

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202492176 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.11.01

(22) Дата подачи заявки  
2023.02.22

(51) Int. Cl. *A61K 38/20* (2006.01)  
*A61K 31/713* (2006.01)  
*A61P 37/02* (2006.01)  
*A61K 35/12* (2015.01)  
*A61K 35/17* (2015.01)

(54) СПОСОБ СНИЖЕНИЯ СИНДРОМА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЦИТОКИНОВ,  
ОПОСРЕДОВАННОГО БИСПЕЦИФИЧЕСКИМ АКТИВАТОРОМ Т-КЛЕТОК  
ИЛИ ХИМЕРНЫМ АНТИГЕННЫМ РЕЦЕПТОРОМ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ИНТЕРЛЕЙКИНОВ

(31) 63/312,697  
(32) 2022.02.22  
(33) US  
(86) PCT/US2023/063062  
(87) WO 2023/164503 2023.08.31  
(88) 2023.10.12

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

(57) Настоящее изобретение относится к различным способам, включая способ снижения тяжести синдрома высвобождения цитокинов (CRS), индуцированного биспецифическим активатором Т-клеток (BiTE) или химерным антигенным рецептором Т-клеток (CAR-T), включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, определенного количества композиции, содержащей интерлейкин-10 (IL-10) или агент IL-10, интерлейкин-4 (IL-4) или агент IL-4 или их комбинации.

202492176  
A1

202492176  
A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581992EA/032

### **СПОСОБ СНИЖЕНИЯ СИНДРОМА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЦИТОКИНОВ, ОПОСРЕДОВАННОГО БИСПЕЦИФИЧЕСКИМ АКТИВАТОРОМ Т-КЛЕТОК ИЛИ ХИМЕРНЫМ АНТИГЕННЫМ РЕЦЕПТОРОМ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ**

#### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

[001] Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 63/312697, поданной 22 февраля 2022 г., раскрытие которой во всей своей полноте включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### **Ссылка на электронный список последовательностей**

[002] Содержание электронного списка последовательностей (039451-00100-Sequence-Listing.xml; размер: 37997 байт; и дата создания: 22 февраля 2023 г.) включено во всей своей полноте в настоящий документ посредством ссылки.

#### **Уровень техники**

[003] Синдром высвобождения цитокинов (CRS) представляет собой токсическую реакцию, связанную с дозой и лечением, возникающую в результате активации Т-клеток за счет биспецифического активатора Т-клеток (BiTE) (Hosseini, 2020) и применения химерных антигенных рецепторов Т-клеток (CAR-T) пациентам (Maude, 2014; Norelli, 2018). CRS определяется неконтролируемой индукцией высоких уровней преимущественно интерлейкина-6 (IL-6) и интерлейкина-1 бета (IL-1 $\beta$ ) (Liu, 2018), фактора некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ) (Chen, 2021) и интерферона гамма (IFN $\gamma$ ) (Shimabukuro-Vornhagen, 2018) в сыворотке крови подвергшихся лечению пациентов.

[004] На сегодняшний день молекулярный путь, ответственный за индукцию CRS, остается неизвестным. На основе результатов авторов изобретения было установлено, что индукция CRS у пациентов, получавших BiTE и CAR-T терапию, вероятно, обусловлена активацией CD4<sup>+</sup> Т-клеток, опосредованной кластеризацией Т-клеточных рецепторов (TCR):BiTE или CAR-T:опухоль-ассоциированный антиген (TAA). Такая активация, в свою очередь, приводит к секреции IL-2 (Brandl, 2007). Затем секреция IL-2 запускает секрецию моноцитами провоспалительных цитокинов, ассоциированных с CRS (Bosco, 2000; Musso, 1992; Stricter, 1989).

#### **Сущность изобретения**

[005] Авторы изобретения обнаружили, что обработка моноцитов IL-10 или IL-4, IL-12, IL-15, IL-7 или любой комбинацией вышеперечисленного, или любым их вариантом с пролонгированным периодом полувыведения, или любым диацином, содержащим IL-10, IL-4, IL-12, IL-15, IL-7 или IL-2, который будет взаимодействовать с родственными рецепторами цитокинов на моноцитах и напрямую ингибировать индукцию провоспалительных цитокинов под действием IL-2.

[006] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу обработки моноцита либо IL-10, либо IL-4, IL-12, IL-15, IL-7, их вариантами с пролонгированным

периодом полувыведения, комбинацией IL-10 и IL-4, IL-10 и IL-2, IL-10 и IL-7, IL-10 и IL-12, IL-10 и IL-15, либо слитым белком или диакином, содержащим, по меньшей мере, два цитокина, где, по меньшей мере, один из двух цитокинов представляет собой IL-10 или IL-4, IL-12, IL-15 или IL-7, для снижения CRS, ассоциированного с лекарственными препаратами на основе ViTE или CAR-T. В одном варианте осуществления моноциты обрабатывают IL-10 или IL-4, IL-12, IL-15, IL-7 или их вариантом с пролонгированным периодом полувыведения, или диакином, содержащим, по меньшей мере, один из двух цитокинов IL-10 или IL-4, IL-12, IL-15 или IL-7. В еще одном варианте осуществления пациента будут лечить IL-10 или его вариантом с пролонгированным периодом полувыведения и ViTE или CAR-T. В еще одном варианте осуществления пациента будут лечить IL-4 или его вариантом с пролонгированным периодом полувыведения и ViTE или CAR-T. В еще одном варианте осуществления пациента лечат диакином, содержащим IL-10 и любой из IFN- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 или IL-27 в количестве, достаточном для снижения CRS. В еще одном варианте осуществления пациента лечат диакином, содержащим IL-4 и любой из IFN- $\alpha$ , IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21 или IL-27 в количестве, достаточном для снижения CRS.

[007] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу снижения CRS, ассоциированного с ViTE или CAR-T, включающему введение субъекту лекарственного препарата на основе ViTE или CAR-T в комбинации с IL-10, IL-4 или любой их комбинацией, или диакином, содержащим, по меньшей мере, один из IL-10, IL-4, IL-2. В одном варианте осуществления способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, лекарственных препаратов на основе ViTE или CAR-T до, после или одновременно с введением IL-10 или IL-4, IL-12, IL-15 или IL-7 или их вариантов с пролонгированным периодом полувыведения, или диакина, содержащего IL-10 или IL-4 в комбинации с IFN- $\alpha$ , IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 или IL-27.

[008] В еще одном аспекте изобретение относится к способу ингибирования индукции провоспалительных цитокинов у пациента, проходящего ViTE или CAR-T терапию, включающему введение пациенту, проходящему указанную терапию, дозы IL-10 или IL-4 или их вариантов с пролонгированным периодом полувыведения, или диакина, содержащего IL-10 или IL-4 в комбинации с IFN- $\alpha$ , IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 или IL-27 в количестве, достаточном для подавления CRS, вызванного провоспалительными цитокинами.

[009] Вышеуказанное упрощенное описание сущности репрезентативных аспектов служит для представления базового понимания настоящего раскрытия. Данное описание сущности изобретения не является подробным 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 единственной целью является представление одного или более аспектов в упрощенной форме в качестве водной части к более подробному описанию раскрытия, которое следует далее. Для достижения вышеизложенного один или более аспектов

настоящего изобретения включают признаки, описанные и приведенные в формуле изобретения.

#### **Краткое описание фигур**

[0010] На фиг. 1 приведены графики с результатами определения уровня IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ 2a, IL-12 и IL-6 в PBMC в ответ на повышение уровней обработки IL-2.

[0011] На фиг. 2 приведены графики с результатами определения уровней индукции IFN $\gamma$ , IL-6 и TNF $\alpha$  из PBMC в ответ на 1 мкг/мл анти-CD3 в присутствии диакина, IL-10 и IL-2.

[0012] На фиг. 3 приведены сывороточные цитокины мышей, полученные при обработке диакином *in vivo*.

[0013] На фиг. 4 приведены уровни цитокинов в сыворотке крови «нечеловеческих» приматов, полученные при обработке диакином *in vivo*.

[0014] На фиг. 5 приведены графики с результатами оценки цитотоксичности CD8<sup>+</sup> Т-клеток, подвергнутых обработке диакином и ViTE.

[0015] На фиг. 6 приведены графики с результатами определения уровней IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  в CD8<sup>+</sup> Т-клетках, подвергнутых обработке различными концентрациями ViTE.

[0016] На фиг. 7 представлено схематическое представление предлагаемого пути развития CRS, опосредованного IL-2, в ответ на ViTE или CAR-T терапию.

[0017] На фиг. 8 показано, что комбинирование диакина, содержащего IL-10 и IL-2, который нацелен на EGFR, в комбинации с CD3 $\times$ CD19 ViTE усиливает цитолиз опухолевых клеток, нацеленный CD8<sup>+</sup> Т-клетками.

[0018] На фиг. 9 показано, что комбинация диакина (DK2<sup>10</sup> EGFR) с CD3 $\times$ CD19 ViTE демонстрирует усиленные цитолитические эффекторные молекулы и контролируемый CRS.

[0019] На фиг. 10 приведены результаты внутриклеточного FACS-анализа обработки диакином (DK2<sup>10</sup> EGFR) и CD3 $\times$ CD19 ViTE культур PBMC, содержащих Raji<sup>GFP+</sup> опухолевые клетки.

#### **Подробное описание изобретения**

[0020] Иллюстративные аспекты описаны в настоящем документе в контексте использования IL-10, IL-4, IL-12, IL-15, IL-7 или их вариантов с пролонгированным периодом полувыведения, или диакина, содержащего, по меньшей мере, один из IL-10 или IL-4 в комбинации с IFN- $\alpha$ , IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 или IL-27, в способе подавления, ингибирования, снижения или предотвращения CRS, ассоциированного с лекарственными препаратами на основе ViTE или CAR-T. 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.

[0021] 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.

[0022] Если не указано иное, то в описанных здесь вариантах осуществления используются обычные методы и методики молекулярной биологии, биохимии, фармакологии, химии и иммунологии, которые хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., текущее дополнение). Многие из общих методов конструирования и получения диацинов были описаны ранее в публикации заявки на патент США № 20220017587. Она включает типы вариантов IL-10, включая, помимо прочего, человеческие, мышьиные, CMV и/или EBV формы IL-10, а также анализы для тестирования вариантов IL-10, диацинов, и другие известные методы анализа.

[0023] Следующие термины будут использоваться для описания различных вариантов осуществления, обсуждаемых в настоящем документе, и подразумевается, что они определяются, как указано ниже.

[0024] Как здесь используется, при описании различных вариантов осуществления формы единственного числа «a», «an» и «the» включают ссылки во множественном числе, если по контексту явно не требуется иное.

[0025] 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.

[0026] Термин «агент», если он относится к различным интерлейкинам (IL), такой как «агент IL-10» или «агент IL-4» и т. п., следует толковать широко, и он включает, например, человеческие и «нечеловеческие» формы полипептидов интерлейкинов, включая гомологи, варианты (включая мутеины), их фрагменты и слитые белки, а также полипептиды, имеющие, например, лидерную последовательность (например, сигнальный пептид), и модифицированные варианты вышеперечисленного. Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим вышеперечисленное, векторам и т. п., содержащим молекулы нуклеиновой кислоты, и клеткам (например, трансформированным клеткам и клеткам-хозяевам), которые экспрессируют агенты на

основе интерлейкинов. Термины «вариант», «аналог» и «мутеин» относятся к биологически активным производным референтной молекулы, которые сохраняют требуемую активность, например, такую как противовоспалительная активность. В общем, термины «вариант», «варианты», «аналог» и «мутеин», по отношению 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. Например, термины «вариант IL-10», «вариантный IL-10», «молекула варианта IL-10» и их грамматические вариации и формы множественного числа все предназначены для того, чтобы быть эквивалентными терминами, которые относятся к вариантным формам аминокислотной последовательности (или нуклеиновой кислоты) IL-10, которая отличается от формы IL-10 дикого типа с наличием 1-25% идентичности или гомологии последовательности. Таким образом, например, молекула варианта EBV IL-10 представляет собой молекулу, которая отличается от EBV IL-10 дикого типа наличием одной или более аминокислотных добавлений, замен и/или делеций (или нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислоту).

[0027] 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 («NH<sub>2</sub>») к карбоксиконцу («COOH»).

[0028] 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, когда 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.

[0029] 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.

[0030] 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.

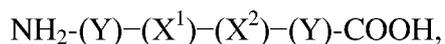
[0031] Термин «введение» включает пути введения, которые позволяют активному ингредиенту по изобретению выполнять предназначенную ему функцию.

[0032] «Терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество», как это относится, например, к введению вариантов II, слитых белков, слитых белков на основе двух цитокинов или их диацинов, описанных в настоящем документе, относится к количеству, достаточному для обеспечения определенных биологических активностей. Такие активности могут включать, например, подавление функции миелоидных клеток, усиление активности клеток Купфера, и/или отсутствие какого-либо эффекта на CD8<sup>+</sup> Т-клетки или усиление активности CD8<sup>+</sup> Т-клеток, а также блокаду положительной регуляции тучных клеток Fc-рецептора, или предотвращение дегрануляции, или стимуляция или усиление эффектов комбинированной терапии (например, лекарственных препаратов на основе CAR-T), или подавление индукции цитокинов из моноцитов или макрофагов. Таким образом, «эффективное количество» будет облегчать или предотвращать симптом или признак патологического состояния. Эффективное количество также означает количество, достаточное для того, чтобы обеспечить или облегчить постановку диагноза.

[0033] Термин «лечить», «лечение» или «проводить 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.

[0034] Как здесь используется, термин «продолжительный период полувыведения» относится к белку, который включает один или более дополнительных фрагментов (таких как белки или ПЭГиление), которые удлиняют и/или увеличивают время циркуляции в организме субъекта в диапазоне 1-100 раз дольше, чем белок в отсутствие дополнительного фрагмента или фрагментов. В отношении II, то в одном предпочтительном варианте осуществления II с продолжительным периодом полувыведения относится к II-10 или II-4, II-7, II-12 или II-15, конъюгированным с scFv, в результате чего время циркуляции увеличивается в диапазоне 1-10 раз по

сравнению с  $\Pi$  в отсутствии scFv. В еще одном варианте осуществления вариант  $\Pi$  с пролонгированным периодом полувыведения будет иметь конфигурацию формулы I:



где:

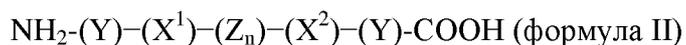
«Y» представляет собой любой мономер из гомодимерного или гетеродимерного цитокина;

«X<sup>1</sup>» представляет собой VL- или VH-область, полученную из первого моноклонального антитела;

«X<sup>2</sup>» представляет собой VH- или VL-область, полученную из первого моноклонального антитела,

где, когда X<sup>1</sup> представляет собой VL, то X<sup>2</sup> представляет собой VH, или когда X<sup>1</sup> представляет собой VH, то X<sup>2</sup> представляет собой VL, и где VH и VL вместе образуют scFv.

[0035] Как здесь используется, термин «диакин» или «DK» относится к слитому белку на основе двух цитокинов, содержащему два мономера димерного цитокина, который может быть либо гомодимером, таким как  $\Pi$ -10 или варианты  $\Pi$ -10, либо гетеродимером, таким как  $\Pi$ -12 или варианты  $\Pi$ -12, который слит вместе с мономерным цитокином, таким как  $\Pi$ -2,  $\Pi$ -4,  $\Pi$ -7,  $\Pi$ -15,  $\Pi$ -21,  $\Pi$ -28,  $\Pi$ -29, или с димерным цитокином, таким как  $\Pi$ -12 или  $\Pi$ -10, где как димерный цитокин, так и мономерный цитокин слиты в домене, нацеленном на антиген, пролонгирующем период полувыведения. Репрезентативные диакины подробно описаны в патенте США № 11292822 (диакины на основе  $\Pi$ -10) и в одновременно рассматриваемой заявке США 18/065504 (диакины на основе двух димерных цитокинов), которые в полном объеме включены в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления диакин, который может быть использован в способе в комбинации с BiTE или CAR-T, представлен формулой II:



где:

«Y» представляет собой любой мономер из гомодимерного или гетеродимерного цитокина;

«X<sup>1</sup>» представляет собой VL- или VH-область, полученную из первого моноклонального антитела;

«X<sup>2</sup>» представляет собой VH- или VL-область, полученную из первого моноклонального антитела,

где, когда X<sup>1</sup> представляет собой VL, то X<sup>2</sup> представляет собой VH, или когда X<sup>1</sup> представляет собой VH, то X<sup>2</sup> представляет собой VL, и где VH и VL вместе образуют scFv;

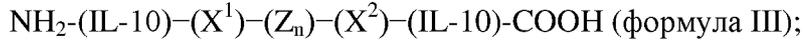
«Z» представляет собой второй цитокин, где второй цитокин представляет собой любой мономерный цитокин или другой димерный цитокин; и

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

В одном варианте осуществления димерный цитокин может включать IFN- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21 и IL-27. В других вариантах осуществления мономерный цитокин может включать IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, интерфероны- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , TGF- $\beta$  или факторы некроза опухоли - $\alpha$ , - $\beta$ , основной FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11 или IL-13. VH и VL диакина представляют собой scFv и могут быть получены из любого моноклонального антитела, но предпочтительно получены из антитела, способного нацеливаться на специфический антиген. Моноклональное антитело, из которого может быть получен scFv (применительно к формуле I и II), выбрано из антитела к EGFR; CD52; CD14; различным мишеням иммунных контрольных точек, таким 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 $\alpha$ ; 5T4; Trop2; EDB-FN; ловушке TGF $\beta$ ; MAdCAM,  $\beta$ 7 субъединице интегрина;  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 интегрину;  $\alpha$ 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; CD123; CD33; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; BCMA; DLL3; MUC17; CLDN 18; gpA33; антитела против ВИЧ или вируса Эбола. В одном варианте осуществления scFv (применительно к формуле I и II) представляет собой привитой scFv, в котором каркасная область VH и VL получена из первого антитела (такого как антитело против вируса Эбола), и CDR получены из второго антитела (такого как, не ограничиваясь этим, антитело к EGFR; CD52; CD14; различным мишеням иммунных контрольных точек, таким как, не ограничиваясь этим, 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 $\alpha$ ; 5T4; Trop2; EDB-FN; ловушке TGF $\beta$ ; MAdCAM,  $\beta$ 7 субъединице интегрина;  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 интегрину;  $\alpha$ 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; CD123; CD33; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; BCMA; DLL3; MUC17; CLDN 18; gpA33; антитело против ВИЧ или вируса Эбола). В одном предпочтительном варианте осуществления scFv получен из антитела против вируса Эбола, где каркасные VH- и VL-области антитела против вируса Эбола замещены или на них привиты 6 CDR-участков из антитела, специфичного к EGFR; CD52; CD14; различным мишеням иммунных контрольных точек, таким как, не ограничиваясь этим, 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 $\alpha$ ; 5T4; Trop2; EDB-FN; ловушке TGF $\beta$ ; MAdCAM,  $\beta$ 7 субъединице интегрина;  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 интегрину;  $\alpha$ 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; CD123; CD33; BCMA; PSA; PSMA; CEA; GPC3; BCMA; DLL3; MUC17; CLDN 18; gpA33; более предпочтительно анти-EGFR, анти-MAdCAM, анти-VEGFR1, анти-VEGFR2, анти-PDGFR или анти-CD14, анти-CD19, анти-CD20 или анти-CD22.

[0036] В еще одном варианте осуществления диакин, который можно использовать в способе в комбинации с BiTE или CAR-T, представляет собой диакин, описанный в

патенте США № 11292822 (диакины на основе IL-10) или в одновременно рассматриваемой заявке США 18/065504 (диакины на основе двух димерных цитокинов), которые в полном объеме включены в настоящий документ посредством ссылки. В еще одном варианте осуществления диакин, который может быть использован в способе в комбинации с BiTE или CAR-T, представляет собой белок, представленный формулой III:



где:

«IL-10» представляет собой мономер;

«X<sup>1</sup>» представляет собой VL- или VH-область из первого моноклонального антитела;

«X<sup>2</sup>» представляет собой VH- или VL-область из первого моноклонального антитела;

где, когда X<sup>1</sup> представляет собой VL, то X<sup>2</sup> представляет собой VH, или когда X<sup>1</sup> представляет собой VH, то X<sup>2</sup> представляет собой VL;

где первое моноклональное антитело представляет собой антитело против вируса Эбола или каркасную область scFv, полученную из него;

где VL и VH из антитела против вируса Эбола включают 3 CDR легкой цепи и 3 CDR тяжелой цепи, которые привиты на 3 CDR легкой цепи и 3 CDR тяжелой цепи из второго моноклонального антитела;

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

«n» представляет собой целое число 1; и

где следующие переменные в таблице 1 применяются к формуле III:

**Таблица 1**

«мономер IL-10»	«второе моноклональное антитело»	«Z»
Человеческий IL-10 (SEQ ID NO: 1)	EGFR	2
		15
		7
		28
		29
	HER2	IFN-альфа
		21
		2
		15
		7
		28
		29

		IFN-альфа
		21
	VEGFR2	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
	PDGFR	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
	GPC3	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
	PD-L1	2
		15
		7
		28
		29
IFN-альфа		
21		
CD19	2	
	15	
	7	
	28	

		29
		IFN-альфа
		21
	CD20	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
		2
	CD22	15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
		2
	PSMA	15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
		2
	CEA	15
		7
		28
		29
IFN-альфа		
21		
2		
BCMA	15	
	7	

		28
		29
		IFN-альфа
		21
	gpA33	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
		21
	CD33	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
		21
	DLL3	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
		21
MUC17	2	
	15	
	7	
	28	
	29	
	IFN-альфа	
	21	
	21	
CLDN18	2	
	15	

		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
	GD2	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-alpha
		21
	5T4	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
	HER3	2
		15
7		
28		
29		
IFN-альфа		
21		
EBV IL-10 (SEQ ID NO: 5)	EGFR	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
	HER2	2

		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
	VEGFR2	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
	PDGFR	21
		2
		15
		7
		28
		29
	GPC3	IFN-альфа
		21
		2
15		
7		
28		
PD-L1	29	
	IFN-альфа	
	21	
	2	
	15	
	7	
	28	
	29	
	IFN-альфа	
	21	

	CD19	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
	CD20	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
	CD22	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
	PSMA	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
CEA	2	
	15	
	7	
	28	
	29	
	IFN-альфа	

	BCMA	21
		2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
	gpA33	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-alpha
		21
	CD33	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
	DLL3	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
21		
MUC17	2	
	15	
	7	
	28	
	29	

		IFN-альфа
		21
	CLDN18	2
		15
		7
		28
		29
		IFN-альфа
		21
		GD2
	15	
	7	
	28	
	29	
	IFN-alpha	
	21	
	5T4	
		15
		7
		28
		29
		IFN-alpha
		21
		HER3
	15	
	7	
	28	
	29	
IFN-альфа		
21		

[0037] В еще одном варианте осуществления диакин, который можно использовать в способе в комбинации с ViTE или CAR-T, представляет собой диакин, описанный в одновременно рассматриваемой заявке США 18/065504 в таблицах 2a-2d и 3a-3d, которая в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки.

[0038] В еще одном аспекте молекулы белка и нуклеиновой кислоты, кодирующей

слитый белок на основе двух цитокинов, могут быть формулированы 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 формулирована 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.

[0039] Фармацевтическая композиция должна быть формулирована для введения пациенту в терапевтически эффективном количестве, достаточном для обеспечения требуемого 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 CRS, опосредованного ViTe или CAR-T терапией. 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.

[0040] Эффективное количество для конкретного пациента может варьироваться в зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, которое лечат, общее состояние здоровья пациента, путь введения и доза, и 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 его повышают небольшими приращениями до тех пор, пока не будет достигнут требуемый или оптимальный эффект по отношению к любым негативным побочным эффектам. Важные диагностические показатели включают в себя симптомы, например, воспаления, или уровень продуцированных воспалительных цитокинов.

[0041] Способ определения дозировки слитого белка на основе двух цитокинов по настоящему изобретению будет по существу аналогичен способу, описанному в патенте США № 10858412. Как правило, описываемый слитый белок на основе двух цитокинов по настоящему изобретению будет иметь дозировку в диапазоне от 0,01 мг/кг до 1 мг/кг, предпочтительно от 0,025 мг/кг до 0,5 мг/кг. Слитый белок на основе двух цитокинов можно вводить ежедневно, три раза в неделю, два раза в неделю, еженедельно, два раза в месяц или ежемесячно. Эффективное количество терапевтического средства будет влиять на степень ингибирования CRS, вызванного ViTE или CAR-T терапией. В еще одном варианте осуществления диакин будет дозироваться в концентрации от 0,1 нг/мл до 200 нг/мл, предпочтительно от 10 нг/мл до 100 нг/мл. Как правило, добавление диакина снизит требуемую дозу для лекарственного препарата на основе ViTE или CAR-T.

[0042] Композиции по настоящему изобретению можно вводить перорально или инъекционно в организм пациента. Составы для перорального применения также могут включать соединения для дополнительной защиты молекул IL или DK от протеаз в желудочно-кишечном тракте. Инъекции обычно представляют собой внутримышечные, подкожные, внутрикожные или внутривенные инъекции. В качестве альтернативы, внутрисуставная инъекция или другие пути могут быть использованы в соответствующих обстоятельствах. Парентерально вводимый слитый белок на основе двух цитокинов предпочтительно формулируют в виде инъекционной лекарственной формы (раствор, суспензия, эмульсия) в сочетании с фармацевтическим носителем и/или фармацевтически приемлемыми эксципиентами. В других вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению можно вводить в организм пациента с помощью имплантируемой или инъекционной системы доставки лекарственных препаратов.

[0043] Специалистам в данной области должно быть понятно, что адоптивная клеточная терапия (такая как адоптивная Т-клеточная терапия) хорошо известна и практикуется в соответствии с ранее описанными процедурами. См., например, патент США № 4690915. Такие способы могут включать аутологичный перенос (т. е. материал, полученный от самого пациента) или аллогенный перенос (т. е. материал, полученный от другого субъекта, отличного от пациента, подлежащего лечению).

[0044] CAR-T- или TCR-T-клетки вводят с использованием методов, известных и обычно практикуемых теми, кто знаком с адоптивной клеточной терапией. В одном варианте осуществления метод введения включает, не ограничиваясь этим, болюсную инфузию, внутривенные или подкожные инъекции, интраокулярную инъекцию, периокулярную инъекцию, субретинальную инъекцию, интравитреальную инъекцию, трансептальную инъекцию, субсклеральную инъекцию, интрахориоидальную инъекцию, интракамеральную инъекцию, субконъюнктивальную инъекцию, субтеноновую инъекцию, ретробульбарную инъекцию, перibuльбарную инъекцию или заднюю юкстасклеральную доставку. В некоторых вариантах осуществления их вводят парентеральным, внутрилегочным и интраназальным введением или в очаг поражения или интратуморальным введением. 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. Общеизвестные CAR-T препараты включают идекабтаген виклейцел, лизокабтаген маралейцел, брексукабтаген аутолейцел, тисагенлеклейцел или аксикабтаген цилолейцел.

[0045] В одном варианте осуществления слитый белок на основе двух цитокинов и CAR-T вводят в отдельные последовательные периоды времени, где, например, диакин (такой как DK2<sup>10</sup>vegfr2 или DK2<sup>10</sup>EGFR, или любой из приведенных в таблице 1 выше) 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 препарата 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 для 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.

[0046] Аналогично, диакин и ViTE вводят в отдельные последовательные периоды времени, где диакин (например, DK2<sup>10</sup>CD20 или DK2<sup>10</sup>EGFR или DK2<sup>10</sup>HER2 или DK2<sup>10</sup>HER3) вводится за 1-3 суток до введения ViTE (например, CD3×CD19 ViTE). В еще одних вариантах осуществления диакин вводится за 1-3 суток до ViTE и затем одновременно вводится 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 или в

сочетании с ViTE. ViTE, как правило, будет иметь формат биспецифического антитела, имеющего анти-CD3 и анти-TAA, слитые вместе. В одном варианте осуществления способ объединяет IL-10 или IL-4, или их варианты с пролонгированным периодом полувыведения, или диакин, содержащий IL-10 или IL-4 и IFN- $\alpha$ , IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 или IL-27, в сочетании с ViTE, например, с такими, которые имеют биспецифичность к CD3 с CD33, BCMA, CD19, CD20, CD22, PSMA, EGFR, DLL3, MUC17, CLDN18, CEA, HER2, HER3, EpCAM, gpA33, GPC3, GD2 5T4, VEGFR2, PDGFR, PDL1 или PD1, если назвать только некоторые из них. В предпочтительном варианте осуществления ViTE представляет собой анти-CD3 и анти-CD19, анти-CD20, анти-HER2, анти-HER3, анти-PSMA или анти-BCMA.

[0047] Обычно полагается, что CRS ассоциирован с сопутствующим повышением уровня сывороточного IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha/\gamma$ , IL-12 и IL-23. Хотя эти цитокины обычно ассоциируются с CRS, неизвестно, один, два или все эти цитокины функционируют вместе, чтобы привести к токсическим побочным эффектам, связанным с CRS. Авторы изобретения полагают, что потенциальной первопричиной CRS является тот факт, что у многих пациентов с тяжелым CRS, вызванным лечением ViTE или CAR-T, развивается синдром сосудистой утечки. Синдром сосудистой или капиллярной утечки также преимущественно наблюдается в качестве ограничивающей дозу и часто летальной токсичности, связанной с терапией высокой дозой IL-2. Кроме того, авторы изобретения обнаружили, что обработка мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) или клеток цельной крови человека с возрастающей концентрацией IL-2 приводит к индукции панели провоспалительных цитокинов, напоминающих CRS (фиг. 1).

[0048] Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, авторы изобретения полагают, что сходство между цитокинами, индуцированными обработкой только IL-2, и очевидная блокада индукции этих вторичных цитокинов диакином, содержащим IL-10 (например, DK2<sup>10</sup> (EGFR)) или IL-4, IL-12, IL-15, IL-7 или любую их комбинацию, будет подавлять или блокировать CRS, опосредованный IL-2. Другие исследователи показали, что добавление опухолевых клеток, экспрессирующих специфические опухоль-ассоциированные антигены (TAA), к PBMC с диапазоном титрации анти-TAA:анти-CD3 ViTE приводит к индукции ряда провоспалительных цитокинов (Fu, 2019). Также, оказалось, что стимуляция ViTE временно приводит к начальной индукции TNF $\alpha$ , IL-2 и IL-4, за которыми следуют другие цитокины (Brandl, 2007). Степень индукции IFN $\gamma$ , IL-6 и TNF $\alpha$  из PBMC в ответ на воздействие анти-CD3 в присутствии диакина (DK2<sup>10</sup> EGFR), IL-10 и IL-2, предполагает, что присутствие DK2<sup>10</sup> (EGFR) предотвращает индукцию значительных уровней вторичных провоспалительных цитокинов, ассоциированных с CRS, в отличие от возрастающей концентрации IL-2 (фиг. 2). Кроме того, слитый белок IL-2 с высокоаффинным EBV IL-10 (внутреннее название DV07, SEQ ID NO: 5), который известен как DK2<sup>10</sup>EGFR, предотвращает индукцию вторичных цитокинов, опосредованных IL-2, как из PBMC, так и из PBMC,

стимулированных анти-CD3 (фиг. 2). Дальнейшее исследование сочетания IL-10 с IL-2 указывает на то, что применение DK2<sup>10</sup> (EGFR) мышам предотвращает индукцию периферических цитокинов, индуцированных только IL-2 (фиг. 3). Кроме того, обработка «нечеловеческих» приматов DK2<sup>10</sup> (EGFR) аналогичным образом не приводит к значительной индукции цитокинов в плазме периферической крови (фиг. 4).

[0049] Кроме того, предварительная обработка CD8<sup>+</sup> Т-клеток диакином (например, DK2<sup>10</sup> (EGFR)) в последующем резко усиливает способность клеток взаимодействовать с ViTE и вызывать цитолиз опухолевых клеток (фиг. 5). Кроме того, эти клетки, по-видимому, секретируют сходные уровни IFN $\gamma$ , но более низкие уровни TNF $\alpha$  по сравнению с клетками, стимулированными только ViTE (фиг. 6). Таким образом, авторы изобретения полагают, что молекулярный путь, ответственный за CRS, опосредованный ViTE или CAR-T, представляет собой каскад высвобождения провоспалительных цитокинов, который сначала запускается взаимодействием CD4<sup>+</sup> Т-клеток с ViTE или CAR-T, что затем запускает секрецию IL-2 и «побуждает» моноциты/макрофаги дополнительно секретировать провоспалительные цитокины (фиг. 7) из моноцитов/макрофагов.

**Пример 1: диакин усиливает цитолиз опухолевых клеток, опосредованный ViTE**

[0050] Ранее было показано, что DK2<sup>10</sup> (EGFR) праймирует CD8<sup>+</sup> Т-клетки для последующего цитолиза опухолей *in vitro* и *in vivo*. См. патент США № 11292822. В настоящем документе показано, что DK2<sup>10</sup> (EGFR), который является иллюстративным примером диакина, как усиливает цитолиз опухолевых клеток, опосредованный ViTE, так и подавляет CRS, опосредованный ViTE.

[0051] Первоначально было показано, что DK2<sup>10</sup> (EGFR) усиливает цитотоксичность для опухолевых клеток, опосредованную ViTE. На данной модели *in vitro* комбинаторные противоопухолевые эффекты DK2<sup>10</sup> (EGFR) и CD19 ViTE оценивали в нескольких раундах обработки мишеневых опухолевых клеток.

[0052] CD8<sup>+</sup> Т-клетки выделяли из свежего донорского лейкопакса с использованием магнитных частиц для выделения в соответствии с протоколом, предложенным производителем (Miltenyi). Выделенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки высевали из расчета  $2,5 \times 10^6$  клеток/лунку и обрабатывали в течение 2 суток различными концентрациями (0 или 100 нг/мл) DK2<sup>10</sup> (EGFR) в AIMV. После 2 суток обработки различными концентрациями DK2<sup>10</sup> (EGFR), CD8<sup>+</sup> Т-клетки собирали, подсчитывали, промывали и, наконец, ресуспендировали в соответствующей концентрации DK2<sup>10</sup> (EGFR). Одновременно клетки Raji, которые конститутивно экспрессируют зеленый флуоресцентный белок (GFP), подсчитывали, промывали и ресуспендировали в различных концентрациях (0 или 0,1 нг/мл) CD19 ViTE. Затем CD8<sup>+</sup> клетки (эффекторные клетки) и клетки Raji-GFP (мишеневые клетки) объединяли в соотношении эффектора к мишени 10:1. Смесь эффекторных и мишеневых клеток, которые подвергались обработке только CD19 ViTE, только DK2<sup>10</sup> (EGFR) или комбинацией CD19 ViTE и DK2<sup>10</sup> (EGFR),

анализировали в течение 5 суток с использованием системы анализа живых клеток IncuCyte® S3 (Essen Bioscience/Sartorius). Вместе с этим, делали посев на дополнительных планшетах в тех же условиях, которые указаны выше, для использования в последующих и серийных раундах анализа цитотоксичности. Каждые 3 суток среду аспирировали из лунок, и в лунки добавляли свежую среду с соответствующими концентрациями либо DK2<sup>10</sup> (EGFR), либо CD19 ViTE, либо их комбинации. После 5-суточной обработки клетки собирали, подсчитывали, промывали и повторно обрабатывали в аналогичных условиях, описанных выше. Процент исчезновения флуоресценции (GFP) определяли в качестве показателя цитотоксичности.

[0053] CD3×CD19 ViTE в комбинации с DK2<sup>10</sup> (EGFR) усиливал цитотоксичность для опухолевых клеток. См. фиг. 5 и 8. CD3×CD19 ViTE и DK2<sup>10</sup> (EGFR) тестировали как по отдельности, так и в комбинации с использованием CD8<sup>+</sup> Т-клеток от нормальных, здоровых людей-доноров (фиг. 8). Эффекторные клетки прошли через несколько раундов (5 раундов серийного цитолиза) обработки мишеневых опухолевых клеток (Raji-GFP), и цитотоксичность оценивали по исчезновению флуоресценции от GFP. Обработка *in vitro* с использованием ViTE в комбинации с DK2<sup>10</sup> (EGFR) предполагает, что активация Т-клеток с DK2<sup>10</sup> (EGFR) усиливает ответы на ViTE при оценке анти-Raji<sup>GFP+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

### **Пример 2: диакин снижает опосредованный ViTE CRS**

[0054] Одной из текущих клинических проблем с ViTE является значительная индукция CRS (Zhou, 2021). Поскольку оказалось, что обработка диакином (например, DK2<sup>10</sup> (EGFR)) мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), мышей с опухолями и «нечеловеческих» приматов (см. фиг. 1, 3 и 4) предотвращает CRS, опосредованный IL-2, культуры *in vitro*, включающие PBMC, клетки Raji<sup>GFP+</sup>, 0,1 нг/мл CD19 ViTE с или без 100 нг/мл DK2<sup>10</sup> (EGFR), использовали для определения способности DK2<sup>10</sup> (EGFR) подавлять CRS, опосредованный ViTE.

[0055] PBMC выделяли из лейкопакса, собранного у здоровых доноров, с использованием метода выделения в градиенте плотности фиколла. Равные объемы образцов HBSS и доноров переносили в конические пробирки по отдельности. Медленно добавляли фиколл для формирования нижнего слоя, затем образцы центрифугировали при 400 g в течение 30 мин при 25°C. PBMC собирали из верхнего слоя, затем дважды промывали с использованием среды Aim V (300 g, 8 мин). Выделенные PBMC высевали из расчета 2×10<sup>6</sup> клеток/лунку в различных концентрациях (0 или 100 нг/мл) DK2<sup>10</sup> EGFR в AIMV, затем инкубировали в течение двух суток (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Опухолевые клетки Raji подсчитывали, промывали и ресуспендировали в различных концентрациях CD19 ViTE (0 или 0,1 нг/мл конечная), с или без DK2<sup>10</sup> (EGFR) (100 нг/мл) с использованием AIMV и оставляли для праймирования на 2 суток. PBMC, полагая с наличием 10% CD8<sup>+</sup> Т-клеток (эффекторные клетки) и клетки Raji (мишеневые клетки), объединяли в соотношении эффектора к мишени 10:1. После 24-ч инкубации супернатанты собирали, и секрецию цитокинов измеряли с использованием мультиплексного анализа с захватом (MSD) и ELISA.

[0056] Приведенные на фиг. 9 данные свидетельствуют о том, что присутствие DK2<sup>10</sup> (EGFR) в этих условиях достоверно способствует лизису опухолевых клеток (индукция IFN-гамма, гранзима В и перфорина), ограничивая при этом индукцию ViTE-опосредованного CRS при нефункциональной концентрации ViTE (0,1 нг/мл). Представленные данные получены через 24 ч после обработки 1. Лонгитудинальные данные указывают на снижение CRS во времени в этих условиях (фиг. 10).

[0057] Для того, чтобы лучше понять типы клеток, присутствующих в культурах РВМС+Raji<sup>GFP+</sup>, на которые влияет DK2<sup>10</sup> (EGFR), авторы изобретения анализировали 48-ч культуры с использованием внутриклеточной флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS). На основе результатов данного анализа можно предположить, что присутствие DK2<sup>10</sup> (EGFR) поляризует как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup> Т-клетки для преимущественной экспрессии IFN-гамма, одновременно снижая продукцию TNF-альфа и IL-2. МНС II-позитивные клетки, обозначенные как антигенпрезентирующие клетки (APC), также демонстрируют сниженную продукцию TNF-альфа, IL-6 и IL-1-бета, что позволяет предположить, что DK2<sup>10</sup> (EGFR) опосредует плейотропный контроль типа клеток при CRS, ассоциированный с активацией Т-клеток, опосредованной ViTE (фиг. 10).

#### Ссылки

Bosco M. C. (2000). IL-2 Signaling in Human Monocytes Involves the Phosphorylation and Activation of p59hck1. *Journal of Immunology*.

Brandl C. (2007). The effect of dexamethasone on polyclonal T cell activation and redirected target cell lysis as induced by a CD19 CD3 bispecific single-chain antibody construct. *Cancer Immunology Immunotherapy*.

Chen Y. (2021). Therapeutic Potential of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  Blockade for CRS/ICANS in CART Therapy via Ameliorating Endothelial Activation. *Frontiers in Immunology*.

Hosseini I. (2020). Mitigating the risk of cytokine release syndrome in Phase I trial of CD20CD3 bispecific antibody mosunetuzumab in NHL impact of translational system modeling. *Systems Biology and Applications*.

Fu et al (2029). Therapeutic Bispecific T-Cell Engager Antibody Targeting the Transferrin Receptor. *Frontiers in Immunology*.

Liu D. (2018). Cytokine release syndrome; grading, modeling, and new therapy. *Journal of Hematology and Oncology*.

Maude S. L. (2014). Managing Cytokine Release Syndrome Associated with Novel T Cell-Engaging Therapies. *Cancer Journal*.

Musso T. (1992). IL-2 Induces IL-6 Production in Human Monocytes. *Journal of Immunology*.

Norelli M. (2018). Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nature Medicine*.

Shimabukuro-Vornhagen A. (2018). Cytokine release syndrome. *Journal of Immunotherapy of Cancer*.

Strieter R. M. (1989). Interleukin-2-induced Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Gene

Expression in Human Alveolar Macrophages and Blood Monocytes. *American Review Respiratory Disease*.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ снижения тяжести синдрома высвобождения цитокинов (CRS), индуцированного биспецифическим активатором Т-клеток (BiTE) или химерным антигенным рецептором Т-клеток (CAR-T), включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, количества композиции, содержащей интерлейкин-10 (IL-10) или агент IL-10, интерлейкин-4 (IL-4) или агент IL-4, или их комбинации.
2. Способ по п.1, где композиция содержит человеческий IL-10 или вирусный IL-10, мутеин, варианты, слитый белок и их фрагменты.
3. Способ по п.2, где человеческий IL-10 представляет собой последовательность SEQ ID NO: 1.
4. Способ по п.2, где вирусный IL-10 представляет собой IL-10 вируса Эпштейна-Барра (EBV) с последовательностью SEQ ID NO: 5.
5. Способ по п.1, где агент IL-10 представляет собой слитый белок, содержащий IL-10.
6. Способ по п.1, где агент IL-4 представляет собой слитый белок, содержащий IL-4.
7. Способ по п.6, где слитый белок представляет собой диакин, содержащий IL-10.
8. Способ по п.7, где слитый белок представляет собой диакин, содержащий IL-4.
9. Способ по п.7, где диакин дополнительно содержит нацеливающий домен scFv, который нацелен на рецептор, отличный от BiTE или CAR-T.
10. Способ по п.8, где диакин дополнительно содержит нацеливающий домен scFv, который нацелен на рецептор, отличный от BiTE или CAR-T.
11. Способ по п.10, где scFv нацелен на рецептор, выбранный из EGFR, CD3, CD4, CD5, CD7, CD14, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD47, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, BCMA, лектиноподобной молекулы-1 С-типа (CLL01), PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, 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, LAG3, CTLA4, GD-2, VEGFR1, VEGFR2, HER2, HER3, PDGFR, EpCAM, мезотелина (MSO), PSCA, PSA, MUC1, Lewis-Y, GPC3, AXL, клаудина 18.2, GD2, CEA, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4, ICAM-5, VCAM, FAP $\alpha$ , 5T4, Trop2, EDB-FN; TGF $\beta$ , ловушки, MAdCAM,  $\beta$ 7 субъединицы интегрина,  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 интегрин,  $\alpha$ 4 интегрин, 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 вируса Эбола.
12. Способ по п. 11, где scFv нацелен на рецептор, выбранный из EGFR, CD3, CD4, CD5, CD7, CD14, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD47, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, BCMA, лектиноподобной молекулы-1 С-типа (CLL01), PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, 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, LAG3, CTLA4, GD-2, VEGFR1, VEGFR2, HER2, HER3, PDGFR, EpCAM, мезотелина (MSO), PSCA, PSA, MUC1, Lewis-Y, GPC3, AXL, клаудина 18.2, GD2, CEA, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4, ICAM-5, VCAM, FAP $\alpha$ , 5T4, Trop2, EDB-FN; TGF $\beta$ , ловушки, MAdCAM,  $\beta$ 7 субъединицы интегрина,  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 интегрина,  $\alpha$ 4 интегрина, 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 вируса Эбола.

13. Способ по п.9, где диакин, содержащий IL-10, дополнительно содержит второй цитокин, выбранный из IFN- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21, IL-27.

14. Способ по п.10, где диакин, содержащий IL-4, дополнительно содержит второй цитокин, выбранный из IFN- $\alpha$ , IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, IL-27.

15. Способ по п.1, где ViTE или CAR-T терапия нацелена на гематологические или солидные опухоли, выбранные из CD19, CD20 или CD22.

16. Способ по п.1, где мишени CAR-T выбраны из TNFRSF17, IL3RA, SDC1, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23, CD33, CD38, CD44, CD70, CD133, CD174, CD274, CD276, CEACAM6, GFRA1, ITGB6, MS4A1, TNFRSF8, NCAM1, ULBP1, ULBP2, IL1RAP, CEACAM5, MET, EGFR, EGFRvIII, ENPP1, FGFR4, EPCAM, EPHA2, ERBB2, GPC3, MSLN, Muc1, PDCD1, KDR, IL13RA2, FOLH1, FAP, CA9, FOLR1, L1CAM, ROR1, SLAMF7, GD2, PSCA, GPNMB, CSPG4 или TEM1.

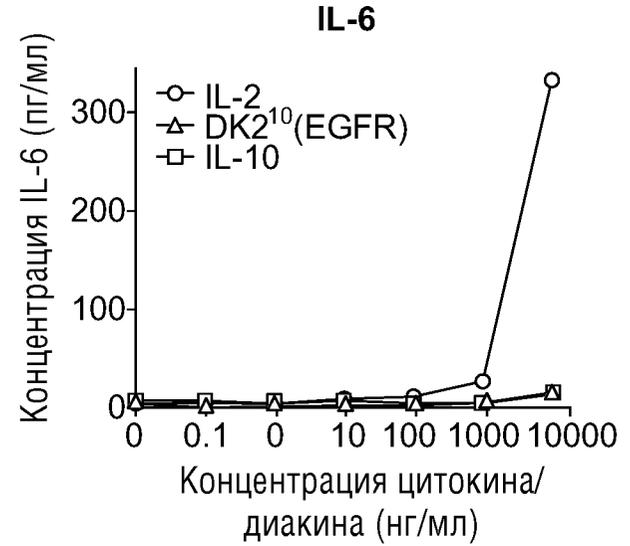
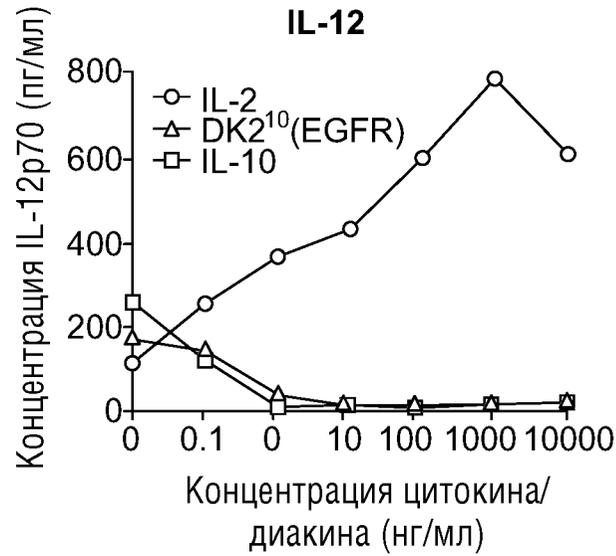
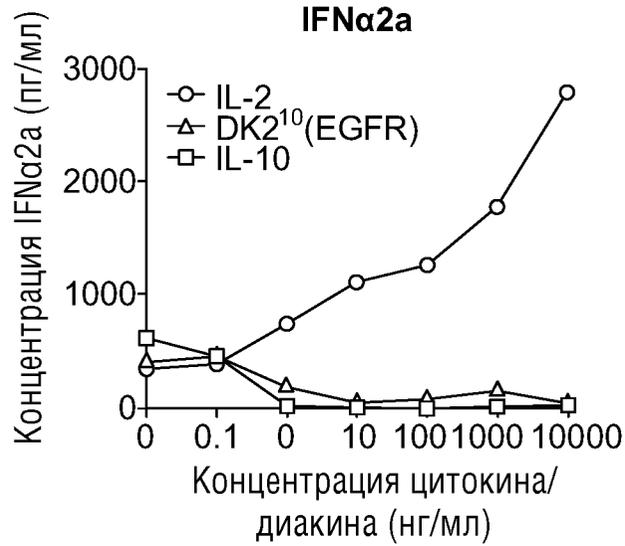
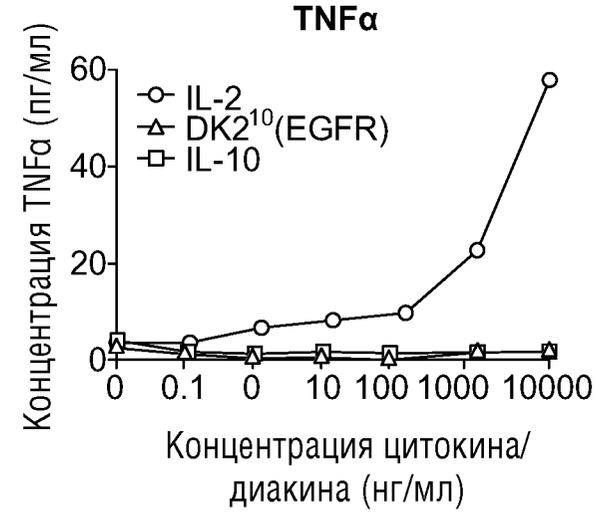
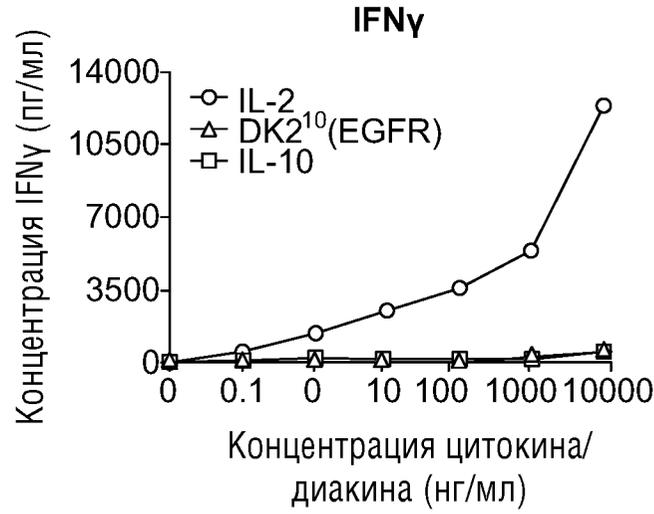
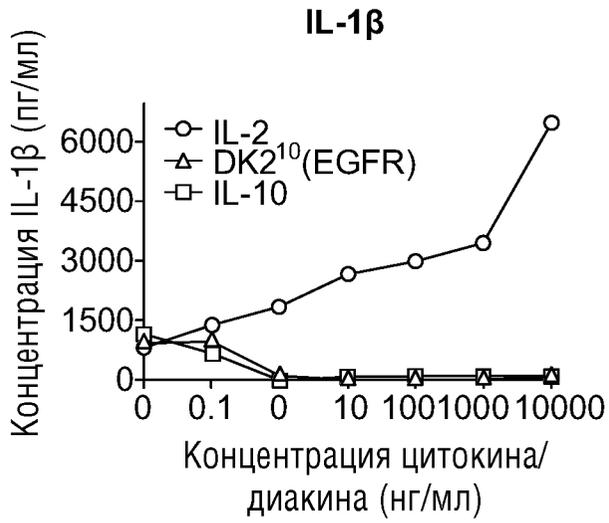
17. Способ по п.1, где лекарственный препарат на основе CAR-T представляет собой идекабтаген виклейцел, лизокабтаген маралейцел, брексукабтаген аутолейцел, тисагенлеклейцел или аксикабтаген цилолейцел.

18. Способ ингибирования синдрома высвобождения цитокинов (CRS) у пациента, проходящего терапию биспецифическим активатором Т-клеток (ViTE) или химерным антигенным рецептором Т-клеток (CAR-T), включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей интерлейкин-10 (IL-10) или агент IL-10.

19. Способ ингибирования синдрома высвобождения цитокинов (CRS) у пациента, проходящего терапию биспецифическим активатором Т-клеток (ViTE) или химерным антигенным рецептором Т-клеток (CAR-T), включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей интерлейкин-4 (IL-4) или агент IL-4.

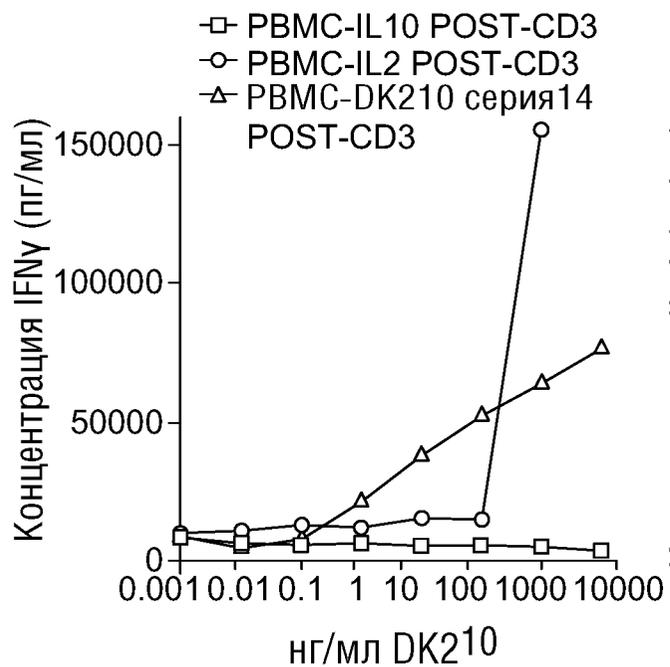
20. Способ ингибирования индукции провоспалительных цитокинов у пациента, проходящего терапию ViTE или CAR-T, включающий введение пациенту, проходящему указанную терапию, композиции, содержащей интерлейкин-10 (IL-10) или агент IL-10 или интерлейкин-4 (IL-4) или агент IL-4.

# ФИГ.1

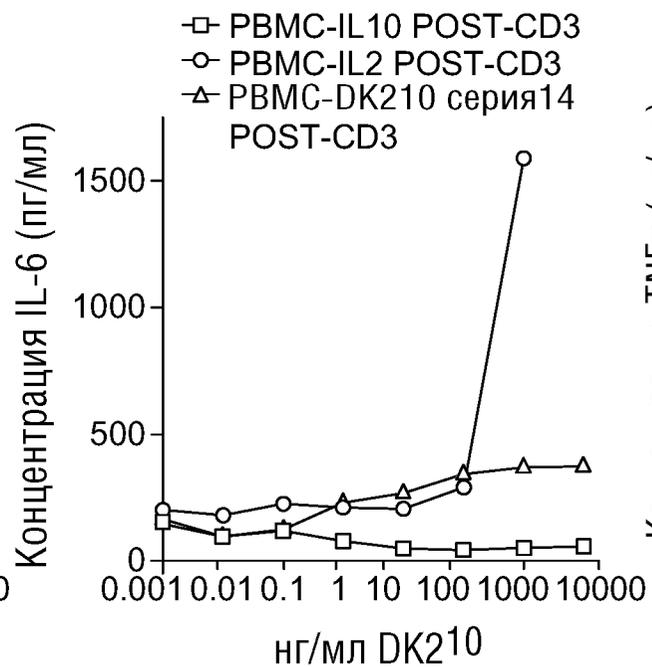


# ФИГ.2

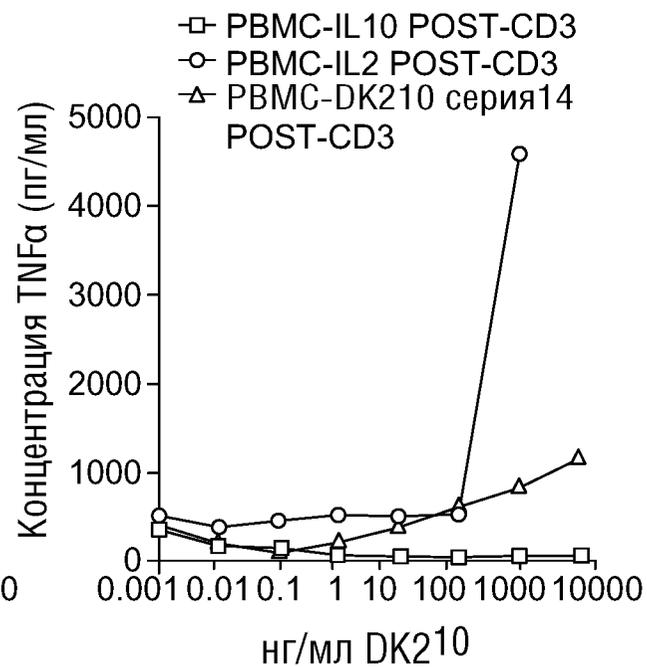
**PBMC DK2<sup>10</sup> IFN $\gamma$**



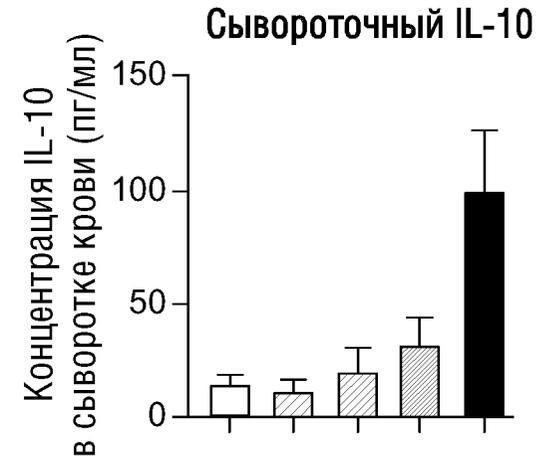
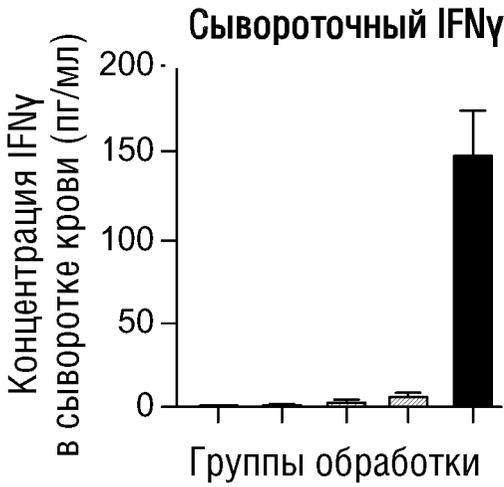
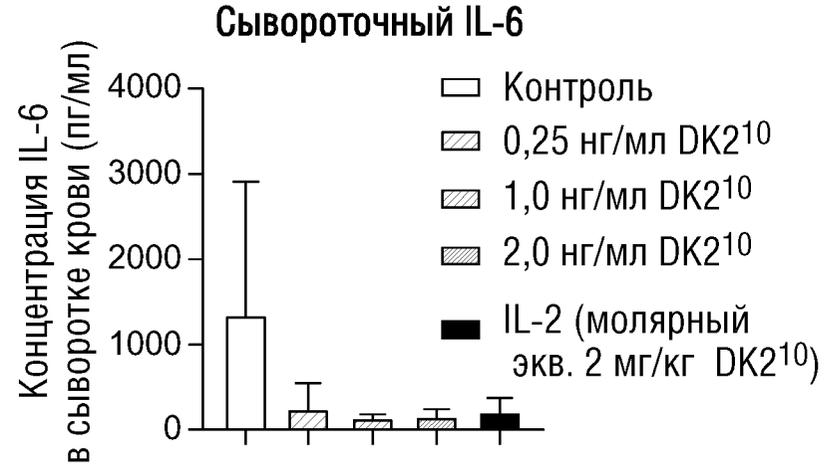
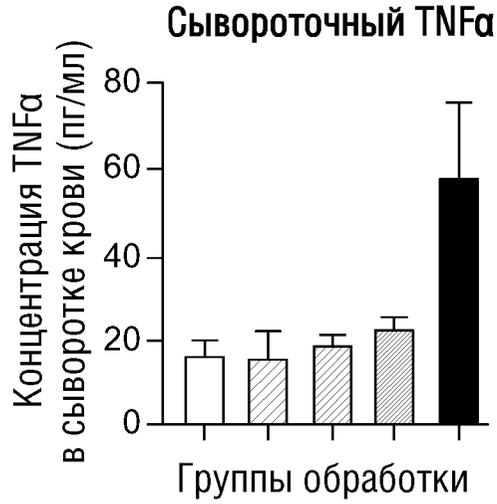
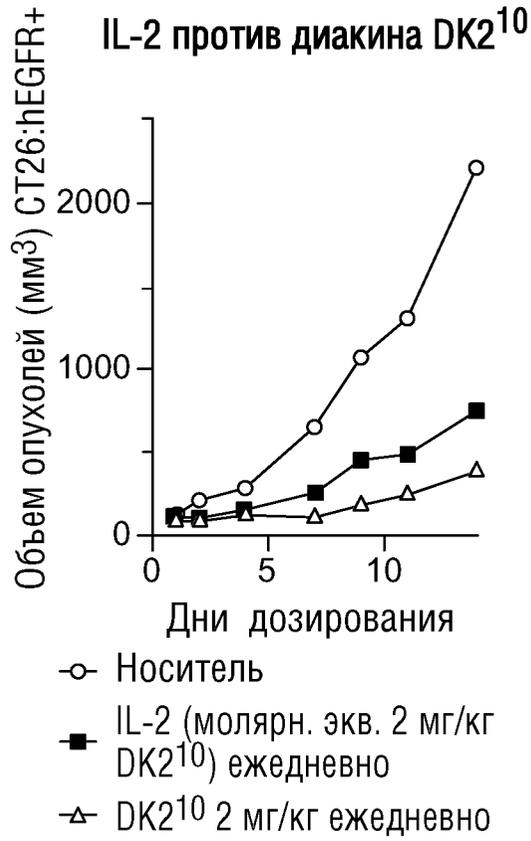
**PBMC DK2<sup>10</sup> IL-6**



**PBMC DK2<sup>10</sup> TNF $\alpha$**



# ФИГ.3



# ФИГ.4

**IFN $\gamma$  в плазме крови**  
(токсикологический опыт #20297901)



**TNF $\alpha$  в плазме крови**  
(токсикологический опыт #20297901)



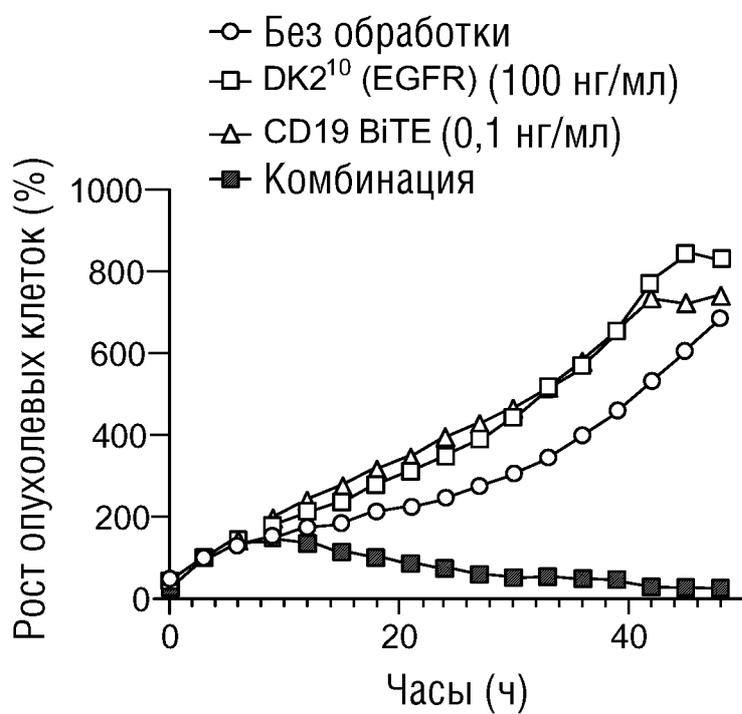
**IL-1 $\beta$  в плазме крови**  
(токсикологический опыт #20297901)



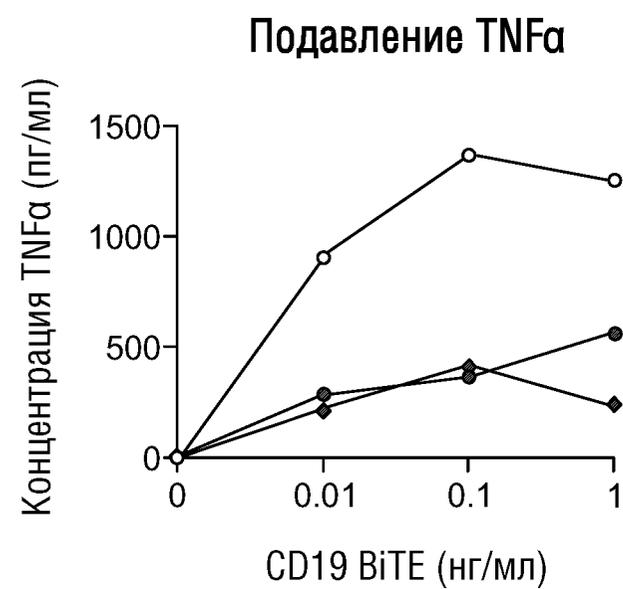
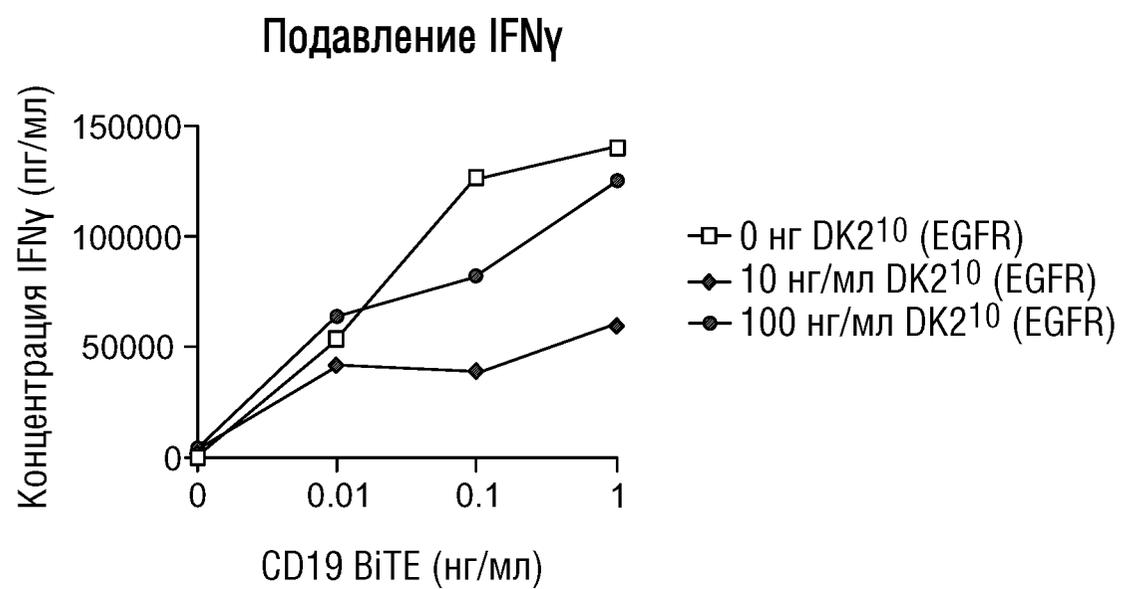
**IL-6 в плазме крови**  
(токсикологический опыт #20297901)



ФИГ.5

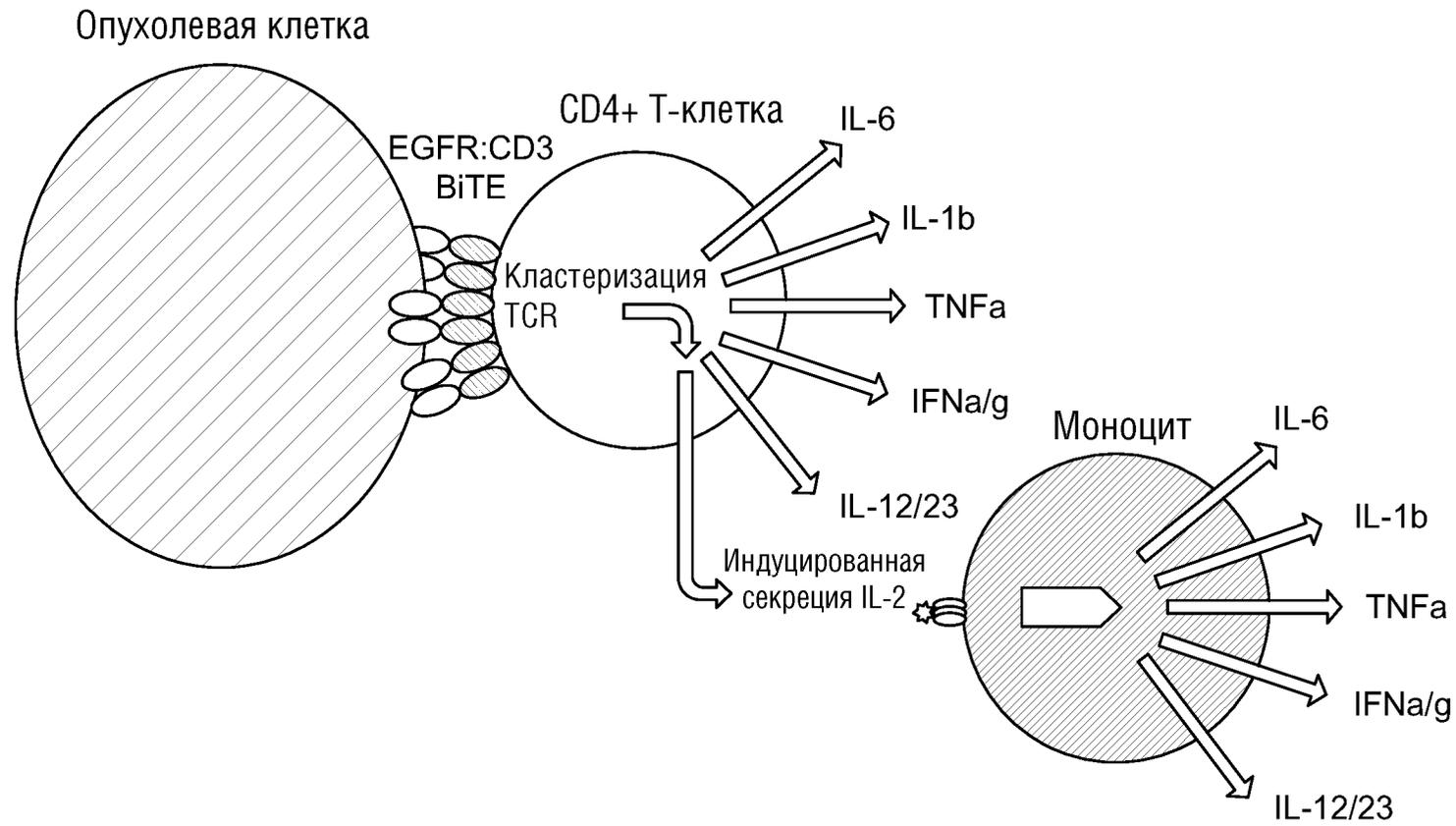
Цитотоксичность DK2<sup>10</sup> (EGFR) + CD19 ВiТЕ

# ФИГ.6



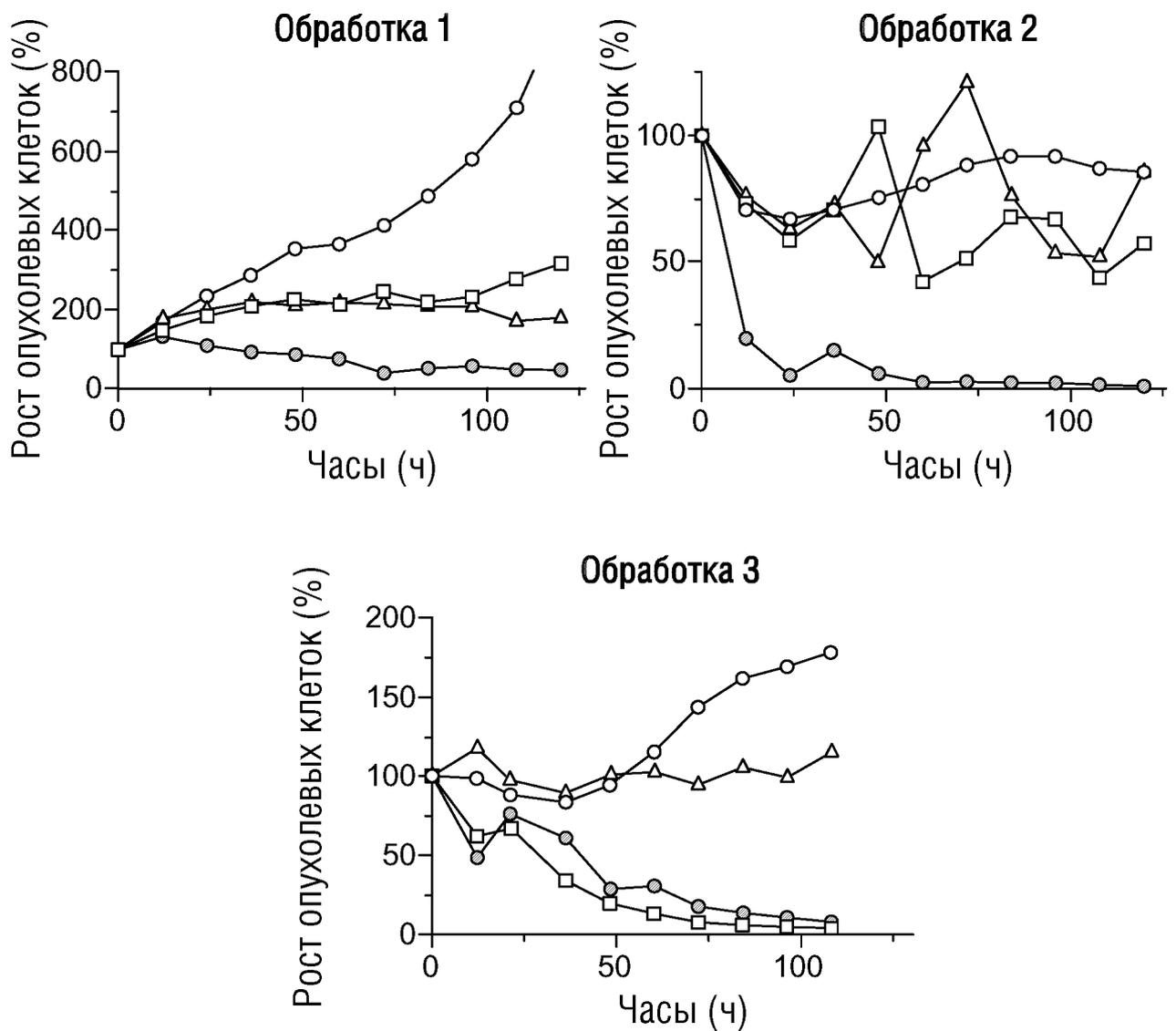
ФИГ.7

Предполагаемый молекулярный путь развития синдрома высвобождения цитокинов, опосредованного IL-2

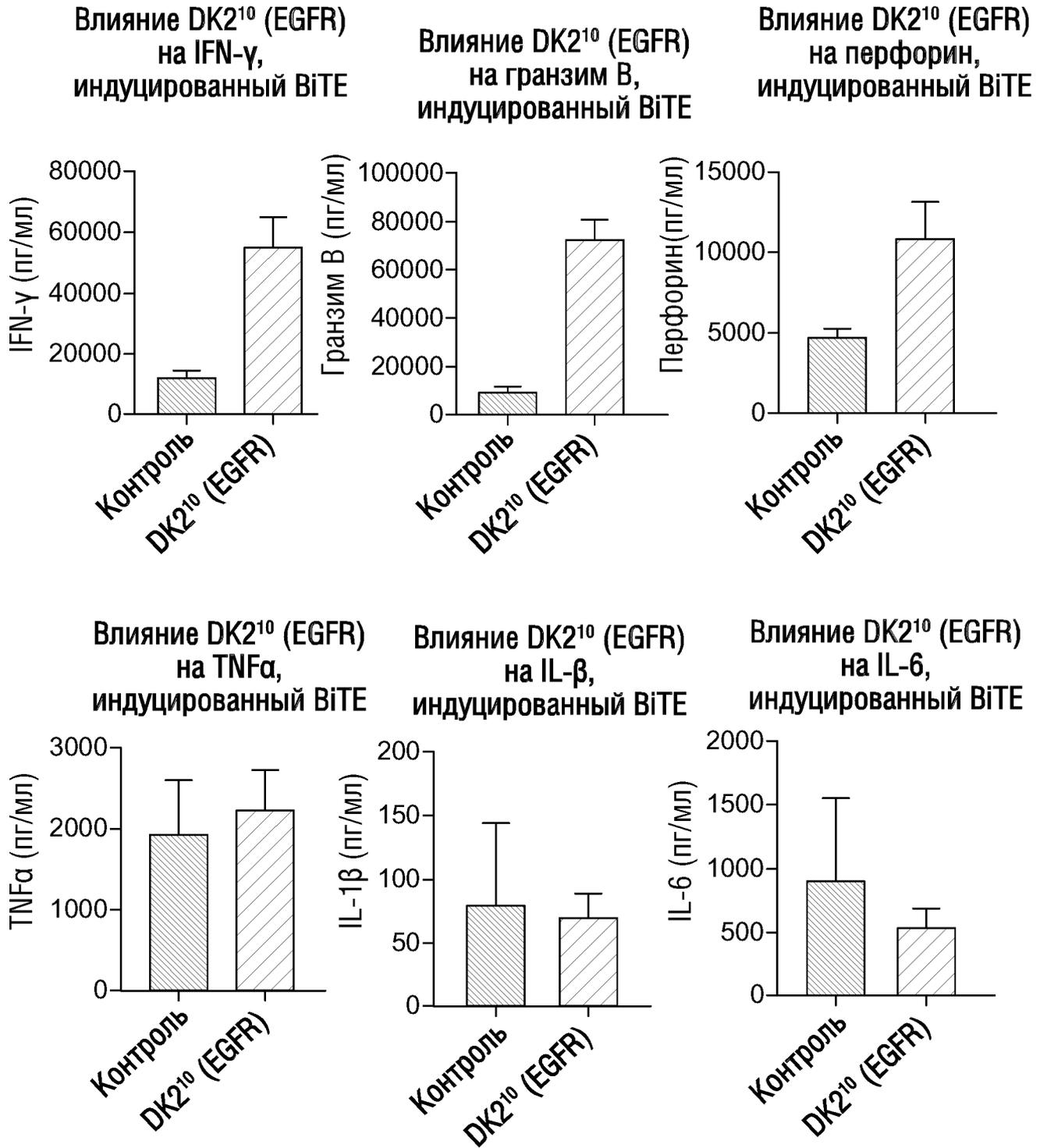


## ФИГ.8

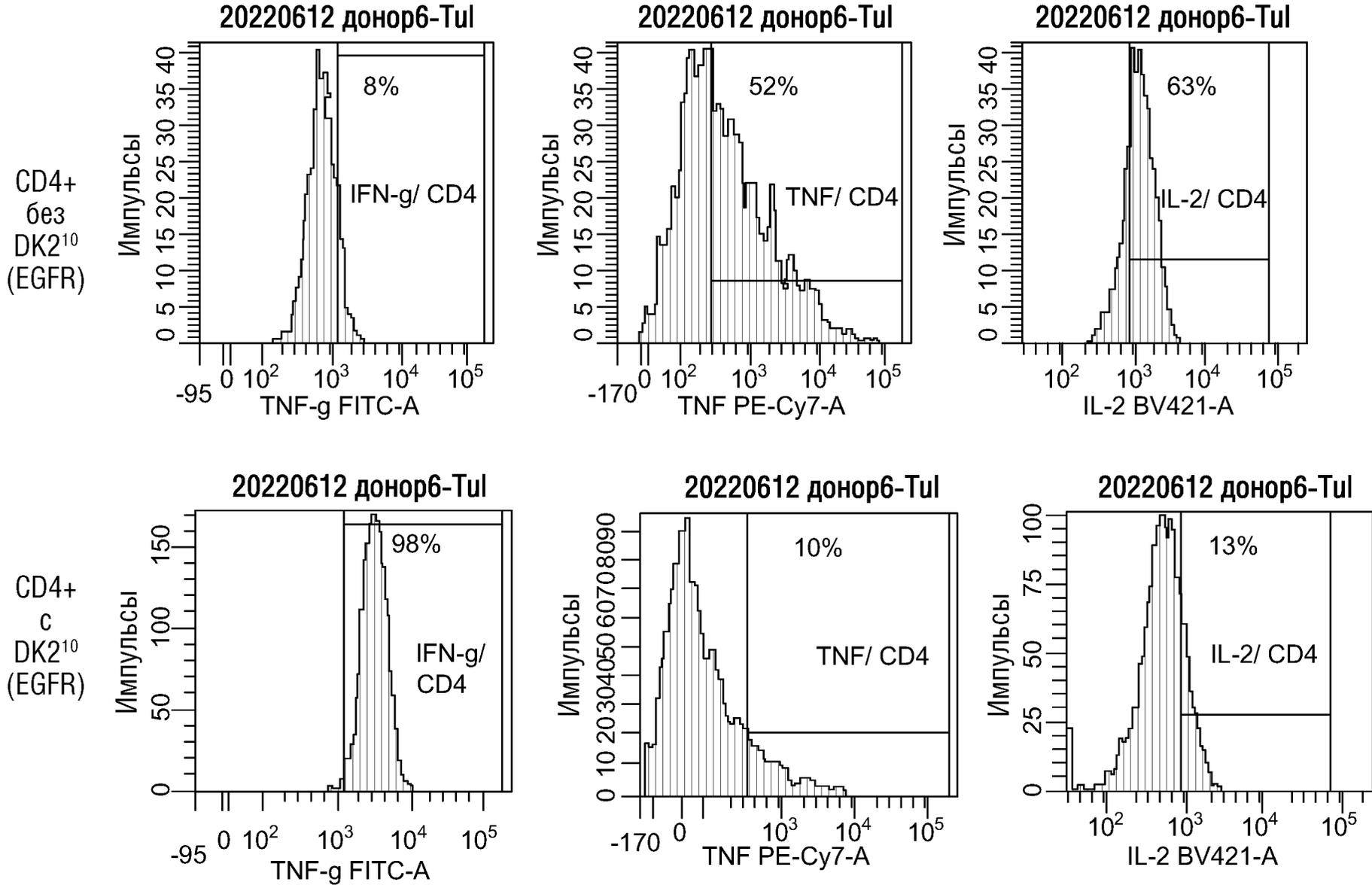
- Без обработки
- 100 нг/мл DK2<sup>10</sup> (EGFR)
- △ 0,1 нг/мл CD19 BiTE
- Комбинация



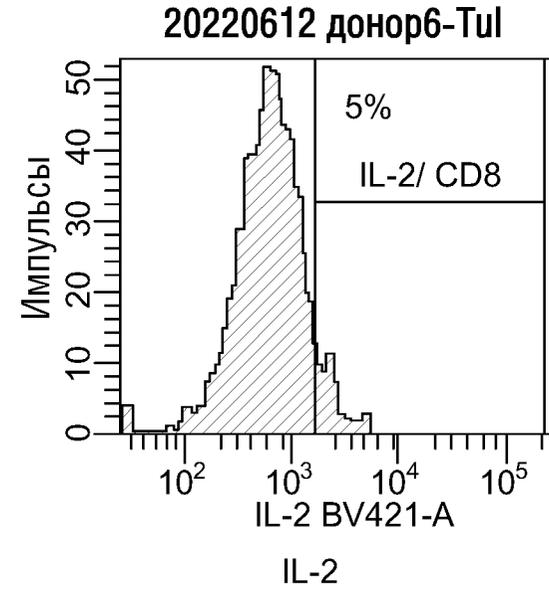
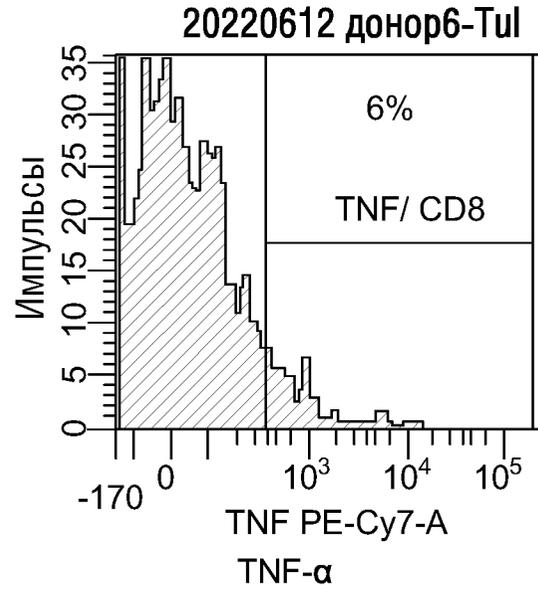
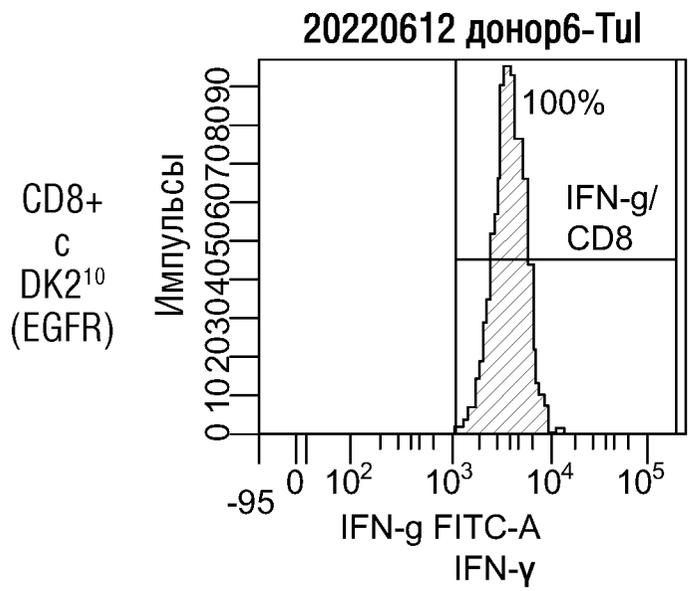
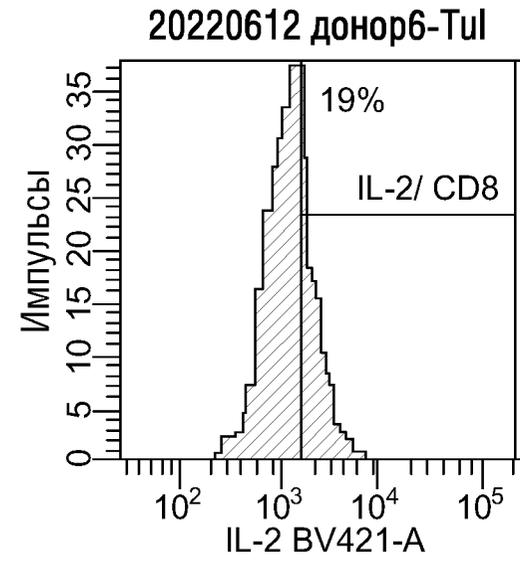
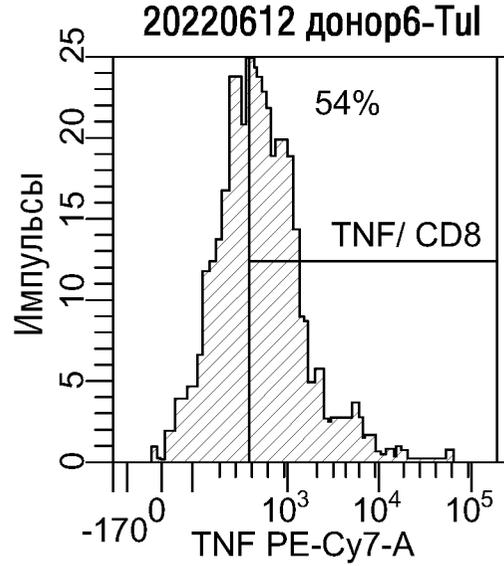
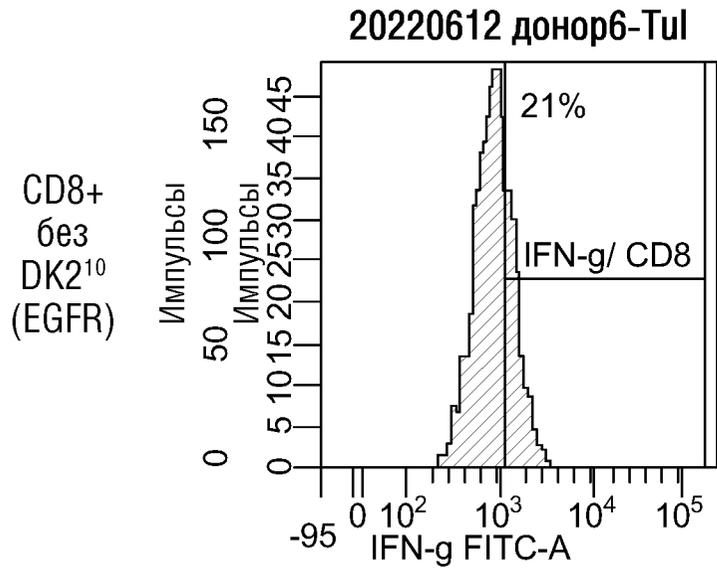
## ФИГ.9



# ФИГ.10

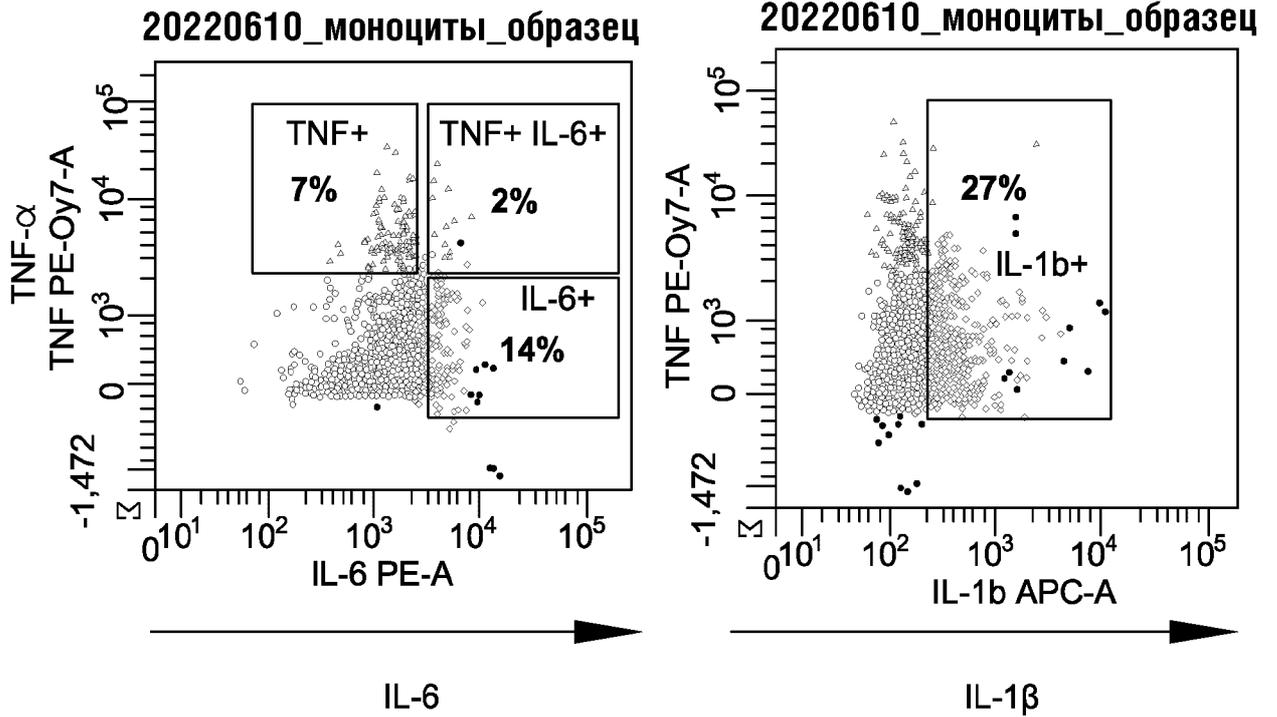


# ФИГ.10, продолжение



ФИГ.10, продолжение

APC без DK2<sup>10</sup> (EGFR)



APC с DiaKine™

