor Microenvironment Strategies to Overcome Tumor Escape. *Frontiers in Immunology*.

Ross S. H. (2018). Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annual Review Immunology*.

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

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*.

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

Smith N. R. (2010). Vascular Endothelial Growth Factor Receptors VEGFR2 and VEGFR-3 Are Localized Primarily to the Vasculature in Human Primary Solid Cancers. *Human Cancer Biology*.

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*.

Tang A. (2018). The challenges and molecular approaches surrounding interleukin-2-based therapeutics in cancer. *Cytokine*.

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

Wagner J. (2020). CAR T Cell Therapy for Solid Tumors: Bright Future or Dark Reality? *Molecular Therapy*.

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*.

Zou F. (2019). Engineered triple inhibitory receptor resistance improves anti-tumor CAR-T cell performance via CD56. *Nature Communications*.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения пациента с раком и/или опухолью, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества нацеленного диакина и генетически модифицированной иммунной клетки, экспрессирующей Т-клеточный химерный антигенный рецептор (CAR):

где нацеленный диакин содержит IL10, IL2 и первый одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) со специфичностью к первому опухолеассоциированному антигену (ТАА), где ТАА выбран из CD3, CD4, CD5, CD7, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, антигена созревания В-клеток (BCMA), лектиноподобной молекулы-1 С-типа (CLL01), латентного мембранного белка 1 (LMP-1), сигнальной молекулы активации лимфоцитов F7 (SLAMF7), NY-ESO-1, трансмембранного активатора и интерактора CAML (TACI), CS-1, CXCR4, NKG2D, B7-H3, EGFR, PD-1, PDL-1, HER2, HER3, EPCAM, мезотелин, PSCA, MUC1, Lewis-Y, GPC3, AXL, клаудина18.2, GD2, CTLA-4, CEA, PDGFR, VEGFR2, мезотелина (MESO), PSCA, PSA,

и где CAR-T-клетка содержит второй scFv, обладающий специфичностью ко второму и другому ТАА.

2. Способ по п.1, где рак представляет собой гематологический рак.

3. Способ по п.2, где гематологический рак представляет собой лимфому или лейкоз.

4. Способ по п.2, где гематологический рак представляет собой В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз (В-ALL), множественную миелому (ММ), В-клеточную лимфому, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз или неходжкинскую лимфому.

5. Способ по п.1, где рак представляет собой солидный рак или опухоль.

6. Способ по п.5, где солидный рак представляет собой нейробластому, мелкоклеточный рак легкого, меланому, рак яичников, почечно-клеточную карциному, рак толстого кишечника, рак легких, меланому, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак толстого кишечника, почечно-клеточную карциному, рак яичников, нейробластому, рабдомиосаркому, лейкоз и лимфому.

7. Способ по п.1, где IL-10 представляет собой IL-10 человека, EBV IL-10 или CMV IL-10 или их мутеины, или их варианты, и где IL-2 представляет собой IL-2 дикого типа или его вариант, или его мутеин.

8. Способ по п.1, где диакин содержит IL10 с SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 7.

9. Способ по п.1, где диакин и CAR-T-клетку вводят пациенту в разное время.

10. Способ по п.1, где CAR-T-клетку размораживают и/или выдерживают в состоянии покоя в присутствии количества диакина до введения пациенту.

11. Способ по п.11, где диакин вводят пациенту за 1-3 суток до введения CAR-T-клетки.

12. Способ по п.11, где диакин и CAR-T-клетку вводят пациенту одновременно.

13. Способ по п.11, где диакин вводят пациенту за 1-3 суток до введения CAR-T-клетки, и затем повторно вводят диакин пациенту через 1-3 суток после введения CAR-T-клетки.

14. Способ по п.1, где диакин вводят в диапазоне доз от 0,01 до 0,2 мг/кг.

15. Способ по п.1, где диакин вводят в дозе, обеспечивающей концентрацию в сыворотке или плазме примерно от 0,0001 до 200 нг/мл.

16. Способ по п.1, где диакин вводят подкожно или внутривенно.

17. Способ по п.1, где генетически модифицированная клетка представляет собой иммунную клетку.

18. Способ по п.1, где генетически модифицированная клетка представляет собой CD8+, CD4+ или их комбинацию.

19. Способ праймирования CAR-T-клетки, включающий приведение CAR-T-клетки в контакт в присутствии от 0,01 до 200 нг/мл диакина.

20. Способ по п.19, где CAR-T-клетки включают как CD8+, так и CD4+ Т-клетки.

21. Способ по п.19, где CAR-T праймируют в присутствии диакина в течение 1-2 суток до введения пациенту, нуждающемуся в этом.

22. Способ лечения пациента с раком и/или опухолью, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества нацеленного диакина и биспецифического активатора Т-клеток (BiTE), где диакин:

где нацеленный диакин содержит IL-10, IL-2, и первый одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) со специфичностью к первому опухолеассоциированному антигену (ТАА), где ТАА выбран из CD4, CD5, CD7, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, антигена созревания В-клеток (BCMA), лектиноподобной молекулы-1 С-типа (CLL01), латентного мембранного белка 1 (LMP-1), сигнальной молекулы активации лимфоцитов F7 (SLAMF7), NY-ESO-1, трансмембранного активатора и интерактора CAML (TACI), CS-1, CXCR4, NKG2D, B7-H3, EGFR, PD-1, PDL-1, HER2, HER3, EpCAM, мезотелина, PSCA, MUC1, Lewis-Y, GPC3, AXL, клаудина18.2, GD2, CTLA-4, CEA, PDGFR, VEGFR2, мезотелина (MESO), PSCA или PSA,

и

где BiTE имеет, по меньшей мере, первую антигенсвязывающую специфичность в отношении CD3 и вторую антигенсвязывающую специфичность в отношении ТАА, которая отличается от специфичности связывания ТАА scFv диакина.

23. Способ по п.24, где рак представляет собой гематологический рак.

24. Способ по п.25, где гематологический рак представляет собой лимфому или лейкоз.

25. Способ по п.25, где гематологический рак представляет собой В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз (В-ALL), множественную миелому (ММ), В-клеточную лимфому, хронический лимфоцитарный лейкоз (СLL), Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз или неходжкинскую лимфому.

26. Способ по п.24, где рак представляет собой солидный рак или опухоль.

27. Способ по п.28, где солидный рак представляет собой нейробластому, мелкоклеточный рак легкого, меланому, рак яичников, почечно-клеточную карциному, рак толстого кишечника, рак легких, меланому, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак толстого кишечника, почечно-клеточную карциному, рак яичников, нейробластому, рабдомиосаркому, лейкоз и лимфому.

28. Способ по п.24, где IL-10 представляет собой IL-10 человека, EBV IL-10 или CMV IL-10 или их варианты, и/или мутеины.

29. Способ по п.24, где диакин содержит IL-10 с SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 7.

30. Способ по п.24, где IL-2 является человеческим.

31. Способ по п.32, где IL-2 представляет собой IL-2 дикого типа или его вариант, или его мутеин.

32. Способ по п.24, где диакин и ViTE вводят пациенту в разное время.

33. Способ по п.34, где диакин вводят пациенту за 1-3 суток до введения ViTE.

34. Способ по п.34, где диакин и ViTE вводят пациенту одновременно.

35. Способ по п.34, где диакин вводят пациенту за 1-3 суток до введения ViTE, и затем пациенту повторно вводят диакин через 1-3 суток после введения ViTE.

36. Способ по п.24, где диакин вводят в диапазоне доз от 0,001 до 200 мг/кг.

37. Способ по п.24, где диакин вводят в дозе, обеспечивающей концентрацию в сыворотке или плазме примерно от 0,0001 до 200 нг/мл.

38. Способ по п.24, где диакин вводят подкожно или внутривенно.

39. Способ лечения опухоли у пациента, включающий введение слитого белка на основе двух цитокинов формулы (I):

$\text{NH}_2\text{-(IL10)-(X}^1\text{)-(Zn)-(X}^2\text{)-(IL10)-COOH}$ (формула I);

где:

«IL-10» представляет собой мономерную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 9, 10, 11, 12, 14 или 16;

«X¹» представляет собой VL- или VH-область, полученную из первого моноклонального антитела;

«X²» представляет собой VL- или VH-область, полученную из первого моноклонального антитела;

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

«Z» представляет собой цитокин, отличный от IL-10;

«n» представляет собой целое число, выбранное из 0-2; и

рекомбинантно сконструированные CAR-T- или TCR-T-клетки, специфичные к антигену, экспрессированному при раке или опухоли.

40. Способ по п.42, где X¹ и X² получают из первого моноклонального антитела, специфичного к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различным мишеням иммунных контрольных точек, таким как, не ограничиваясь этим,

PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 or CTLA4; CD19, CD20, CD22; CD47;GD-2; VEGFR1, VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; рецепторной ловушке TGF β ; MAdCAM, β 7 субъединице интегрин; α 4 β 7 интегрину; α 4 интегрину 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 к вирусу Эбола.

41. Способ по п.42, где VL и VH получают из первого моноклонального антитела, которое представляет собой антитело против ВИЧ или антитело против вируса Эбола.

42. Способ по п.44, где VL и VH моноклонального антитела против ВИЧ или против вируса Эбола представляют собой каркасную область, на которую можно привить 6 CDR из второго антитела.

43. Способ по п.45, где второе антитело представляет собой моноклональное антитело, выбранное из антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различным мишеням иммунных контрольных точек, таким как, помимо прочего, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 or 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, β 7 субъединице интегрин; α 4 β 7 интегрину; α 4 интегрину 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.

44. Способ по п.46, где 6 привитых CDR из второго моноклонального антитела содержат 6 CDR из анти-EGFR антитела, анти-HER2 антитела, анти-VEGFR1 антитела или анти-VEGFR2 антитела, где 6 CDR включают CDR 1-3 из VL и CDR 1-3 из VH.

45. Способ по п.42, 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-17, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, TSLP, интерферона- α , - β , - γ , TGF- β или факторов некроза опухоли - α , - β , основного FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11 или IL-13.

46. Способ по п.42, где Z представляет собой IL-2.

47. Способ по п.42, где Z представляет собой целое число, равное 1.

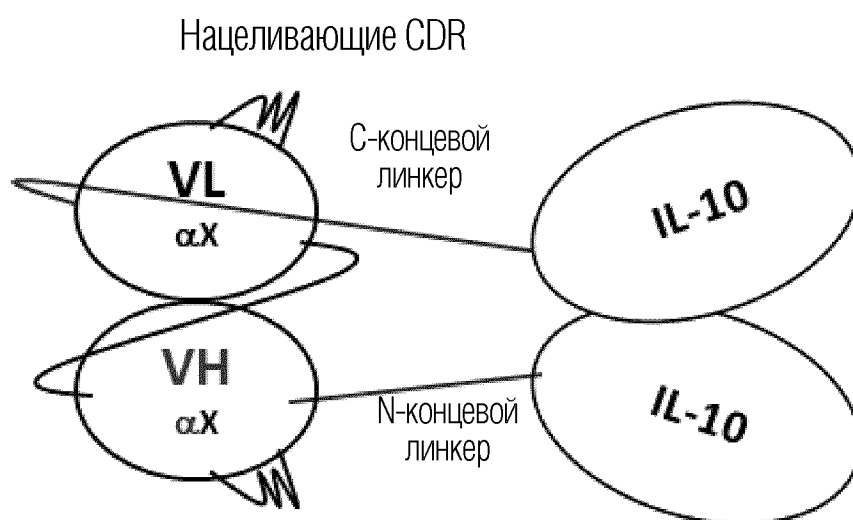
48. Способ по п.42, где слитый белок на основе двух цитокинов дополнительно содержит линкеры.

49. Способ по п.42, где IL-10 представляет собой DV07 с SEQ ID NO: 10.

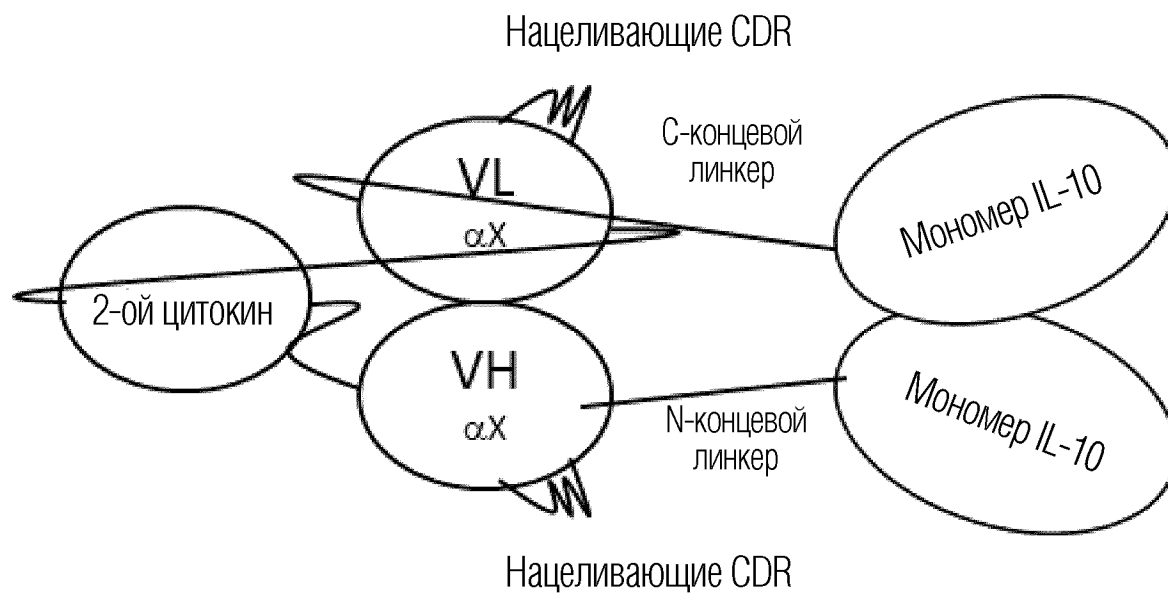
50. Способ по п.42, где VL- или VH-области получены из первого антитела, которое представляет собой человеческое антитело против вируса Эбола; на VL- или VH-области привиты 6 CDR анти-VEGFR2 антитела; и Z представляет IL-2.

51. Способ по п.42, где рекомбинантно сконструированная CAR-T содержит EARD, специфичный для EGFR, VEGFR1, VEGFR2, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, ErbB2, 3 или 4, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CEA и поверхностного антигена вируса гепатита В, антифолатного рецептора, карциноэмбрионального антигена (CEA), простат-специфического антигена (PSA), PSMA, Her2/neu, рецептора эстрогена, рецептора прогестерона, эфринаB2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2 и MAGE A3, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, ROR1, tEGFR, MUC1, MUC16, PSCA, лигандов NKG2D, NY-ESO-1,

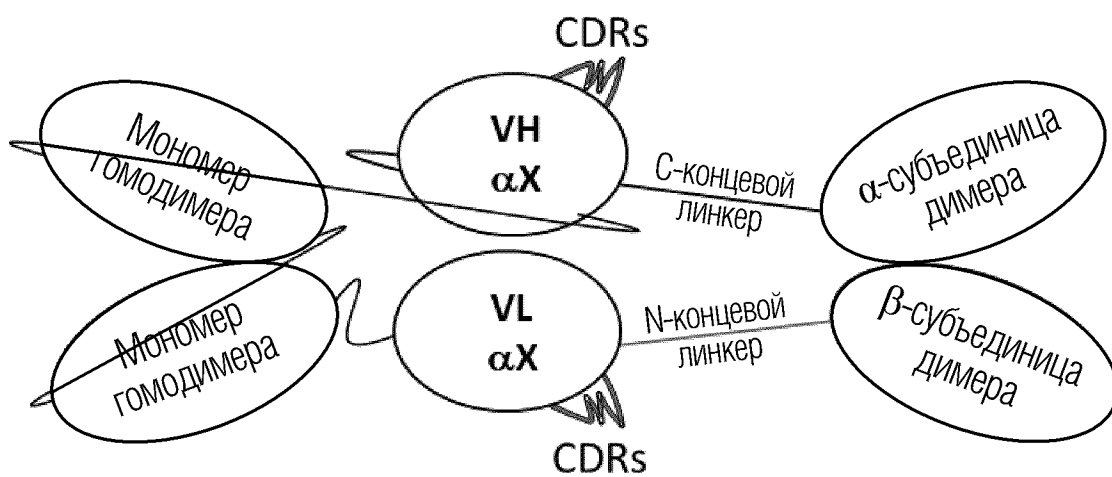
MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, FBP, фетального рецептора ацетихолина е, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdг, легкой цепи каппа, Lewis Y, молекулы клеточной адгезии L1, мезотелина MAGE-AL, CE7, опухоли Вильмса 1 (WT-1) или циклина.



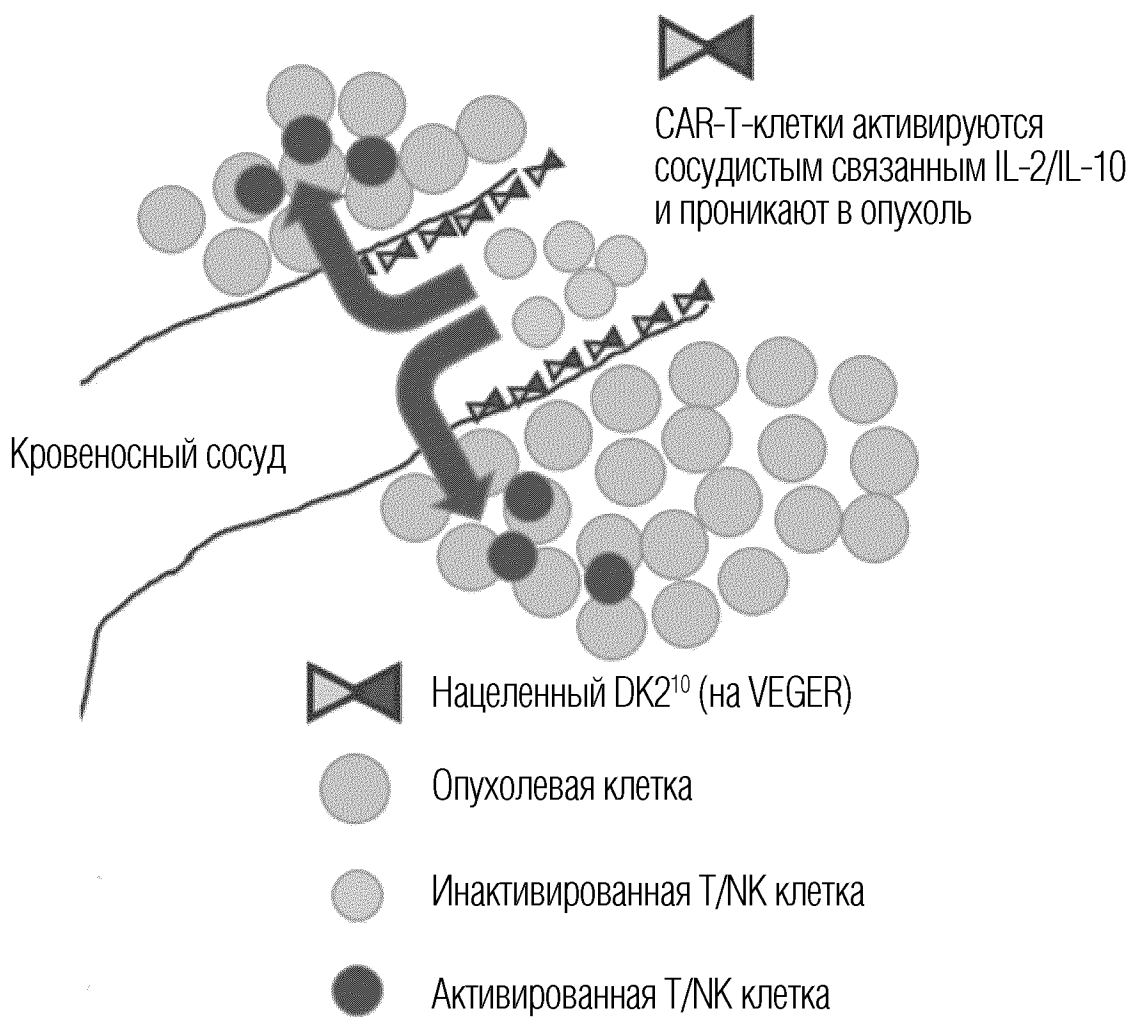
ФИГ. 1



ФИГ. 2

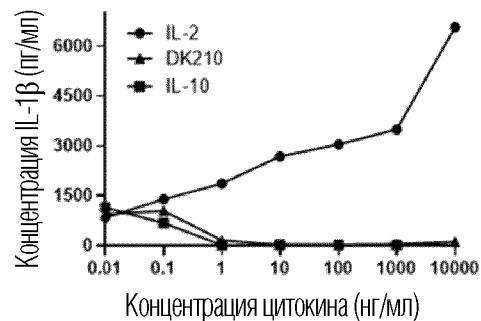


ФИГ. 3

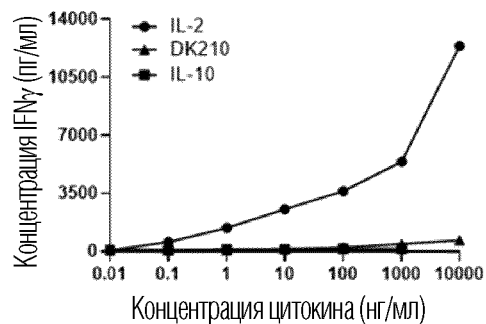


ФИГ. 4

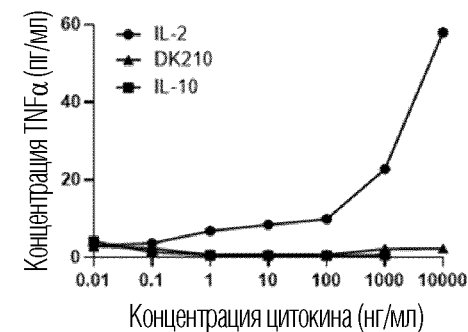
ФИГ. 5А



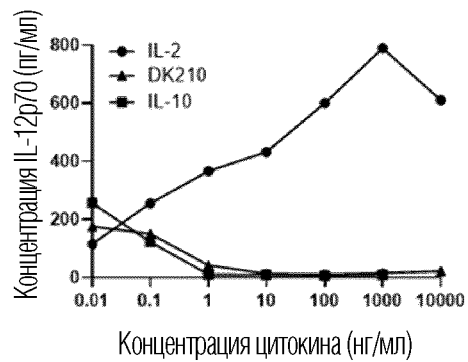
ФИГ. 5В



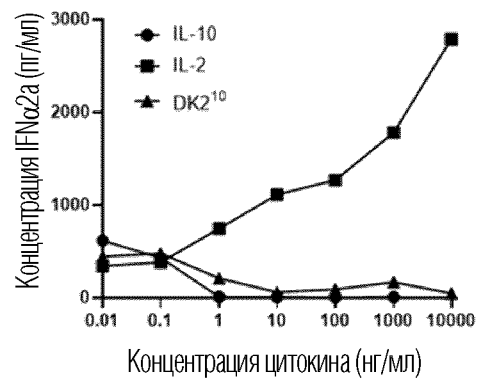
ФИГ. 5С



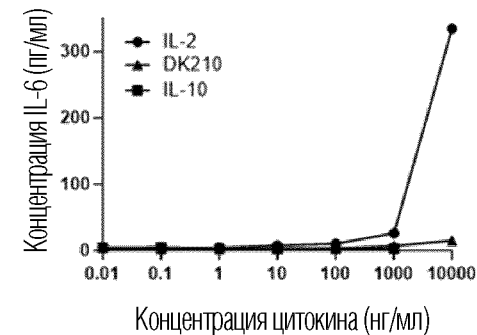
ФИГ. 5D



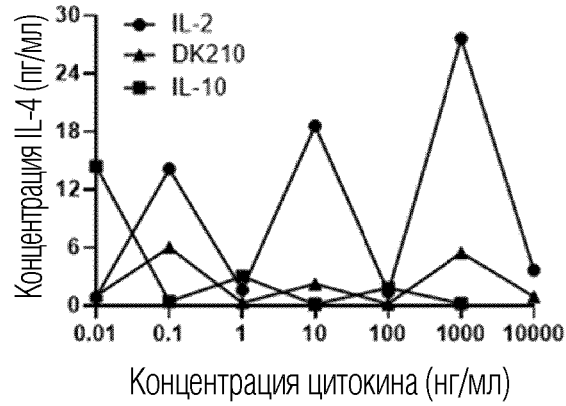
ФИГ. 5Е



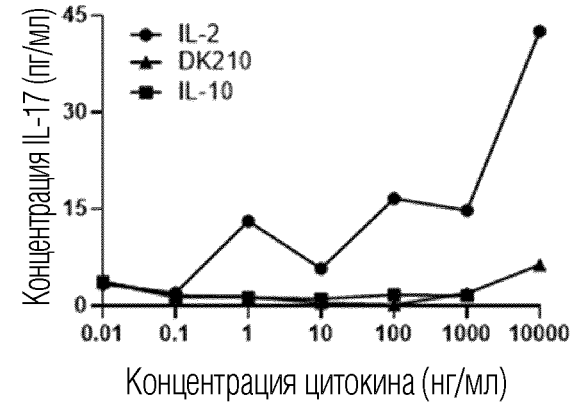
ФИГ. 5F



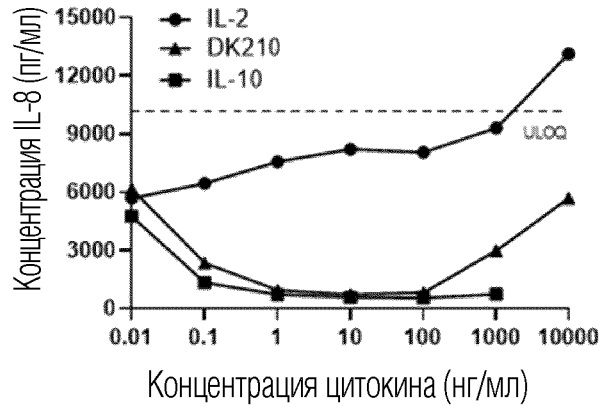
ФИГ. 6А



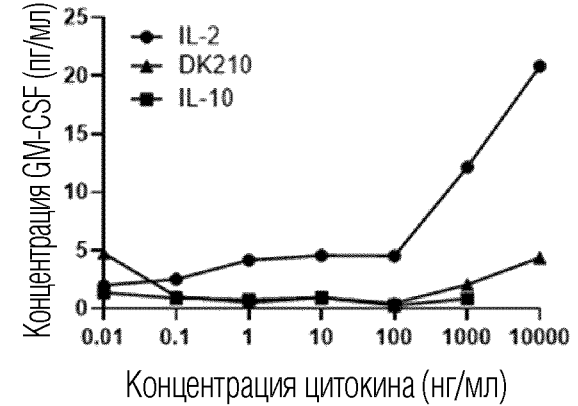
ФИГ. 6В



ФИГ. 6С



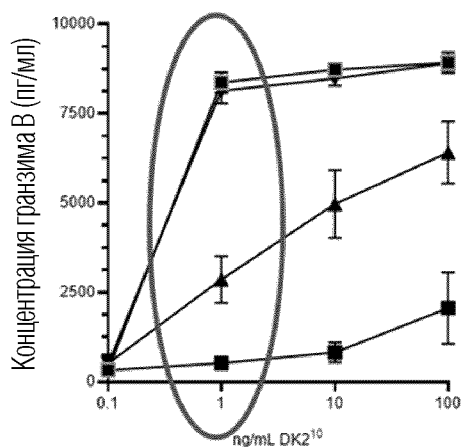
ФИГ. 6D



ФИГ. 7

24 ч

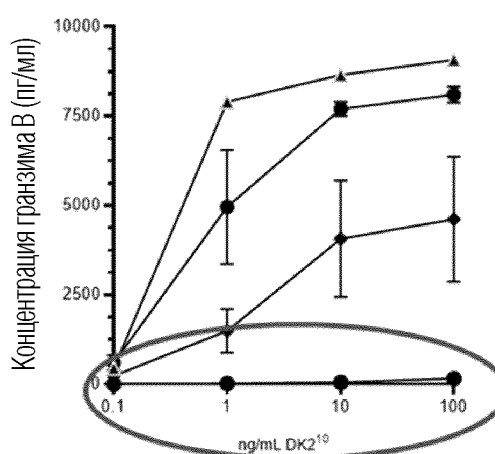
Комбинированный CD8 DK210-ВИТЕ-ГРАНЗИМ В



- 24 ч DK210 72 ч анти-CD3
- ▼ 24 ч DK210 + 48 ч анти-CD3
- ▲ 24 ч DK210 + 20 ч анти-CD3
- 24 ч DK210 + 4 ч анти-CD3

48 ч

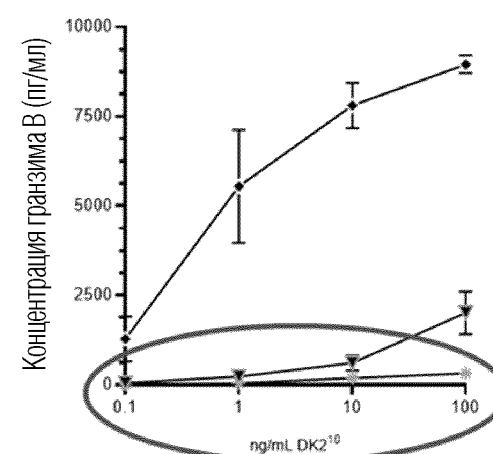
Комбинированный CD8 DK210-ВИТЕ-ГРАНЗИМ В



- ▲ 48 ч DK210 48 ч анти-CD3
- 48 ч DK210 + 20 ч анти-CD3
- ◆ 48 ч DK210 + 4 ч анти-CD3
- 48 ч DK210 без анти-CD3

72 ч

Комбинированный CD8 DK210-ВИТЕ-ГРАНЗИМ В

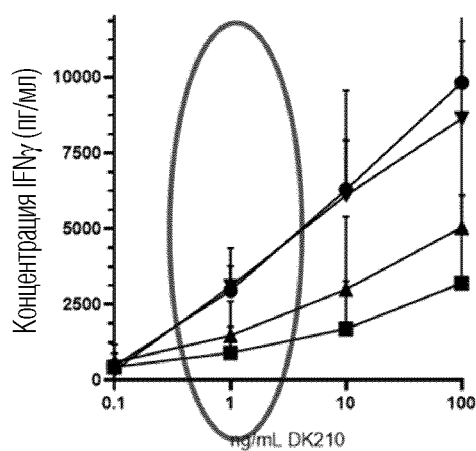


- ◆ 72 ч DK210 24 ч анти-CD3
- ▼ 72 ч DK210 4 ч анти-CD3
- * 72 ч DK210 без анти-CD3

ФИГ. 8

24 ч

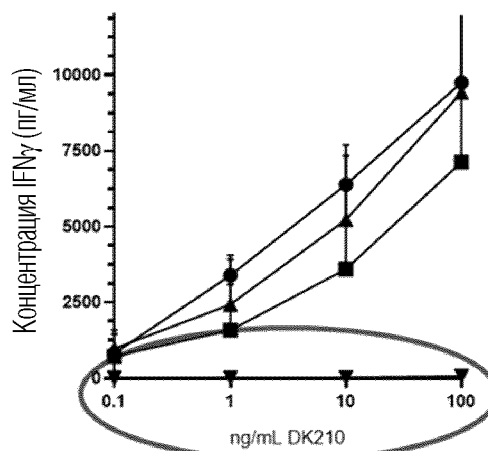
Комбинированный CD8 24 ч DK210-BITE-IFN γ



- 24 ч DK210 + 4 ч анти-CD3
- ▲ 24 ч DK210 + 20 ч анти-CD3
- 24 ч DK210 + 48 ч анти-CD3
- ▼ 24 ч DK210 72 ч анти-CD3

48 ч

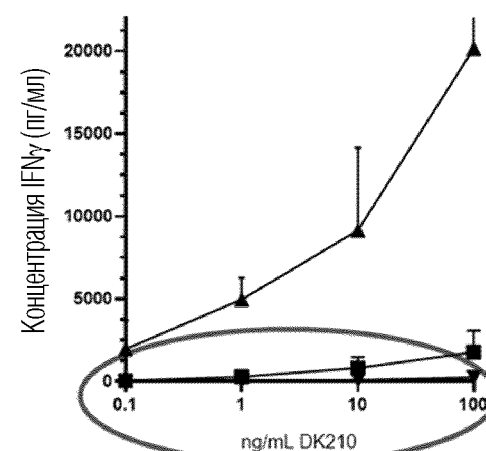
Комбинированный CD8 48 ч DK210-BITE-IFN γ



- 48 ч DK210 + 4 ч анти-CD3
- ▲ 48 ч DK210 + 20 ч анти-CD3
- 48 ч DK210 48 ч анти-CD3
- ▼ 48 ч DK210 без анти-CD3

72 ч

Комбинированный CD8 72 ч DK210-BITE-IFN γ

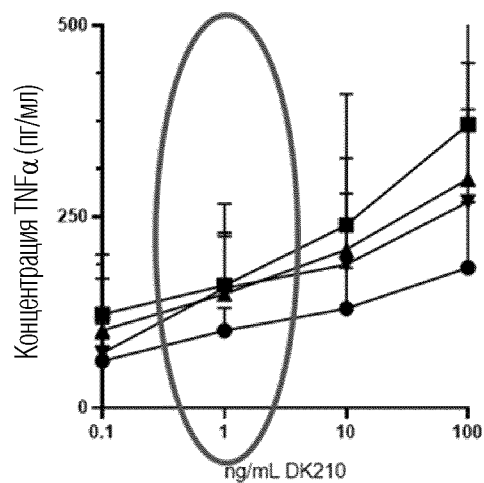


- ▲ 72 ч DK210 24 ч анти-CD3
- 72 ч DK210 4 ч анти-CD3
- ▼ 72 ч DK210 без анти-CD3

ФИГ. 9

24 ч

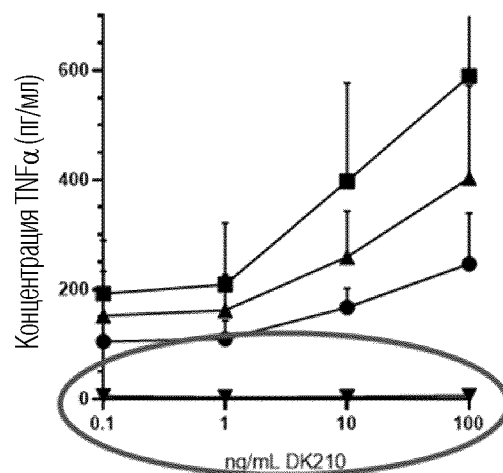
Комбинированный CD8 24 ч DK210-BITE-TNF α



- 24 ч DK210 + 4 ч анти-CD3
- ▲ 24 ч DK210 + 20 ч анти-CD3
- ▼ 24 ч DK210 + 48 ч анти-CD3
- 24 ч DK210 72 ч анти-CD3

48 ч

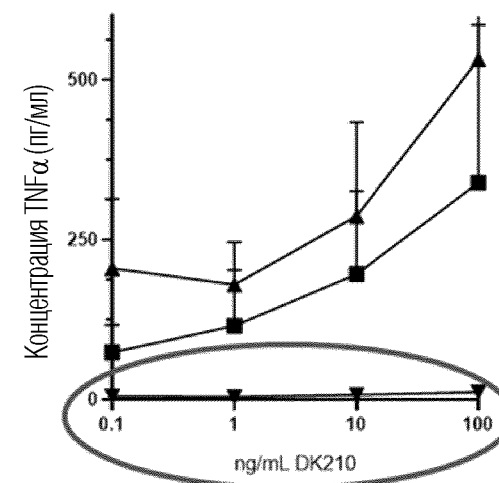
Комбинированный CD8 48 ч DK210-BITE-TNF α



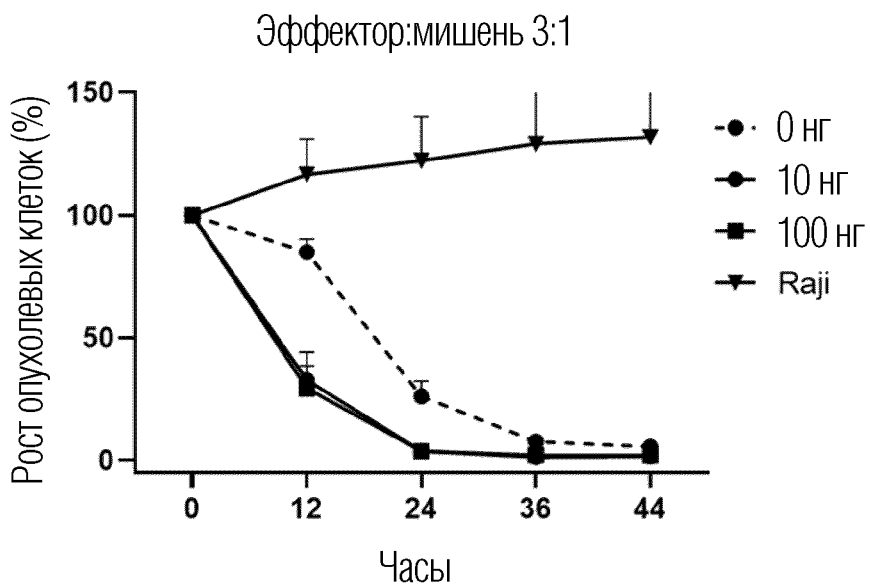
- 48 ч DK210 + 4 ч анти-CD3
- ▲ 48 ч DK210 + 20 ч анти-CD3
- 48 ч DK210 48 ч анти-CD3
- ▼ 48 ч DK210 без анти-CD3

72 ч

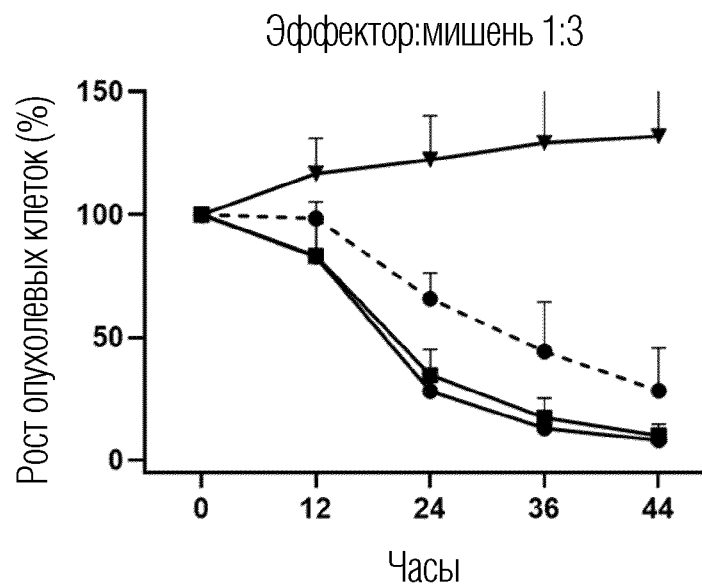
Комбинированный CD8 72 ч DK210-BITE-TNF α



- 72 ч DK210 4 ч анти-CD3
- ▲ 72 ч DK210 24 ч анти-CD3
- ▼ 72 ч DK210 без анти-CD3



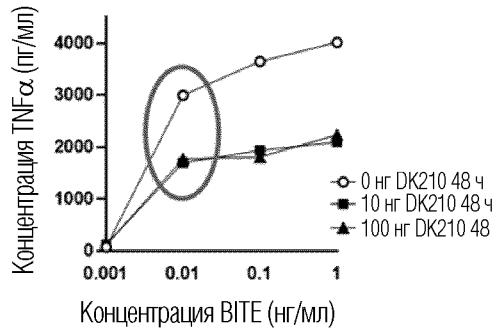
ФИГ. 10А



ФИГ. 10В

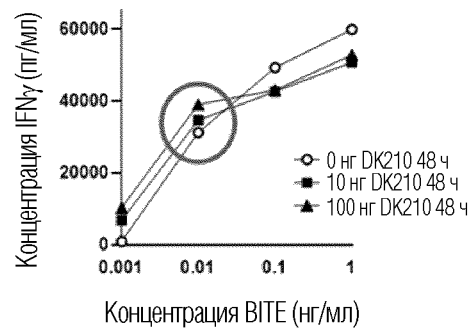
ФИГ. 11А

Ответ $TNF\alpha$ на $DK2^{10}$ (EGFR) в присутствии ВІТЕ на 48 ч



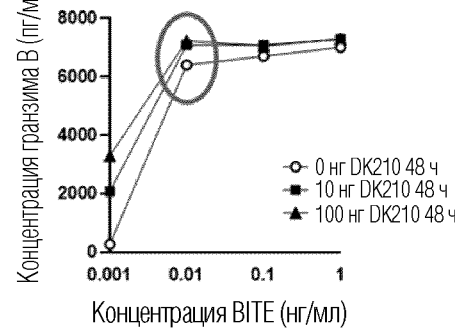
ФИГ. 11В

Ответ $IFN\gamma$ на $DK2^{10}$ (EGFR) в присутствии ВІТЕ на 48 ч



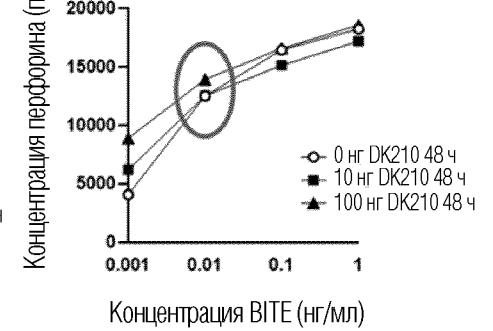
ФИГ. 11С

Ответ гранзима В на $DK2^{10}$ (EGFR) в присутствии ВІТЕ на 48 ч

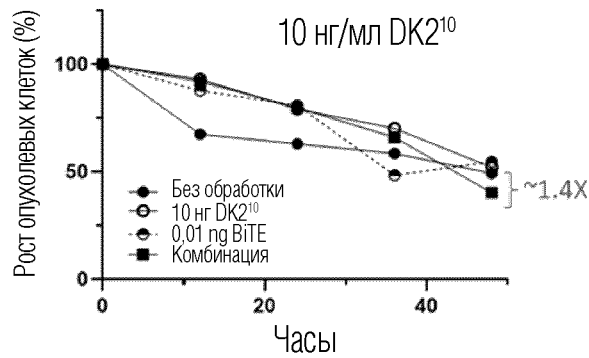


ФИГ. 11D

Ответ перфорина на $DK2^{10}$ (EGFR) в присутствии ВІТЕ на 48 ч

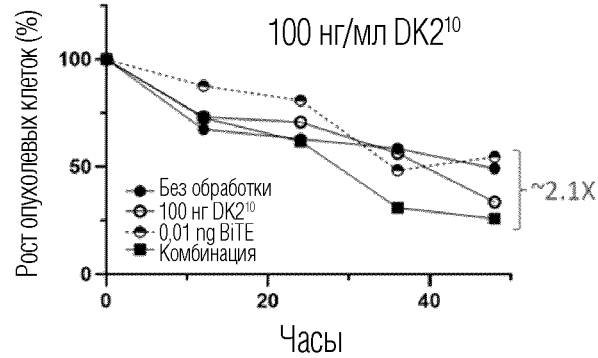


Цитотоксичность $DK2^{10}$ EGFR и CD19 ВІТЕ



ФИГ. 11Е

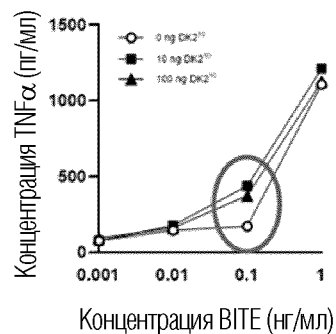
Цитотоксичность $DK2^{10}$ EGFR и CD19 ВІТЕ



ФИГ. 11F

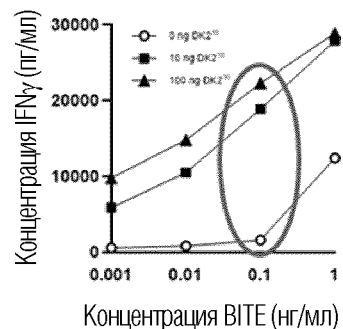
ФИГ. 12А

Ответ $TNF\alpha$ на $DK2^{10}$ (CD19v3) в присутствии ВІТЕ на 48 ч



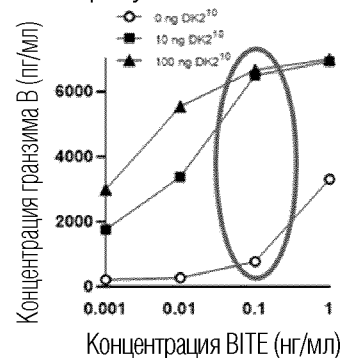
ФИГ. 12В

Ответ $IFN\gamma$ на $DK2^{10}$ (CD19v3) в присутствии ВІТЕ на 48 ч



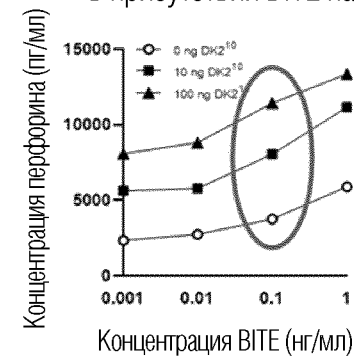
ФИГ. 12С

Ответ гранзима В на $DK2^{10}$ (CD19v3) в присутствии ВІТЕ на 48 ч

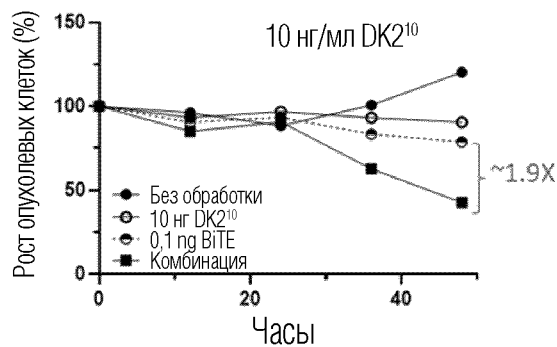


ФИГ. 12D

Ответ перфорина на $DK2^{10}$ (CD19v3) в присутствии ВІТЕ на 48 ч

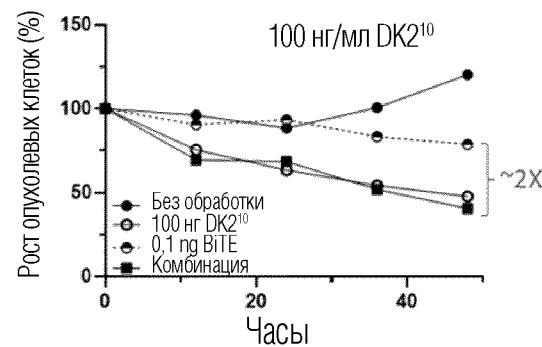


Цитотоксичность $DK2^{10}$ CD19v3 и CD20 ВІТЕ

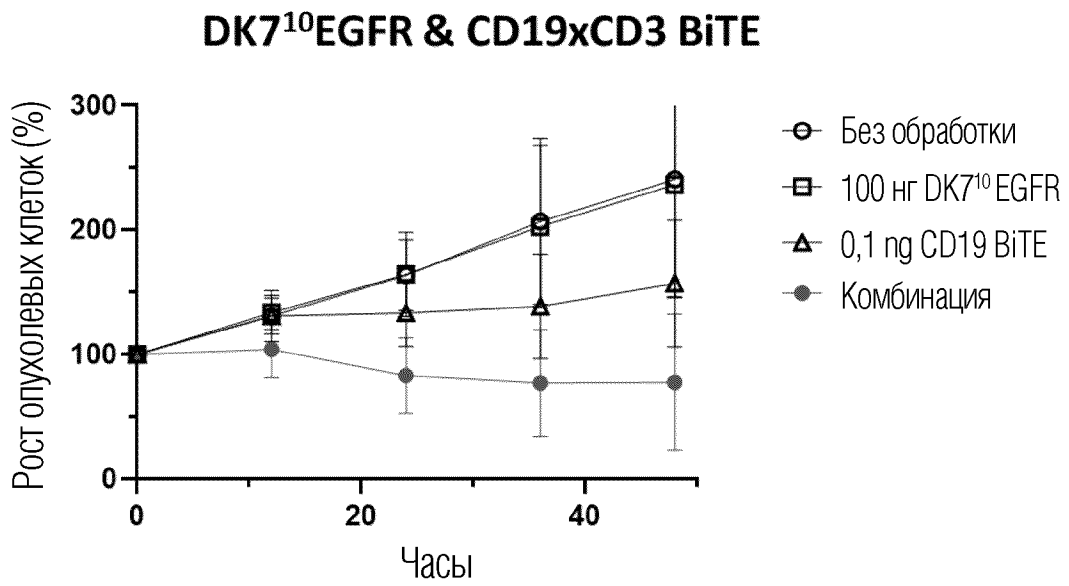


ФИГ. 12Е

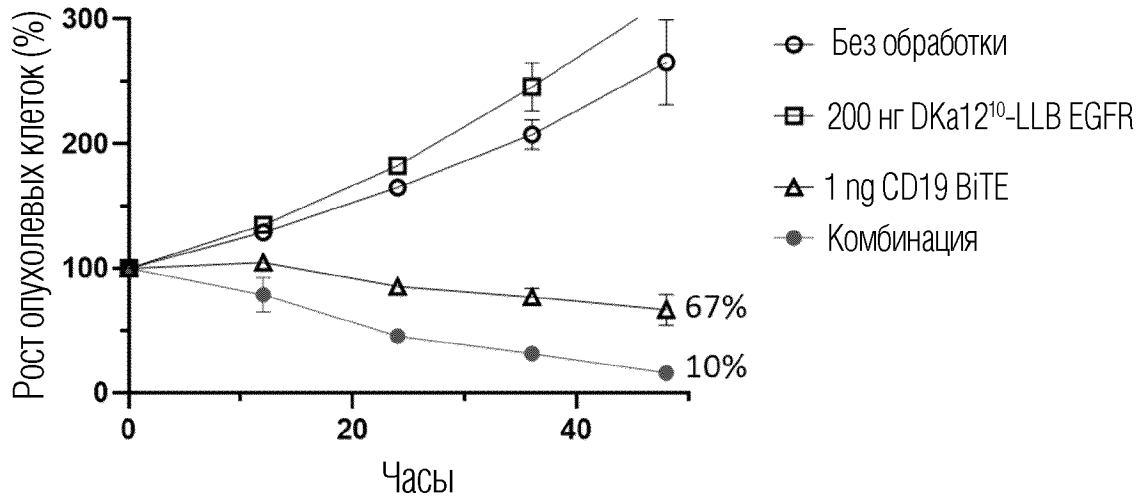
Цитотоксичность $DK2^{10}$ CD19v3 и CD20 ВІТЕ



ФИГ. 12F



ФИГ. 13

DK12¹⁰ EGFR и CD19 BiTE

ФИГ. 14