(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202192601 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.27

(22) Дата подачи заявки
2020.03.30

(51) Int. Cl. ***A61K 47/68*** (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 17/02 (2006.01)

(54) ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

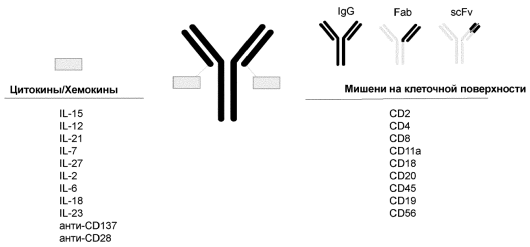
(31) **62/826,923; 62/881,300; 62/884,540; 62/930,363**
(32) **2019.03.29; 2019.07.31; 2019.08.08; 2019.11.04**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/025844**
(87) **WO 2020/205808 2020.10.08**

(71) Заявитель:
ТОРК ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Джоунс Дуглас (US)

(74) Представитель:
Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М., Христофоров А.А., Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова М.Ю., Парамонова К.В., Джермакян Р.В., Прищепный С.В. (RU)

(57) Описаны комбинированные виды терапии для лечения рака, включающие иммуностимулирующие слитые молекулы, которые включают фрагмент для нацеливания на иммунную клетку и цитокиновую молекулу; а также иммунная клетка, нагруженная белковыми наногелями, которые включают обратимо поперечно связанную цитокиновую молекулу и полимер, а также лекарство и составы на их основе, и способы их применения и получения.



202192601 A1

202192601 A1

ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка притязает на приоритет предварительной заявки на патент США 62/826,923, поданной 29 марта 2019 г., 62/881,300, поданной 31 июля 2019 г., 62/884,540, поданной 8 августа 2019 г. и 62/930,363, поданной 4 ноября 2019 г., каждая из которых полностью приведена здесь в качестве ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Текстовый файл в формате ASCII, подаваемый с помощью EFS-Web, имеющий имя "174285_011704_sequence.txt", созданный 30 марта 2020 г. и имеющий размер 231,284 байтов полностью включен здесь в качестве ссылки.

ОБЛАСТЬ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение в целом относится к иммунотерапевтическим композициям. Также приводятся способы их получения.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Потенциал иммунотерапии в плане лечения рака и других заболеваний и расстройств еще предстоит полностью исследовать. Многие ранние успехи в плане лечения рака были основаны на видах лечения с использованием одного агента, которые являются успешными лишь у малой доли пациентов с частым возникновением рецидивов. Разработка комбинированных видов лечения с использованием клеточной терапии, например TIL, TCR CAR-T-клеток в комбинации с иммунотерапевтическим средствами может являться непредсказуемой и связанной с повышенной токсичностью и более узкими диапазонами эффективности. Разработка комбинированных видов лечения, даже если они основаны на существующих лекарствах, действительно оказалась трудной задачей. Например, ранние попытки в области комбинированных видов лечения для включения IL-12 или IL-15 и Т-клеток включали, по меньшей мере, три исследования, которые были прерваны, два из которых были связаны с токсичностью (см. NCT01236573, NCT01369888, и NCT01457131).

При использовании в рамках лечения рака цитокины, такие как IL-12 и IL-15, могут действовать в качестве иммуномодулирующих агентов, которые обладают противоопухолевыми эффектами и могут повышать иммунный ответ на некоторые типы опухолей. Однако быстрое выведение из крови и недостаток специфичности в плане опухолей требует системного введения высоких доз цитокина для достижения концентрации цитокина в области опухоли и других релевантных тканей (например лимфатических узлов и селезенки), являющейся достаточной для активации иммунного ответа или достижения противоопухолевого эффекта. Данные высокие уровни системного цитокина могут приводить к тяжелой токсичности и неблагоприятным

реакциям. Было показано, что как IL-12, так и IL-15 индуцируют значительную токсичность в виде самостоятельных агентов.

Таким образом, все еще сохраняется потребность в композициях на основе цитокинов и комбинированных видах лечения с усовершенствованными свойствами, например имеющих более высокую терапевтическую эффективность и пониженное количество и тяжесть побочных эффектов данных продуктов (например токсичность и разрушение неопухолевых клеток, помимо прочих).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Здесь описаны новые иммунотерапевтические средства для лечения заболеваний, таких как рак, с использованием комбинаций лекарств. Было обнаружено, что подобные новые комбинированные виды лечения демонстрируют неожиданные преимущества в виде сниженной токсичности за счет, например обеспечения минимизации дозировок (синергичной активности) и/или результатов лечения за счет, например, повышения эффективности (синергичной эффективности). Действительно, в то время как каждое лекарство комбинаций по изобретению по отдельности продуцирует одинаковые или характерные эффекты, при введении в виде комбинации они демонстрируют намного более значительные эффекты. Подобный повышенный эффект превышает эффект, который может быть спрогнозирован или являться ожидаемым на основе эффективности лекарств по отдельности. Таким образом, данный комбинированный эффект является не только синергичным, но также внезапным и неожиданным. Для оценки синергичных эффектов комбинаций лекарств по изобретению могут быть использованы различные способы и инструменты. См., например, Tallarida, R., Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism, *Genes & Cancer*, 2(11) 1003-1008, 2011; Meyer, C., et al., Quantifying Drug Combination Synergy Along Potency and Efficacy Axes, *Cell Systems*, 8, 97-108, Feb. 2, 2019; и Ianevski, A., SynergyFinder: a Web Application for Analyzing Drug Combination Dose-Response Matrix Data, *Bioinformatic*s, 33(15), 2413-15, 2017; каждый из которых полностью приведен здесь в качестве ссылки. Различные контрольные модели для получения сравнительных индексов взаимодействия и комбинирования для количественного анализа наблюдаемых эффектов, например нулевого взаимодействия, синергизма или антагонизма в рамках комбинаций лекарств, описаны, например, в Schindler, M.Theory of Synergistic Effects: Hill-type Response Surfaces as 'Null-interaction' Models for Mixtures, *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 14:15, 2017, который полностью приведен здесь в качестве ссылки.

Более конкретно, настоящее изобретение предусматривает, *inter alia*, терапевтическую (например предназначенную для иммунотерапии рака) композицию, включающую: первую иммунную клетку, имеющую поверхность, нагруженную множеством белковых наногелей, и вторую иммунную клетку, имеющую поверхность, нагруженную множеством иммуностимулирующих слитых молекул (IFM, данный термин используется взаимозаменяемым образом с термином "связанный продукт слияния" или TF). В некоторых вариантах

осуществления первая иммунная клетка и вторая иммунная клетка представляют собой одну и ту же клетку, то есть белковые наногели и IFM могут быть совместно загружены на одну клетку. В некоторых вариантах осуществления первая иммунная клетка и вторая иммунная клетка представляют собой различные клетки, при этом данные две клетки (или популяции клеток) могут быть введены совместно или последовательно (с/без некоторого промежутка времени между ними). В другом варианте осуществления IFM может быть доставлена в "свободной" форме, то есть в растворе, который не связан с клеткой. Подобная свободная доставка может осуществляться системно или внутрь опухоли и может быть реализована одновременно с доставкой нагруженной наногелями иммунной клетки до или после доставки нагруженной наногелями иммунной клетки. Введение нагруженных наногелями клеток и/или IFM (в связанном с клеткой виде и/или свободной форме) может представлять собой неоднократное введение. Было обнаружено, что подобное совместное введение наногеля и IFM продуцирует неожиданную и внезапную синергию. При данном синергичном эффекте может быть достигнута более высокая эффективность при более низких дозировках (для одного или обоих соединений) и/или пониженные уровни токсичности. Может присутствовать более широкое окно дозирования с более широкими рамками между эффективностью и токсичностью, то есть более широкий диапазон для оптимизации дозировки на основе эффективности перед достижением максимального, являющегося нежелательным уровня токсичности.

В частности, было неожиданно обнаружено, что противоопухолевая активность наногеля на основе IL-15 (мультимера, включающего химически поперечно связанные IL-15/IL-15 Rα/Fc гетеродимеры (IL15-Fc) и полимер) и связанного продукта слияния IL-12 (одноцепочечный IL-12p70, слитый с гуманизированным Fab против CD45), загруженных на поверхность клеток, при их комбинировании продуцирует улучшенный терапевтически профиль с синергичным эффектом вместо исключительно аддитивного. То есть существует статистически значимое различие (повышение) в плане эффективности комбинации наногеля на основе IL-15 и связанного продукта слияния IL-12 по сравнению с тем, что ожидалось бы в случае, если эффективность была бы исключительно аддитивной.

В некоторых вариантах осуществления каждый из белковых наногелей может включать множество терапевтических белковых мономеров, обратимо поперечно связанных друг с другом с помощью множества биорасщепляемых поперечных линкеров. В некоторых вариантах осуществления белковый наногель имеет размер от 30 нм до 1000 нм в диаметре при измерении с помощью динамического рассеяния света. В некоторых вариантах осуществления поперечный линкер расщепляется после введения нуждающемуся в этом субъекту при физиологических условиях с высвобождением мономеров терапевтического белка из белкового наногеля. В некоторых вариантах осуществления белковый наногель дополнительно включает модификацию поверхности, например поликатион, для обеспечения связывания белкового наногеля с первой иммунной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления мономеры терапевтического белка могут включать

одну или несколько цитокиновых молекул и/или одну или несколько костимулирующих молекул, при этом:

(i) указанная одна или несколько цитокиновых молекул выбраны из IL-15, IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, IL-4, IL-1альфа, IL-1бета, IL-5, IFNгамма, TNFa, IFNальфа, IFNбета, GM-CSF, или GCSF; а

(ii) указанная одна или несколько костимулирующих молекул выбраны из CD137, OX40, CD28, GITR, VISTA, антитела против CD40, или CD3.

В некоторых вариантах осуществления поперечный линкер может представлять собой расщепляемый или гидролизуемый линкер. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер представляет собой редокс-чувствительный линкер. Примеры линкеров, а также способов получения и применения различных линкеров (например, для получения наногелей) описаны в PCT заявке PCT/US2018/049594, публикации заявки на патент США 2017/0080104, патенте США 9603944 и публикации заявки на патент США 2014/0081012, все из которых полностью приведены здесь в качестве ссылки.

В определенных вариантах осуществления каждая IFM может быть сконструирована для включения иммуностимулирующей цитокиновой молекулы и фрагмента для нацеливания (например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента), имеющего аффинность к антигену на поверхности иммунной клетки, при этом иммуностимулирующая цитокиновая молекула является функционально связанной с фрагментом для нацеливания. Примеры IFM (также обозначаемых как "связанный продукт слияния" или TF) описаны в международных PCT публикациях WO 2019/010219 и WO 2019/010222, каждая из которых полностью приведена здесь в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующая цитокиновая молекула выбрана из одной или нескольких из IL-15, IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, или IL-27, или их вариантных форм. Антиген может быть выбран из одного или нескольких из CD45, CD4, CD8, CD3, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD25, CD127, CD19, CD20, CD22, HLA-DR, CD197, CD38, CD27, CD196, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CD84, CD229, CCR1, CCR5, CCR4, CCR6, CCR8, CCR10, CD16, CD56, CD137, OX40, или GITR.

В одном варианте осуществления IFM содержит IL-12, например одноцепочечный IL-12p70, слитый с гуманизированным Fab против CD45. Одноцепочечный IL-12p70 может содержать IL-12B и IL-12A, соединенные гибким линкером. В рамках одного примера "связанный продукт слияния IL-12" (одноцепочечный IL-12p70, слитый с гуманизированным Fab против CD45) может быть рекомбинантно экспрессирован, очищен и затем связан с иммунными клетками, экспрессирующими CD45, такими как Т-клетки, для получения Т-клеток с загруженными на поверхность иммунными агонистами.

В различных вариантах осуществления первая и вторая иммунная клетка могут быть получены и введены по отдельности (например последовательно) пациенту, который нуждается, например, в иммунотерапии рака. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут

быть получены из популяции Т-клеток, которые были обогащены или обучены для обладания специфичностью против одного или нескольких опухоль-ассоциированных антигенов (TAA).

Другой аспект относится к способу осуществления иммунотерапии рака, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту множества иммунных клеток, каждая из которых нагружена первым множеством белковых наногелей и вторым множеством иммуностимулирующих слитых молекул (IFM).

Дополнительный аспект относится к способу осуществления иммунотерапии рака, включающему: введение нуждающемуся в этом пациенту первого множества иммунных клеток, каждая из которых нагружена множеством белковых наногелей; и введение пациенту второго множества иммунных клеток, каждая из которых нагружена множеством иммуностимулирующих слитых молекул (IFM).

В различных вариантах осуществления иммунотерапия рака предназначена для лечения рака, выбранного из рака груди, простаты, легкого, яичника, шейки, кожи, меланомы, рака толстой кишки, желудка, печени, пищевода, почки, горла, щитовидной железы, поджелудочной железы, яичка, головного мозга, и рака костей, лейкемии, хронического лимфолейкоза, базально-клеточной карциномы, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, рака головного мозга и центральной нервной системы (ЦНС), хориокарциномы, колоректального рака, рака соединительной ткани, рака эндометрия, рака глаза, рака головы и шеи, рака желудка, интраэпителиального новообразования, рака гортани, лимфомы, нейробластомы, рака губы, языка, рта и глотки, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, рака прямой кишки, саркомы, рака кожи, рака щитовидной железы, и рака матки.

Еще один аспект относится к способу индуцирования синергичной экспансии $CD8^+$ Т-клеток человека в рамках иммунотерапевтического курса лечения человека, при этом указанный курс лечения состоит из совместного введения, по меньшей мере, двух иммунных агонистов, при этом первый иммунный агонист включает Т-клетку, нагруженную связанным продуктом слияния IL-12, а второй иммунный агонист включает Т-клетку, нагруженную наногелем на основе IL-15, при этом совместное введение подобных иммунных агонистов приводит к синергичной экспансии указанных $CD8^+$ Т-клеток человека. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка, нагруженная связанным продуктом слияния IL-12, Т-клетка, нагруженная наногелем на основе IL-15, или обе подобные Т-клетки являются специфичными в отношении одного или нескольких опухоль-ассоциированных антигенов.

В некоторых вариантах осуществления опухоль-ассоциированный антиген представляет собой антиген, экспрессируемый при раке, выбранном из рака груди, простаты, легкого, яичника, шейки, кожи, меланомы, рака толстой кишки, желудка, печени, пищевода, почки, горла, щитовидной железы, поджелудочной железы, яичка, головного мозга, и рака костей, лейкемии, хронического лимфолейкоза, базально-клеточной карциномы, рака желчных протоков, рака

мочевого пузыря, рака головного мозга и центральной нервной системы (ЦНС), хориокарциномы, колоректального рака, рака соединительной ткани, рака эндометрия, рака глаза, рака головы и шеи, рака желудка, интраэпителиального новообразования, рака гортани, лимфомы, нейробластомы, рака губы, языка, рта и глотки, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, рака прямой кишки, саркомы, рака кожи, рака щитовидной железы, и рака матки.

В некоторых вариантах осуществления связанный продукт слияния IL-12 включает гуманизированное антитело против CD45 или фрагмент антитела, выбранный из Fab, $F(ab')_2$, Fd, и Fv. В некоторых вариантах осуществления наногель на основе IL-15 включает множество поперечно связанных мономеров IL-15-Fc-слитого белка.

Также здесь предусмотрен способ лечения рака, включающий одновременное введение нуждающемуся в этом млекопитающему синергичного терапевтически эффективного количества двух иммунных агонистов, при этом первый иммунный агонист включает Т-клетку, нагруженную связанным продуктом слияния IL-12, а второй иммунный агонист включает Т-клетку, нагруженную наногелем на основе IL-15. В некоторых вариантах осуществления указанный рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления указанное лечение рака дополнительно включает противопролиферативный цитотоксический агент либо самостоятельно, или в комбинации с радиотерапией.

В некоторых вариантах осуществления первый и второй иммунный агонист вводят при соотношении одного иммунного агониста и другого иммунного агониста 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70; 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100, 1:120, 1:130, 1:140, 1:150, 1:160, 1:170, 1:180, 1;190, 1:200, 1:500, 1:1000. 1:5000, 1:10,000, 1:100,000, 2:3, 3:4, 2:5, 3:5, 3:10, 7:10, 9:10, 2:15, 4:15, 6:15, 7:15, 8:15, 11:15, 13:15, 14:15, 3:20, 7:20, 9:20, 11:20, 13:20, 17:20, 19:20, 1:25, 2:25, 4:25, 6:25, 7:25, 8: 25, 10:25, 11:25, 12:25, 13:25, 14:25, 16:25, 17:25, 18:25, 19:25, 21:25, 22:25, 23:25, или 24:25.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один из первого и второго иммунного агониста вводят при дозировке около 20 миллионов клеток/$м^2$, 40 миллионов клеток/$м^2$, 100 миллионов клеток/$м^2$, 120 миллионов клеток/$м^2$, 200 миллионов клеток/$м^2$, 360 миллионов клеток/$м^2$, 600 миллионов клеток/$м^2$, 1 миллиард клеток/$м^2$, 1,5 миллиарда клеток/$м^2$, 10^6 клеток/$м^2$, около 5 x 10^6 клеток/$м^2$, около 10^7 клеток/$м^2$, около 5 x 10^7 клеток/$м^2$, около 10^8 клеток/$м^2$, около 5 x 10^8 клеток/$м^2$, около 10^9 клеток/$м^2$, около 5 x 10^9 клеток/$м^2$, около 10^{10} клеток/$м^2$, около 5 x 10^{10} клеток/$м^2$, или около 10^{11} клеток/$м^2$.

В одном аспекте предусмотрена иммуностимулирующая слитая молекула, включающая:

(a) иммуностимулирующую цитокиновую молекулу; и

(b) фрагмент для нацеливания на иммунную клетку, включающий антигенсвязывающий фрагмент антитела, имеющего аффинность в отношении антигена на

поверхности иммунной клетки-мишени,

при этом иммуностимулирующая цитокиновая молекула функционально связана с антигенсвязывающим фрагментом.

В другом аспекте предусмотрена иммуностимулирующая слитая молекула, включающая:

(a) иммуностимулирующую цитокиновую молекулу; и

(b) фрагмент для нацеливания на иммунную клетку, включающий антитело, имеющее антигенсвязывающий участок, являющийся специфичным в отношении антигена на поверхности иммунной клетки-мишени, при этом антитело включает легкую цепь, имеющую C-конец и N-конец, и тяжелую цепь, имеющую C-конец и N-конец, при этом легкая цепь связана с тяжелой цепью с помощью дисульфидной связи,

при этом иммуностимулирующая цитокиновая молекула функционально связана с антителом на C-конце легкой цепи, N-конце легкой цепи, или N-конце тяжелой цепи.

В другом аспекте предусмотрена иммуностимулирующая слитая молекула, включающая:

(a) молекулу IL-12; и

(b) фрагмент для нацеливания на T-клетку, включающий Fab-фрагмент, имеющий антигенсвязывающий участок, являющийся специфичным в отношении рецептора клеточной поверхности CD45.

при этом Fab-фрагмент и молекула IL-12 функционально связаны вместе в виде слитой молекулы.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку нацелен на T-клетку, выбранную из эффекторной T-клетки, CD4+ T-клетки, CD8+ T-клетки, и CTL. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой рецептор CD45, экспрессируемый на клеточной поверхности T-клетки. В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку включает Fab-фрагмент, F(ab')2, Fv, одноцепочечный Fv антител против CD45 BC8, 4B2, GAP8.3 или 9.4, или гуманизированную версию любого из них. В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующая цитокиновая молекула включает IL-12, одноцепочечный IL-12, субъединицу IL-12, или вариантную форму любого из них. Иммуностимулирующая слитая молекула может дополнительно включать одноцепочечный Fv, имеющий аффинность в отношении антигена на поверхности иммунной клетки-мишени, при этом необязательно одноцепочечный Fv имеет аффинность в отношении того же антигена, что и антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечный Fv имеет аффинность в отношении другого антигена, чем антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab-фрагмент, который необязательно включает фрагмент в виде легкой цепи и тяжелой цепи, необязательно связанный дисульфидной связью, и при этом иммуностимулирующая цитокиновая молекула функционально связана с Fab-фрагментом на C-конце легкой цепи, N-конце легкой цепи, C-конце тяжелой цепи, или N-конце тяжелой цепи.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующая цитокиновая молекула функционально связана с антигенсвязывающим фрагментом с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления данный линкер выбран из расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, пептидного линкера, гибкого линкера, жесткого линкера, спирального линкера или неспирального линкера, например представляет собой пептидный линкер, включающий Gly и Ser. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой $(GGGS)_N$ (SEQ ID NO: 124) или $(GGGGS)_N$ (SEQ ID NO: 125) линкер, при этом $_N$ обозначает количество повторов мотива и представляет собой целое число, выбранное из 1-10.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент имеет аффинность в отношении рецептора CD45 и включает:

(a) вариабельную аминокислотную последовательность легкой цепи, соответствующую вариабельному домену в части антитела согласно аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 82, или аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 85%, 90%, 95% или более высокую идентичность относительно вариабельного домена согласно SEQ ID NO: 82; и/или

(b) вариабельную аминокислотную последовательность тяжелой цепи, соответствующую вариабельному домену согласно аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 79, или аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 85%, 90%, 95% или более высокую идентичность относительно вариабельного домена согласно SEQ ID NO: 79.

В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула включает молекулу IL-12, имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности, показанной на SEQ ID NO: 50, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 95% или более высокую идентичность относительно цитокиновой части согласно SEQ ID NO: 50.

В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула включает одноцепочечную молекулу IL-12, имеющую субъединицу IL-12A, связанную с субъединицей IL-12B через линкер, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности, показанной на SEQ ID NO: 70, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 95% или более высокую идентичность относительно цитокиновой части согласно SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления линкер включает пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 36, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 95% или более высокую идентичность относительно цитокиновой части согласно SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления одноцепочечный Fv имеет аминокислотную последовательность, соответствующую части в виде Fv согласно SEQ ID NO: 80, или

аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 95% или более высокую идентичность относительно части в виде Fv согласно SEQ ID NO: 80.

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент включает фрагмент в виде легкой цепи, имеющий вариабельный домен (VL) и константный домен (CL), и фрагмент в виде тяжелой цепи, имеющий вариабельный домен (VH) и константный домен (CH1), при этом фрагменты в виде легкой цепи и тяжелой цепи необязательно соединены дисульфидной связью и при этом каждый из фрагментов в виде легкой цепи и тяжелой цепи включает С-конец и N-конец. В некоторых вариантах осуществления молекула IL-12 функционально связана с С-концом или N-концом фрагмента в виде легкой цепи или тяжелой цепи.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующая слитая молекула дополнительно включает пептидный линкер, имеющий первый конец, слитый с молекулой IL-12, и второй конец, слитый с Fab-фрагментом, тем самым функционально связывая молекулу IL-12 и Fab-фрагмент.

Также здесь предусмотрена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая любую одну из описанных здесь иммуностимулирующих слитых молекул.

Также здесь предусмотрен вектор, включающий одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, соответствующий аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36, 50, 70, 79, 80, или 82, или аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 85%, 90%, 95%, или более высокую идентичность относительно SEQ ID NO: 36, 50, 70, 79, 80, или 82.

Также здесь предусмотрена клетка-хозяин, включающая описанную здесь молекулу нуклеиновой кислоты или вектор.

Дополнительный аспект относится к модифицированной иммунной клетке, включающей:

(a) иммуностимулирующую слитую молекулу, включающую:

(i) иммуностимулирующую цитокиновую молекулу; и

(ii) фрагмент для нацеливания на иммунную клетку, имеющий аффинность в отношении антигена клеточной поверхности; и

(b) иммунную клетку-мишень, экспрессирующую или иным образом демонстрирующую антиген клеточной поверхности,

при этом иммуностимулирующая слитая молекула связана с поверхностью иммунной клетки за счет взаимодействия с антигеном клеточной поверхности.

Другой аспект относится к модифицированной иммунной клетке, включающей здоровую и/или незлокачественную иммунную клетку и описанную здесь иммуностимулирующую слитую молекулу, которая с ней связана.

Другой аспект относится к способу получения модифицированных иммунных клеток, включающему:

(a) получение популяции иммунных клеток; и

(b) инкубирование описанной здесь иммуностимулирующей слитой молекулы с популяцией иммунных клеток для обеспечения нацеленного связывания иммуностимулирующей

слитой молекулы с ними, тем самым обеспечивая получение популяции иммунных клеток, имеющих иммуностимулирующие слитые молекулы, связанные с клеточной поверхностью.

Другой аспект относится к композиции для применения в рамках терапии на основе иммунных клеток, при этом композиция включает:

(a) множество иммуностимулирующих слитых молекул, при этом каждая слитая молекула включает

(i) иммуностимулирующую цитокиновую молекулу; и

(ii) фрагмент для нацеливания на иммунную клетку, имеющий аффинность в отношении антигена клеточной поверхности Т-клетки;

(b) популяцию Т-клеток, экспрессирующих или иным образом демонстрирующих антиген клеточной поверхности, при этом множество иммуностимулирующих слитых молекул связаны с поверхностью Т-клеток за счет взаимодействия с антигеном клеточной поверхности; и

(c) фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель, или стабилизатор.

Другой аспект относится к фармацевтической композиции, включающей описанную здесь иммуностимулирующую слитую молекулу и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель, или стабилизатор.

Также здесь предусмотрен способ лечения рака у представляющего собой человека субъекта, при этом способ включает введение представляющему собой человека субъекту клеточной терапевтической композиции, при этом композиция включает:

(a) множество иммуностимулирующих слитых молекул, при этом каждая слитая молекула включает

(i) иммуностимулирующую цитокиновую молекулу; и

(ii) фрагмент для нацеливания на иммунную клетку, имеющий аффинность в отношении антигена клеточной поверхности Т-клетки; и

(b) популяцию Т-клеток, которые направляются к раковым клеткам или ткани, в которой присутствуют раковые клетки, и при этом Т-клетки экспрессируют антиген клеточной поверхности,

при этом множество иммуностимулирующих слитых молекул связаны с поверхностью Т-клеток, и при этом цитокиновая молекула действует *in vivo* в отношении популяции Т-клеток и/или других иммунных клеток в представляющем собой человека субъекте для стимулирования иммунного ответа против рака.

В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток включает первичные Т-клетки; подвергнутые экспансии первичные Т-клетки; Т-клетки, полученные из PBMC клеток; Т-клетки, полученные из клеток пуповинной крови; Т-клетки, являющиеся аутологичные относительно представляющего собой человека субъекта; Т-клетки, являющиеся аллогенными относительно представляющего собой человека субъекта; генетически модифицированные Т-клетки; CAT-Т-клетки; эффекторные Т-клетки; активированные Т-клетки; CD8+ Т-клетки; CD4+ Т-клетки; и/или CTL. В некоторых вариантах осуществления клеточную терапевтическую

композицию вводят представляющему собой человека субъекту в рамках курса клеточной терапии, выбранной из адоптивной клеточной терапии, терапии на основе CAR-T-клеток, терапии на основе модифицированных TCR-T-клеток, терапии на основе тренированных против антигена Т-клеток, или терапии на основе обогащенных антигенспецифических Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула представляет собой IL-2 и/или IL-15. Фрагмент для нацеливания на иммунную клетку может включать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD45. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой здоровую и/или незлокачественную иммунную клетку. В различных вариантах осуществления IFM может дополнительно включать линкер для функционального связывания фрагмента для нацеливания и цитокиновой молекулы. Например, линкер может быть выбран из: расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, пептидного линкера, гибкого линкера, жесткого линкера, спирального линкера или неспирального линкера, предпочтительно пептидного линкера, который необязательно включает Gly и Ser, при этом предпочтительно пептидный линкер представляет собой $(GGGS)_N$ или $(GGGGS)_N$ линкер, при этом $_N$ обозначает количество повторов мотива и представляет собой целое число, выбранное из 1-10.

Также здесь предусмотрена фармацевтическая композиция, включающая описанные здесь IFM и/или белковые наногели и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель, или стабилизатор.

Другой аспект относится к модифицированной иммунной клетке (например для клеточной терапии), включающей здоровую и/или незлокачественную иммунную клетку и описанные здесь IFM и/или белковые наногели, связанные с ней или нацеленные на нее.

В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия может применяться для лечения рака, предпочтительно рака в виде солидной опухоли или гематологического рака.

В различных вариантах осуществления клеточная терапия может быть выбрана из адаптивной клеточной терапии, терапии на основе CAR-T-клеток, терапии на основе модифицированных TCR Т-клеток, терапии на основе опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, терапии на основе обученных против антигена Т-клеток, терапии на основе обогащенных антиген-специфичных Т-клеток, или терапии на основе NK-клеток. В определенных вариантах осуществления множество здоровых и/или незлокачественных иммунных клеток являются аутологичными относительно субъекта.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий фрагмент представляет собой цитокиновую молекулу. В определенных вариантах осуществления цитокиновая молекула включает цитокин, например включает цитокин, выбранный из одного или нескольких из IL-2, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, или IL-27, включая их вариантные формы (например производное цитокина, комплекс, включающий цитокиновую молекулу с полипептидом, например комплекс в виде цитокинового рецептора, и другие его агонистные формы). В одном варианте осуществления цитокиновая молекула представляет собой молекулу IL-15.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку способен связываться с мишенью на поверхности иммунной клетки, тем самым обеспечивая нацеливание иммуностимулирующего фрагмента на иммунную клетку, например иммунную эффекторную клетку (например лимфоцит). Без связи с теорией считается, что связывание фрагмента для нацеливания на иммунную клетку с мишенью на поверхности иммунной клетки повышает концентрацию, например концентрацию с течением времени, иммуностимулирующего фрагмента, например цитокиновой молекулы, с соответствующим ему рецептором, например цитокиновым рецептором, на поверхности иммунной клетки, например по сравнению со связыванием свободной цитокиновой молекулы с ее цитокиновым рецептором. В некоторых вариантах осуществления мишень на поверхности иммунной клетки в большом количестве присутствует на поверхности иммунной клетки (например ее количество превышает количество рецепторов для цитокиновой молекулы, присутствующей на поверхности иммунной клетки). В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку может быть выбран из молекулы антитела или молекулы лиганда, которая связывается с мишенью на поверхности иммунной клетки, например мишенью, выбранной из CD4, CD8, CD11a, CD19, CD20 или CD45. В одном варианте осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку включает молекулу антитела или молекулу лиганда, которая связывается с CD45. В рамках вариантов осуществления считается, что фрагмент для нацеливания специфичным образом доставляет и/или повышает концентрацию цитокиновой молекулы на поверхности иммунной клетки, тем самым приводя к одному или нескольким из: повышения локализации, распределения и/или увеличения доступности цитокиновой молекулы на клеточной поверхности. В рамках вариантов осуществления IFM по существу не препятствует связанной с передачей сигнала функции цитокиновой молекулы. Подобный эффект нацеливания приводит к локализованному и пролонгированному стимулированию пролиферации и активации иммунных клеток, тем самым индуцируя контролируемое повышение и активацию иммунного ответа.

Соответственно, в одном аспекте изобретение предусматривает иммуностимулирующую слитую молекулу (IFM), включающую иммуностимулирующий фрагмент (например цитокиновую молекулу, агонист костимулирующей молекулы, или ингибитор отрицательного иммунного регулятора) и фрагмент для нацеливания на иммунную клетку.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий фрагмент, например цитокиновая молекула, соединен, например ковалентно соединен, с фрагментом для нацеливания на иммунную клетку (например напрямую или не напрямую, например с помощью пептидного линкера). В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку IFM связывается с мишенью на поверхности, например рецептором поверхности, на иммунной клетке, например иммунной эффекторной клетке. В рамках вариантов осуществления IFM связывает, например связывает вместе иммуностимулирующий фрагмент, например цитокиновую молекулу, и фрагмент для нацеливания на иммунную клетку с иммунной клеткой, например эффекторной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления IFM повышает

концентрацию цитокиновой молекулы IFM (например концентрацию цитокиновой молекулы IFM с течением времени, например в течение определенного периода времени) на поверхности иммунной клетки. В рамках вариантов осуществления повышенная концентрация цитокиновой молекулы IFM на поверхности иммунной клетки приводит к одному или нескольким из следующих последствий: (i) повышенной локализации (например уровню) цитокиновой молекулы IFM на поверхности иммунной клетки, например по сравнению со свободной цитокиновой молекулой; (ii) повышенной доступности на поверхности клетки (например концентрации (например уровню или количеству) и/или продолжительности воздействия) цитокиновой молекулы IFM, например по сравнению со свободной цитокиновой молекулой; (iii) повышению степени передачи сигнала цитокинов в популяции-мишени иммунных клеток, например популяции клеток, экспрессирующих предварительно выбранную мишень на поверхности, например мишень на поверхности как описано здесь, например по сравнению со свободной цитокиновой молекулой; (iv) пролонгированию передачи сигнала цитокинов в популяции-мишени клеток (например повышению продолжительности передачи сигнала цитокинов, по меньшей мере, на 8 часов, например 24 часа), например по сравнению со свободной цитокиновой молекулой; (v) иммуностимулированию; (vi) повышению активации и/или экспансии иммунных клеток, например популяции-мишени иммунных клеток; или (vii) демонстрации пониженных побочных эффектов, например более низкой системной токсичности по сравнению со свободной цитокиновой молекулой. В некоторых вариантах осуществления IFM обеспечивает изменение, например повышение, любого из п.п. (i)-(vii) до большей степени, чем свободная цитокиновая молекула, например, по меньшей мере, на 8 часов, например на 24 часа. В одном варианте осуществления цитокиновая молекула представляет собой молекулу IL-15, как описано здесь, а фрагмент для нацеливания на иммунную клетку представляет собой молекулу антитела против CD45, например антитело или фрагмент антитела, который связывается с CD45, как описано здесь.

В рамках соответствующего аспекта изобретение относится к композиции, например IFM, включающей цитокиновую молекулу, связанную, например слитую с фрагментом для нацеливания на иммунную клетку. В рамках вариантов осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку связывается с мишенью или рецептором на иммунной клетке. В рамках вариантов осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку включает или представляет собой молекулу антитела, например антитело или фрагмент антитела, например молекулу антитела против CD45 (например IgG, Fab, scFv), которая связывается с рецептором CD45 на клетке, например иммунной клетке (например иммунной эффекторной клетке, такой как лимфоцит). В рамках вариантов осуществления композиция, например IFM, связывает, например связывает вместе цитокиновую молекулу и фрагмент для нацеливания на иммунную клетку с иммунной клеткой, например эффекторной иммунной клеткой. В рамках вариантов осуществления связывание антитела против CD45 с клеткой повышает связывание молекулы IL-15 с клеткой и повышает одну или несколько из: степень передачи сигнала IL-12,

иммуностимулирование с течением времени, например по сравнению со свободной молекулой IL-12 (молекулой IL-12, не присутствующей в композиции). В рамках вариантов осуществления передача сигнала и/или иммуностимулирование осуществляется с течением периода времени, например минут, часов, дней, например, в течение 8 часов, например 24 часов.

В другом аспекте изобретение предусматривает частицу, например наночастицу, которая включает иммунный агонист, как описано здесь, например наночастицу, которая включает белок (например белковый наногель, как описано здесь). В одном варианте осуществления частица включает один и тот же иммунный агонист. В других вариантах осуществления частица включает один или несколько различных типов иммунного агониста.

Также раскрыты композиции, например фармацевтические композиции, включающие описанные здесь IFM и/или наногели. В рамках вариантов осуществления фармацевтические композиции дополнительно включают фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель, или стабилизатор.

Описанные здесь IFM и белковые наногели могут быть введены напрямую субъекту, страдающему подвергаемым лечению заболеванием (например раком) с помощью, например, внутривенного или подкожного введения. В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку IFM и белковый наногель обеспечивают доставку цитокиновых молекул на поверхность иммунной клетки, тем самым повышая концентрацию цитокиновых молекул на поверхности иммунной клетки. В рамках вариантов осуществления IFM и наногель приводят к одному или нескольким из: локализации распределения и/или повышению доступности цитокиновой молекулы на клеточной поверхности, тем самым обеспечивая активацию и/или стимулирование иммунной клетки.

В других вариантах осуществления описанные здесь IFM могут быть введены в комбинации с терапией на основе иммунных клеток для активации и/или стимулирования терапии на основе иммунных клеток *in vivo* или *in vitro*. Например, описанные здесь IFM могут быть введены совместно с терапией на основе клеток субъекту, страдающему подвергаемым лечению заболеванием (например раком) с помощью, например, внутривенного или подкожного введения. В других вариантах осуществления клеточную терапию совмещают с описанной здесь IFM *in vitro* перед введением. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия выбрана из адаптивной клеточной терапии, терапии на основе CAR-T-клеток, терапии на основе модифицированных TCR T-клеток, терапии на основе опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, терапии на основе обученных против антигена Т-клеток, или терапии на основе обогащенных антиген-специфичных Т-клеток.

Дополнительные признаки и варианты осуществления любой из описанных здесь IFM, композиций, наночастиц, способов, вариантов применения, нуклеиновых кислот, векторов, и клеток-хозяев включают одну или несколько из нижеследующих.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий фрагмент, например цитокиновая молекула, функционально соединен, например ковалентно соединен (например с

помощью химической связи, генетического или белкового слияния, нековалентной связи или иным образом) с фрагментом для нацеливания на иммунную клетку. Например, иммуностимулирующая часть может быть ковалентно соединена непрямым образом, например через линкер, с фрагментом для нацеливания на иммунную клетку. В рамках вариантов осуществления линкер выбран из: расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, пептидного линкера, гибкого линкера, жесткого линкера, спирального линкера или неспирального линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер. Пептидный линкер может иметь длину 5-20, 8-18, 10-15, или около 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15-20, 20-25, или 25-30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может иметь длину 30 аминокислот и более, например 30-35, 35-40, 40-50, 50-60 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер включает Gly и Ser, например линкер включает аминокислотную последовательность $(Gly_3\text{-}Ser)_n$ или $(Gly_4\text{-}Ser)_n$, при этом n обозначает количество повторов мотива, например n=1, 2, 3, 4 или 5 (например $(Gly_3\text{-}Ser)_2$ или $(Gly_4Ser)_2$, или $(Gly_3\text{-}Ser)_3$ или $(Gly_4Ser)_3$ линкер). В некоторых вариантах осуществления линкер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, 37, 38, или 39, или аминокислотную последовательность, которая является по существу идентичной им (например имеющей 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислотных замещений). В одном варианте осуществления линкер включает аминокислотную последовательность GGGSGGGS (SEQ ID NO: 37). В другом варианте осуществления линкер включает аминокислоты из шарнирного участка антитела. В определенных вариантах осуществления линкер включает аминокислоты из шарнирных участков антител IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgGM, или IgGA. В рамках вариантов осуществления линкер включает аминокислоты из шарнирного участка IgG, например шарнирного участка IgG1, IgG2 или IgG4. Например, линкер включает вариант аминокислотной последовательности из шарнирного участка IgG, например вариант, имеющий один или несколько замещенных цистеинов, например серином.

В других вариантах осуществления линкер представляет собой непептидный химический линкер. Например иммуностимулирующий фрагмент может быть ковалентно соединен с фрагментом для нацеливания на иммунную клетку с помощью поперечного связывания. Подходящие поперечные линкеры включают линкеры, которые являются гетеробифункциональными, имеющими две отличных в плане реактивности группы, разделенные подходящим спейсером (например сложный эфир m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимида) или гомобифункциональными (например дисукцинимидилсуберат). В других вариантах осуществления иммуностимулирующий фрагмент напрямую ковалентно связан с фрагментом для нацеливания на иммунную клетку без линкера. В других вариантах осуществления иммуностимулирующий фрагмент и фрагмент для нацеливания на иммунную клетку IFM не являются ковалентно связанными, например являются связанными нековалентно.

В других вариантах осуществления линкер может представлять собой белок или его фрагмент или производное, например альбумин человека или Fc домен, или их фрагмент или

производное. В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку связан с N-концом, а иммуностимулирующий фрагмент связан с С-концом.

В других вариантах осуществления линкер нековалентно связывает фрагмент для нацеливания на иммунную клетку с иммуностимулирующим фрагментом. Например, линкер включает домен димеризации, например спиральную катушку или лейциновую застежку-молнию.

Другие признаки, объекты, и преимущества изобретения будут очевидны из описания и фигур, а также формулы изобретения.

Если не указано иное, все используемые здесь технические и научные термины имеют то же значение, какое обычно понимается средним специалистом в области, к которой относится данное изобретение. Несмотря на то, что при практической реализации или тестировании настоящего изобретения могут применяться способы и материалы, являющиеся аналогичными или эквивалентными описанным здесь, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все указанные в данном документе ссылки, включая патенты, патентные заявки и публикации, в полном объеме включены в качестве ссылки. Кроме того, материалы, способы и примеры приведены в качестве иллюстрирующих и не должны рассматриваться в качестве ограничивающих.

ОПИСАНИЕ ФИГУР

На **Фиг.1** изображены примеры слитых белков по настоящему изобретению в виде комбинации цитокина и иммуностимулирующего фрагмента для нацеливания на клеточную поверхность и стимулирования.

На **Фиг.2A-2D** показаны 4 примера конструктов, включающих антитело против CD45 и IL-12 (также обозначаемых как "анти-CD45-IL12-TF" или "αCD45-IL12-TF" или "IL12-TF").

На **Фиг.3** показано, что анти-CD45-IL12-TF обеспечивает высокую степень нагрузки IL-12 на клетку и высокую степень поверхностной устойчивости.

На **Фиг.4A-4B** показана схема, изображающая связанные продукты слияния, обеспечивающие передачу сигнала cis, trans, а также за счет переноса в клетки-мишени, и изображающая фосфорилирование STAT4 в нагруженных ("cis") и ненагруженных клетках-мишенях ("trans" и "перенос") за счет связанного продукта слияния IL-12.

На **Фиг.5A** показан рост опухоли, изменение массы тела мышей, выживаемость (до 100 дня после АСТ).

На **Фиг.5B** показано, что Pmel клетки, несущие суррогатный лидерный кандидат IL12-TF, индуцируют транзиентную лимфопению перенесенных и эндогенных иммунных клеток.

На **Фиг.5C-5D** показана пролиферация (на основе положительной реакции в плане Ki67) эндогенных CD8 Т-клеток в крови.

На **Фиг.5E** показана пролиферация эндогенных NK-клеток (на основе положительной реакции в плане Ki67) и активация (на основе положительной реакции в плане CD69).

На **Фиг.6** показано, что IL12-TF дополняет терапию на основе опухоль-специфических Т-

клеток при предварительной загрузке на адоптивно перенесенные Т-клетки или при совместном введении в виде раствора.

На **Фиг.7А** показаны кривые роста опухоли после однократного или многократного введения опухоль-специфических Т-клеток, несущих IL12-TF.

На **Фиг.7В** показана выживаемость при однократных или многократных введениях опухоль-специфических Т-клеток, несущих IL12-TF.

На **Фиг.7С** показано, что IL12-TF стимулируют экспансию и приживление опухоль-специфических Т-клеток *in vivo*.

На **Фиг.7D** показано изменение массы тела после лечения на основе одной или двух доз опухоль-специфических Т-клеток, несущих IL12-TF.

На **Фиг. 8** показаны уровни IFN-γ в плазме после ACT с Pmel, несущими один из двух IL12-TF.

На **Фиг.9** показаны уровни CXCL10 в плазме после ACT с Pmel, несущими один из двух IL12-TF.

На **Фиг.10А-10D** показано специфическое связывание нацеленных на CD8 IFM, включающих относящиеся к дикому типу или подвергнутые мутированию IL-15, с CD8 Т-клетками *in vivo* и активность нацеленных на CD8 IFM на CD4 Т-клетках, CD8 Т-клетках, и NK-клетках в крови.

На **Фиг.11А-11С** показана токсичность IL-15 после повышения дозировки или схемы дозирования по сравнению с безопасностью нацеленных на CD8 IFM, включающих относящиеся к дикому типу или подвергнутые мутированию варианты IL-15. * обозначает после второго дозирования.

На **Фиг.12А-12В** показана противоопухолевая эффективность и изменение массы тела вследствие повышения дозировки при введении IL-12, нацеленного на CD8 IFM с IL-12, или двух различных нацеленных на CD45 IFM с IL-12.

Фиг.13А: наногель на основе IL-15 обеспечивает аутокринное стимулирование за счет цитокинов.

Фиг.13В: конструкт в виде связанного продукта слияния IL-12 и нагрузка на поверхность Т-клеток.

Фиг.14: Ход исследования.

Фиг.15: Противоопухолевая активность комбинации PMELL Т-клеток, нагруженных наногелем на основе IL-15 (DP-15 PMEL; 10 $\times 10^6$) при совместном введении с PMELL Т-клетками, нагруженными связанным продуктом слияния IL-12 (DP-12 PMEL), введенной в количестве 1 (слева), 2,5 (в центре) или 5 $\times 10^6$ клеток (справа). Также показана активность PMELL Т-клеток, нагруженных связанным продуктом слияния IL-12 (DP-12 PMEL; 1, 2,5 или 5 x 10^6) и контролей комбинации, где PMELL Т-клетки, нагруженные наногелем на основе IL-15 (DP-15 PMEL; 10 $\times 10^6$), вводили совместно с PMEL Т-клетками (1, 2,5 или 5 x 10^6).

Фиг.16: Изменения массы тела относительно начала лечения (День 0) для различных

подвергаемых лечению групп.

Фиг.17: слева: масса селезенки в День 4 после введения. В День 4 после введения 4-5 мышей/группа умерщвляли для общего патологического анализа и записывали величины массы селезенки. **=p<0,01; ***=p<0,001; ****=p<0,0001.

Фиг.17: справа: масса селезенки в День 4 после введения. В День 4 после введения 4-5 мышей/группа умерщвляли для анализа общей патологии и записывали величины массы селезенки.

Фиг.18A: Фенотип перенесенных PMEL Т-клеток с течением времени. Образцы крови собирали в День 4, 7, 11, 16, 23, 30 и 37 и окрашивали для анализа с помощью проточной цитометрии. Перенесенные PMEL Т-клетки были идентифицированы с помощью CD90.1 окрашивания. PMEL Т-клетки разделяли на четыре различные популяции на основе профиля окрашивания CD44 и CD62L: Эффекторные Т-клетки (Teff; CD44- CD62L-), наивные/стволовые Т-клетки памяти (Tn/scm; CD44- CD62L+), эффекторные Т-клетки памяти (Tem; CD44+ CD62L-), и Т-клетки центральной памяти (Tcm; CD44+ CD62L+).

Фиг.18B: PMEL Т-клетки с совместной нагрузкой связанным продуктом слияния IL-12 и наногелем на основе IL-15 или нагруженные только связанным продуктом слияния IL-12 или наногелем на основе IL-15 совместно культивировали с клетками меланомы B16-F10 при низком соотношении эффектор:мишень (1:10). Оценивали рост клеток меланомы B16-F10 (слева), пролиферацию PMEL Т-клеток (в центре слева), количество активированных PMEL Т-клеток (CD25+ CD69+, определено с помощью проточной цитометрии) (в центре справа) и фенотип PMEL Т-клеток (справа). Для оценки фенотипа PMEL Т-клетки разделяли на четыре различные популяции на основе профиля окрашивания CD44 и CD62L: эффекторные Т-клетки (Teff; CD44- CD62L-), наивные/стволовые Т-клетки памяти (Tn/scm; CD44- CD62L+), эффекторные Т-клетки памяти (Tem; CD44+ CD62L-), и Т-клетки центральной памяти (Tcm; CD44+ CD62L+).

Фиг. 19: Верхний ряд – количества MART-1 Т-клеток, определенные с помощью проточной цитометрии с использование шариков для количественного анализа CountBright. Загрузка связанного продукта слияния IL-12 (синие кривые) промотирует клеточную выживаемость, превышающую лишь MART-1, а загрузка наногеля на основе IL-15 (зеленые кривые) промотирует 2-кратную экспансию. Комбинирование иммунных агонистов в виде связанного продукта слияния IL-12 и наногеля на основе IL-15 за счет комбинирования или совместной загрузки (смешанные, показаны оранжевым цветом). Нижний ряд – Количество антиген-реактивных (положительных в плане тетрамера) клеток в День 6 демонстрирует повышенную антигенную реактивность при использовании загруженных на поверхность иммунных агонистов.

Фиг.20: Колориметрический репортерный анализ живых клеток показывает цитотоксичность нацеленных на MART-1 Т-клеток самостоятельно при более высоком соотношении E:T, а также повышенную цитотоксичность нацеленных на MART-1 Т-клеток при более низких соотношениях E:T и в более поздние моменты времени. Нагруженные связанным

продуктом слияния IL-12 Т-клетки (показаны синим цветом) и нагруженные комбинацией связанного продукта слияния IL-12 и наногеля на основе IL-15 Т-клетки (смешанные, показаны оранжевым цветом) демонстрируют аналогичное повышение цитотоксичности в рамках данного анализа. DP-12= нагруженные связанным продуктом слияния IL-12, DP-15= нагруженные наногелем на основе IL-15, CTL=эффекторные нацеленные на MART-1 Т-клетки.

Фиг.21: В День 6 нацеленные на MART-1 Т-клетки имели фенотип эффекторных клеток памяти (CD45RO+ CCR7-), при этом МТС подвергались высокой степени активации (CD25+ CD69+). Нагруженные наногелем на основе IL-15 Т-клетки (слева) и нагруженные комбинацией связанного продукта слияния IL-12 и наногеля на основе IL-15 Т-клетки (справа) демонстрируют аналогичные фенотипы.

Фиг.22: Интерферон-гамма (IFNg) при измерении с помощью ELISA в День 1, 3, и 6 является повышенным. Нагруженные связанным продуктом слияния IL-12 Т-клетки (показаны синим цветом) и нагруженные комбинацией связанного продукта слияния IL-12 и наногеля на основе IL-15 Т-клетки (смешанные, показаны оранжевым цветом) демонстрируют аналогичное повышение цитотоксичности в рамках данного анализа. E:T = Эффектор:Мишень.

Фиг.23A: Слева – количество нацеленных на MART-1 Т-клеток на основе количественного анализа с помощью проточной цитометрии с использованием шариков для количественного анализа CountBright демонстрирует пригодное для использование количество Т-клеток в День 3. E:T = Эффектор:Мишень. Справа – повторный колориметрический репортерный анализ живых клеток демонстрирует, что цитотоксичность нацеленных на MART-1 Т-клеток повышается при использовании нагруженных комбинацией связанного продукта слияния IL-12 и наногеля на основе IL-15 Т-клеток (смешанные, показаны оранжевым цветом) по сравнению с нагруженными только одним компонентом Т-клетками. (зеленый цвет, синий цвет).

Фиг.23B: связанный продукт слияния IL-12 повышает цитотоксичность Pmel клеток. Лечение с использованием совместной загрузки повышает цитотоксичность Pmel клеток, нагруженных наногелем на основе IL15. Как показано на **Фиг.23B**, полное уничтожение опухоли было достигнуто в группах, получавших связанный продукт слияния IL-12, и группах с совместной загрузкой ко Дню 2. Связанный продукт слияния IL-12 повышает продуцирование IFNg и цитотоксическую активность. Рост опухоли наблюдался у контрольной и получавшей наногель на основе IL-15 группе ко Дню 5.

Фиг.23C: Опосредованная совместной загрузкой цитотоксичность клеток-мишеней при низком соотношении E:T. Как показано на **Фиг.23C**, *наногель на основе IL-15* теряет преимущество в виде долговременной цитотоксичности при снижении соотношения E:T. Условие в виде *совместной загрузки наногеля на основе IL15 + IL12 TF* демонстрирует преимущество в виде индуцированной устойчивой цитотоксичности по сравнению с монотерапией.

Фиг.23D: Комбинирование наногеля на основе IL-15 + IL-12 TF: повышенная активность по сравнению с отдельными агентами. Как показано на **Фиг.23D**, наногель на основе IL-15, IL-12 TF, и презентирование антигена демонстрировало неожиданное повышение долговременной

устойчивости PMEL Т-клеток в крови. Группы с совместной загрузкой (15M) и комбинацией (наногель на основе IL-15 10M + IL-12TF 5M) демонстрируют схожую противоопухолевую активность. Группы с комбинацией демонстрируют повышенную активность по сравнению с отдельными агентами.

Фиг.23E: Комбинированное лечение обеспечивает устойчивую клеточную экспансию антиген-специфических клеток и повышает цитотоксичность. Как показано на **Фиг.23E**, наногель на основе IL-15 повышает антиген-специфичную клеточную экспансию МТС, нагруженных IL-12 TF. IL-12 TF повышает продуцирование IFNg и повышает цитотоксичность в клетках, нагруженных наногелем на основе IL-15.

Фиг. 23F: Полезный синергичный эффект наблюдался у клеток с совместной загрузкой при низком уровне наногеля на основе IL-15 и IL-12 TF. Как показано на **Фиг.23F**, при определении оптимальных нагрузочных дозировок наногеля на основе IL-15 и IL-12 TF для образцов с совместной нагрузкой более низких доз каждой монотерапии может быть достаточно для достижения того же синергичного эффекта.

Фиг.23G: Комбинирование и совместная загрузка демонстрируют повышенную активность по сравнению с IL-12 TF и наногелем на основе IL-15 при том же общем количестве клеток (15 M). * IIL-12 TF 15M группа: вариабельность вызвана 1 мышью с более ранним ускользанием опухоли, чем у других.

На **Фиг.24** показан вариант осуществления, в рамках которого создается комбинированный пул DC путем комбинирования стандартных зрелых DC, нагружаемых напрямую 15-мерными пептидами, и предварительно нагруженных DC, которые презентируют 6-15 мерные пептиды.

На **Фиг.25** показан анализ МТС, подвергнутых тренировке против TAA, с использованием процесса комбинирования для связывания с полученным на основе PRAME 9-мерным и 10-мерным пептидом с помощью нагруженных пептидами MHC тетрамеров (связывание МТС с пулом из четырех PRAME тетрамеров показано слева). Выделена популяция связывающихся с тетрамерами CD8 клеток. Реактивность CD8 в отношении отдельных пептидов показана справа.

На **Фиг.26** показана ВЭЖХ белкового наногеля на основе поперечно связанного IL-15^{N72D}/sushi-Fc, функционализированного с использованием polyK30, на колонке BioSep4000 для эксклюзионной хроматографии.

На **Фиг.27** изображено связывание белкового наногеля с CD8 Т-клетками. CD8 Т-клетки связывались с белковыми наногелями на основе IL-15^{N72D}/sushi-Fc, содержащими 3 мас.% IL-15^{N72D}/sushi-Fc, конъюгированного с Alexa-647. CD8 Т-клетки замораживали в FBS+5% DMSO в течение ночи. После размораживания CD8 Т-клетки культивировали в среде, содержащей IL-2 (20 нг/мл), и измеряли их связанную с Alexa-647 флуоресценцию в одинаковые моменты времени с помощью проточной цитометрии.

На **Фиг.28** изображен анализ экспансии Т-клеток. CD8 Т-клетки конъюгировали (правая группа) или не конъюгировали (левая группа) с наногелями на основе IL-15^{N72D}/sushi-Fc перед

замораживанием в FBS+5% DMSO в течение ночи. При размораживании обе группы культивировали в среде, содержащей IL-2 (20 нг/мл), при этом количество живых клеток измеряли спустя 4 часа (серые столбцы) и в День 2 (черные столбцы) с помощью проточной цитометрии. Полная среда для данного эксперимента представляла собой IMDM (Lonza), Glutamaxx (Life Tech), 20% FBS (Life Tech), 2,5 мкг/мл альбумина человека (Octapharma), 0,5 мкг/мл Inositol (Sigma).

На **Фиг.29A-29B** показан анализ экспансии Т-клеток. На **Фиг.29A** CD3 Т-клетки были связаны (самая правая группа) или не связаны (3 самых левых групп) с белковыми наногелями на основе IL-15^{N72D}/sushi-Fc перед замораживанием в среде без сыворотки (Bambanker) в течение 2 недель. При размораживании первую группу культивировали в полной среде (Только среда), вторую группу культивировали в содержащей IL-2 (20 нг/мл) полной среде (IL-2 (растворимый)), третью группу культивировали в содержащей IL-15^{N72D}/sushi-Fc (0,6 мкг/мл) полной среде (IL-15^{N72D}/sushi-Fc (0,6 мкг/мл)), а четвертую группу культивировали в полной среде (наногели на основе IL-15^{N72D}/sushi-Fc). Количество живых клеток измеряли спустя 16 часов (серые столбцы) и в День 9 (черные столбцы) с помощью проточной цитометрии. На **Фиг.29B** CD3 Т-клетки были конъюгированы (самая правая группа) или не конъюгированы (3 самых левых групп) с наногелями на основе IL-15^{WT}/sushi-Fc перед замораживанием в среде без сыворотки (Bambanker) в течение ночи. При размораживании первую группу культивировали в полной среде (Только среда), вторую группу культивировали в содержащей IL-2 (20 нг/мл) полной среде (IL-2 (растворимый)), третью группу культивировали в содержащей IL-15^{WT}/sushi-Fc (12 мкг/мл) полной среде (IL-15^{WT}/sushi-Fc (12 мкг/мл)), а четвертую группу культивировали в полной среде (наногели на основе IL-15^{WT}/sushi-Fc). Количество живых клеток измеряли в День 2 (светло-серые столбцы), в День 6 (темно-серые столбцы) и в День 7 (черные столбцы) с помощью микроскопии. Полная среда для данного эксперимента представляла собой IMDM (Lonza), Glutamaxx (Life Tech), 20% FBS (Life Tech), 2,5 мкг/мл альбумина человека (Octapharma), 0,5 мкг/мл Inositol (Sigma).

На **Фиг.30A-30B** изображена линия клеток NK-92 и анализ экспансии первичных NK-клеток. На **Фиг.30A,** NK-92 клетки были связаны (2 самых правых группы) или не связаны (3 самых левых группы) с белковыми гелями на основе IL-15^{WT}/sushi-Fc (наногелями). Первые 4 группы были заморожены в среде без сыворотки (Bambanker) в течение 2 часов, пятую группу промывали и культивировали в полной среде (наногели на основе IL-15^{WT}/sushi-Fc (без замораживания)). При размораживании 4 самых левых групп первую группу культивировали в полной среде (Только среда), вторую группу культивировали в содержащей IL-2 (20 нг/мл) полной среде (IL-2 (растворимый)), третью группу культивировали в содержащей IL-15^{WT}/sushi-Fc (12 мкг/мл) полной среде (IL-15^{WT}/sushi-Fc (12 мкг/мл)), а четвертую группу культивировали в полной среде (наногели на основе IL-15^{WT}/sushi-Fc). Количество живых клеток измеряли в День 1 (светло-серые столбцы), в День 5 (темно-серые столбцы) и в День 6 (черные столбцы) с помощью микроскопии. На **Фиг.30B** первичные NK клетки были связаны (самая правая группа) или не

связаны (3 самых левых групп) с белковым наногелем на основе IL-15^{N72D}/sushi-Fc перед замораживанием в среде без сыворотки (Bambanker) в течение 2 недель. При размораживании первую группу культивировали в полной среде (Только среда), вторую группу культивировали в содержащей IL-2 (20 нг/мл) полной среде (IL-2 (растворимый)), третью группу культивировали в содержащей IL-15^{N72D}/sushi-Fc (0,6 мкг/мл) полной среде (IL-15^{N72D}/sushi-Fc (0,6 мкг/мл)), а четвертую группу культивировали в полной среде (наногели на основе IL-15^{N72D}/sushi-Fc). Количество живых клеток измеряли спустя 16 часов (серые столбцы) и в День 9 (черные столбцы) с помощью проточной цитометрии. Полная среда для данного эксперимента представляла собой Xvivo10, содержащую рекомбинантный трансферрин (Lonza), Glutamaxx (Life Tech), 5% сывороточного АВ человека (Corning).

На **Фиг.31A-31B** изображен анализ подмножеств Т-клеток. На **Фиг.31A** CD3 Т-клетки были связаны (самая правая группа) или не связаны (3 самых левых групп) с белковыми наногелями на основе IL-15^{N72D}/sushi-Fc перед замораживанием в среде без сыворотки (Bambanker) в течение 2 недель. При размораживании первую группу культивировали в полной среде (Только среда), вторую группу культивировали в содержащей IL-2 (20 нг/мл) полной среде (IL-2 (растворимый)), третью группу культивировали в содержащей IL-15^{N72D}/sushi-Fc (0,6 мкг/мл) полной среде (IL-15^{N72D}/sushi-Fc (0,6 мкг/мл)), а четвертую группу культивировали в полной среде (наногели на основе IL-15^{N72D}/sushi-Fc). Спустя 9 дней культивирования CD3 Т-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на предмет экспрессии маркеров подмножеств (**Фиг.31A**) и активации (**Фиг.31B**).

На **Фиг.32A-32B** изображен анализ эффективности Т-клеток. На **Фиг.32A** CD3 Т-клетки были связаны (самая правая группа) или не связаны (3 самых левых групп) с белковыми наногелями на основе IL-15^{N72D}/sushi-Fc перед замораживанием в среде без сыворотки (Bambanker) в течение 2 недель. При размораживании первую группу культивировали в полной среде (Только среда), вторую группу культивировали в содержащей IL-2 (20 нг/мл) полной среде (IL-2 (растворимый)), третью группу культивировали в содержащей IL-15^{N72D}/sushi-Fc (0,6 мкг/мл) полной среде (IL-15^{N72D}/sushi-Fc (0,6 мкг/мл)), а четвертую группу культивировали в полной среде (наногели на основе IL-15^{N72D}/sushi-Fc). После культивирования в течение 1 дня CD3 Т-клетки совместно культивировали с клетками-мишенями (Daudi) при различных соотношения эффектор:мишень (E:T). Степень уничтожения клеток-мишеней измеряли с помощью проточной цитометрии спустя 16 часов. Статистическую значимость вычисляли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с тестом множественного сравнения Тьюки. *: $p<0,05$; **: $p<0,01$. На **Фиг.32B** показаны показатели высвобождения IFNg из тех же клеток, что и на **Фиг.32A**. Полная среда для данного эксперимента представляла собой IMDM (Lonza), Glutamaxx (Life Tech), 20% FBS (Life Tech), 2,5 мкг/мл альбумина человека (Octapharma), 0,5 мкг/мл Inositol (Sigma).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В рамках настоящего изобретения предусмотрены, *inter alia*, композиции и

соответствующие способы применения иммуностимулирующих слитых молекул или IFM. "IFM", как описано здесь, включает иммуностимулирующий фрагмент, например цитокиновую молекулу (например биологически активный цитокин), фрагмент для нацеливания на иммунную клетку, например молекулу антитела (например антитело или фрагмент антитела), способную связываться с иммунной клеткой, например иммунной эффекторной клеткой. В рамках вариантов осуществления иммуностимулирующий фрагмент и фрагмент для нацеливания на иммунную клетку являются функционально связанными (например с помощью химического связывания, генетического слияния, нековалентного связывания или иным образом). В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку способен связываться с мишенью на поверхности иммунной клетки, тем самым обеспечивая нацеливание иммуностимулирующего фрагмента, например цитокиновой молекулы, на иммунную клетку, например иммунную эффекторную клетку (например лимфоцит).

Без связи с теорией считается, что связывание фрагмента для нацеливания на иммунную клетку с мишенью на поверхности иммунной клетки повышает концентрацию, например концентрацию с течением времени, на поверхности иммуностимулирующего фрагмента, например цитокиновой молекулы, с ее соответствующим рецептором, например цитокиновым рецептором, на иммунной клетке, например по сравнению со связыванием свободной цитокиновой молекулы с ее цитокиновым рецептором. Это может приводить к иммунному эффекту в отношении иммунной клетки, которая сама по себе связана IFM (аутокринная передача сигнала) и/или другой (например соседней) иммунной клетки (паракринная передача сигнала). Является преимуществом то, что в отличие от других терапевтических средств, таких как растворимые цитокины, "бронированные" CAR-T-клетки (с цитокинами) и наногели (на иммунных клетках), связанные продукты слияния по настоящему изобретению могут обеспечивать сбалансированную двойную аутокринную и паракринную активность за счет комбинирования полезных свойств в виде как достаточно высокой активности, так и низкой токсичности. С другой стороны, доставка растворимых цитокинов с одновременным обеспечением системной активности известна своей высокой токсичностью. "Бронированные" CAR-T-клетки могут локально секретировать цитокины, которые обеспечивают паракринную и системную активность, а также системную токсичность. Наногели, такие как описанные, например, в публикации заявки на патент США 2017/0080104, патенте США 9603944, публикации заявки на патент США 2014/0081012, и PCT заявках PCT/US2017/037249 и PCT/US2018/049596 (каждая из которых полностью приведена здесь в качестве ссылки), способны обеспечивать высоколокализованную аутокринную активность, которая может являться желательной для определенных цитокинов (например IL-15). Однако для цитокинов (например IL-12), для которых требуется паракринная активность, описанные здесь связанные продукты слияния могут являться оптимальным выбором для сбалансированной аутокринной и паракринной активности. Как показано на Фиг.4А, связанные продукты слияния могут обеспечивать передачу сигнала *in cis* при связывании (или загрузке) на иммунную клетку, in trans соседним иммунным клеткам-мишеням, а

также за счет переноса к иммунным клеткам-мишеням, которые не располагаются в непосредственной близости относительно исходных клеток с нагруженной поверхностью.

В рамках вариантов осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку приводит к повышению одного или нескольких из: связывания, доступности, активации и/или передачи сигнала иммуностимулирующего фрагмента на иммунной клетке, например в течение определенного периода времени. В рамках вариантов осуществления IFM по существу не препятствует связанной с передачей сигнала функции цитокиновой молекулы. Подобный эффект нацеливания приводит к локализованному и пролонгированному стимулированию пролиферации и активации иммунных клеток, тем самым индуцируя контролируемое повышение и активацию иммунного ответа. Описанные здесь IFM обеспечивают несколько преимуществ по сравнению с известными в данной области цитокинами, включая сниженные побочные эффекты, например более низкую системную токсичность, в то же время сохраняя иммуностимулирующую биоактивность (например активность и/или эффективность в плане передачи сигнала) цитокиновой молекулы.

Описанные ранее слитые белки в виде иммуноцитокинов-антитела-цитокина обычно сконструированы для нацеливания на связанные с заболеванием антигены (например опухоль-ассоциированные антигены, например антигены клеточной мембраны и компоненты внеклеточного матрикса) за счет их компонентов в виде антител для реализации эффекторных функций за счет их компонентов в виде цитокинов. (Clin. Pharmacol. 2013; 5(Suppl 1): 29–45. Thomas List and Dario Neri. Published online 2013 Aug 20. doi: 10.2147/CPAA.S49231 PMCID: PMC3753206). Примеры барьеров для терапевтического применения цитокинов связаны с их коротким периодом полужизни в сыворотке и ограниченной биодоступностью. Высокие дозы цитокинов могут преодолевать данные барьеры, но приводят к ограничивающей дозировку токсичности. Как следствие, большинство цитокинов требуют подходов на основе конструирования белков для снижения токсичности и повышения периода полужизни. Определенные стратегии включают ПЭГилирование, комплексы антител и форматы в виде слитых белков, а также мутагенез. (Antibodies 2013, 2, 426-451; doi:10.3390/antib2030426 Rodrigo Vazquez-Lombardi Brendan Roome and Daniel Christ.)

В рамках настоящего изобретения предусмотрены, *inter alia*, слитые белки в виде ковалентного конъюгата цитокина и фрагмента для нацеливания, который служит для нацеливания слитого белка на иммунную клетку (например здоровую и/или незлокачественную клетку) с определенной композицией рецепторов. Слияние провоспалительного цитокина с фрагментом для нацеливания, предпочтительно антителом или фрагментом антитела (например одноцепочечным Fv, Fab, IgG), обеспечивает направление слитого белка к представляющей интерес клетке и повышает доступность цитокина на клеточной поверхности. Представляющие интерес клетки включают, *inter alia*, иммунные клетки, в частности лимфоциты, и предпочтительно Т-клетки (например полные CD3 Т-клетки, CD4 Т-клетки, или CD8 Т-клетки), и могут включать другие типы клеток. В некоторых вариантах осуществления слитые белки могут

активировать подмножество CD8 Т-клеток. Представляющие интерес клетки, включая иммунные клетки, могут присутствовать *in vivo* (например в субъекте), *in vitro* или *ex vivo* (например в виде клеточной терапии).

В некоторых вариантах осуществления мишень на поверхности иммунной клетки в большом количестве присутствует на поверхности иммунной клетки (например ее количество превышает количество рецепторов для цитокиновой молекулы, присутствующей на поверхности иммунной клетки). В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку может быть выбран из молекулы антитела или молекулы лиганда, которая связывается с мишенью на поверхности иммунной клетки, например мишенью, выбранной из CD4, CD8, CD18, CD11a, CD11b, CD11c, CD19, CD20 или CD45. В одном варианте осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку включает молекулу антитела или молекулу лиганда, которая связывается с CD45.

CD45 представляет собой пример рецептора, присутствующего в большом количестве. CD45 также известен как общий антиген лейкоцитов, представляет собой трансмембранный белок типа I, присутствующий на гемопоэтических клетках за исключением эритроцитов, которые помогают обеспечивать клеточную активацию (см., например, Altin, JG, *Immunol Cell Biol*. 1997 Oct;75(5):430-45)). Другие рецепторы фрагмента для нацеливания IFM идеальным образом присутствуют на клеточной поверхности и являются устойчивыми к интернализации клеткой (например устойчивые рецепторы). Примером присутствующего в большом количестве и устойчивого рецептора является CD45. В качестве альтернативы, рецепторы нацеливающего фрагмента могут быть конститутивно перевернуты, например интернализованы клеткой и рециркулированы обратно на поверхность, тем самым обеспечивая значительные возможности в плане связывания для слитого белка, несмотря на их динамическую интернализацию (рециркулирующие рецепторы). CD22 представляет собой пример рециркулирующего рецептора.

Уровни экспрессии цитокиновых рецепторов могут варьироваться в зависимости от множества факторов, включая (i) тип клеток и (ii) состояние активации клетки. В рамках вариантов осуществления уровень экспрессии может влиять на одну или несколько из трансдукции сигнала цитокинов, силу и продолжительность сигнала. В одном варианте осуществления рецепторы, экспрессируемые на поверхности иммунной клетки, присутствуют в эффективном соотношении, при котором количество рецепторов для фрагмента для нацеливания превышает количество рецепторов для компонента в виде цитокина на клеточной поверхности. Подобное эффективное соотношение определяется когда рецепторы фрагмента для нацеливания являются неизменными; или, в качестве альтернативы, когда их плотность на клеточной поверхности эффективным образом обеспечивается за счет механизма рециркуляции, который обеспечивает восстановление рецепторов на клеточной поверхности и, как следствие, обеспечивает возможности в плане связывания для компонента для нацеливания при избытке компонента в виде цитокина. В случае подвергаемых рециркуляции рецепторов (например подвергаемых интернализации и возвращаемых на клеточную поверхность), рецепторы антитела

будут присутствовать при эффективном соотношении, обеспечивающим возможности для связывания для фрагмента для нацеливания при избытке возможностей для связывания для компонента белка в виде цитокина. Подобное эффективное соотношение обеспечивает локализацию цитокина на клеточной поверхности и, как следствие, повышает время и доступность цитокина для связывания с его собственным рецептором клеточной поверхности (несмотря на динамическое присутствие, интернализацию и возращение на поверхность рецептора для нацеливания).

В некоторых случаях регулирование передачи сигнала, инициированной рецепторами плазматической мембраны, связано с эндоцитозом. Интернализация активированных рецепторов представляет собой средство для ослабления сигнала, но также обеспечивает регулирование продолжительности передачи сигнала за счет рецепторов и специфичности результата передачи сигнала (описано в Barbieri, P.P. Di Fiore, S. Sigismund. Endocytic control of signaling at the plasma membrane Curr. Opin. Cell Biol., 39 (2016), стр. 21–27). Эндосомы могут служить в качестве мобильных платформ для передачи сигнала, обеспечивающих образование мультибелковых сборок для передачи сигнала и, как следствие, обеспечивая эффективную передачу сигнала в пространстве и времени. Некоторые связанные с передачей сигнала события, например связанные с передачей сигнала цитокинов события, инициированные в области плазматической мембраны, могут продолжаться из эндосомальных компартментов.

IFM по изобретению могут обеспечивать повышенную биологическую активность агонистических цитокинов в целом, а также IL-15, IL-7, IL-21, и IL-12p70 в частности. Другие агонистические цитокины включают IL-2, IL-6, и IL-27. В определенных вариантах осуществления цитокиновая молекула включает провоспалительный цитокин, например включает цитокин, выбранный из одного или нескольких из IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 или IL-27, включая их вариантные формы (например производное цитокина, комплекс, включающий цитокиновую молекулу с полипептидом, например комплекс в виде цитокинового рецептора, и другие его агонистные формы). В одном варианте осуществления цитокиновая молекула включает IL-15 и/или IL-12 (в одной IFM или двух IFM).

В одном примере варианта осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку IFM получен из молекулы антитела против CD45, а цитокиновая молекула представляет собой интерлейкин-15, необязательно в виде комплекса с доменом sushi субъединицы рецептора альфа IL-15 (αCD45-IL15 и αCD45-IL15/sushi). В другом примере варианта осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку IFM получен из молекулы антитела против CD45, а цитокиновая молекула представляет собой интерлейкин-15 (αCD45-IL12). αCD45-IL15/sushi IFM и αCD45-IL12 IFM могут использоваться совместно в рамках, например, комбинированной терапии.

В другом варианте осуществления IFM могут быть связаны с различными молекулами на клеточной поверхности, например IFM, в которой фрагмент для нацеливания на иммунную клетку получен из антитела, нацеленного на присутствующий в большом количестве или устойчивый

рецептор клеточной поверхности, отличный от CD45, например мишень, выбранную из CD4, CD8, CD18, CD11a, CD11b, CD11c, CD19, или CD20. IFM могут содержать цитокины, например интерлейкин-15, необязательно в виде комплекса с доменом sushi субъединицы рецептора альфа IL-15 и/или интерлейкином-12. IFM могут быть использованы совместно в рамках, например, комбинированной терапии с αCD45-IL15, αCD45-IL15/sushi, или αCD45-IL12. В другом варианте осуществления IFM, включающие дополнительные цитокины, связанные с одним и тем же или различными рецепторами клеточной поверхности, используются совместно в рамках, например, комбинированной терапии. Фрагмент для нацеливания на иммунную клетку может быть выбран из молекулы антитела или молекулы лиганда, которая связывается с мишенью на поверхности иммунной клетки, например мишенью, выбранной из CD4, CD8, CD18, CD11a, CD11b, CD11c, CD19, CD20 или CD45, и провоспалительного цитокина, например включает цитокин, выбранный из одного или нескольких из IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 или IL-27, включая их вариантные формы. В некоторых вариантах осуществления используются комбинации двух различных IFM. В других вариантах осуществления используются комбинации трех различных IFM. В других вариантах осуществления используются комбинации более чем трех IFM.

Терапевтические варианты использования слитых белков по изобретению включают, *inter alia*, (1) использование в качестве агентов для специфической доставки терапевтических белков за счет опосредованного рецепторами связывания рецепторов, являющихся уникальными для определенных клеток (например CD4 или CD8); (2) использование в качестве *ex vivo* агентов для индуцирования активации и экспансии выделенных аутологичных и аллогенных клеток перед повторным введением пациенту; например в рамках терапии на основе Т-клеток, включая ACT (адоптивный перенос клеток), а также с другими важными типами иммунных клеток, включая, например, В-клетки, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, NK-клетки, антиген-специфические CD8 Т-клетки, генетически модифицированные Т-клетки для экспрессии химерных антигенных рецепторов (CAR) или CAR-Т-клетки, генетически модифицированные Т-клетки для экспрессии Т-клеточных рецепторов, являющихся специфичными в отношении опухолевого антигена, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), и/или тренированные с использованием антигена Т-клетки (например Т-клетки, подвергнутые "тренировке" с помощью антигенпрезентирующих клеток (APC), демонстрирующих представляющие интерес антигены, например опухоль-ассоциированные антигены (TAA)); и (3) использование в качестве *in vivo* агентов для введения для доставки цитокинов, используемых для обеспечения экспансии клеток, используемых в рамках клеточной терапии, включая ACT.

Таким образом, фармацевтическая композиция, включающая IFM по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель, или стабилизатор, может быть использована для доставки терапевтических белков нуждающемуся в этом субъекту. Также предусмотрена модифицированная иммунная клетка, включающая здоровую и/или незлокачественную иммунную клетку и IFM по настоящему изобретению, которая связана с ней или нацелена на нее. Подобная модифицированная иммунная клетка может быть получена *in vitro*

или *in vivo*.

Настоящее изобретение также предусматривает способ *in vitro* получения модифицированных иммунных клеток, включающий: получение множества здоровых и/или незлокачественных иммунных клеток; и инкубирование IFM по настоящему изобретению с множеством здоровых и/или незлокачественных иммунных клеток для обеспечения нацеленного связывания IFM с ними, тем самым обеспечивая получение множества модифицированных иммунных клеток.

Также здесь предусмотрен способ осуществления клеточной терапии, включающий: получение множества здоровых и/или незлокачественных иммунных клеток; инкубирование IFM по настоящему изобретению с множеством здоровых и/или незлокачественных иммунных клеток для обеспечения нацеленного связывания IFM с ними, тем самым обеспечивая получение множества модифицированных иммунных клеток; и введение множества модифицированных иммунных клеток нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию вводят при отсутствии предварительного кондиционирования пациента, при этом указанное предварительное кондиционирование включает CPX (циклофосфамид) или другой вид кондиционирующей химиотерапии на основе лимфодеплеции. Устранение предварительного кондиционирования является полезным, поскольку хорошо известно, что предварительное кондиционирование с использованием химиотерапевтических агентов может вызывать высокую системную токсичность в отношении всех клеток, включая здоровые клетки, ослаблять иммунную систему и индуцировать многие нежелательные побочные эффекты.

В некоторых вариантах осуществления здесь предусмотрена совместная загрузка наногеля на основе IL-15 и IL-12 TF, что обеспечивает специфичную в плане антигена Pmel экспансию после встречи с антигеном, промотирует долговременную активацию Pmel и продуцирование IFNg даже при низком соотношении эффектор:мишень, и/или обеспечивает устойчивую антиген-специфическую цитотоксичность мишени.

В некоторых вариантах осуществления здесь предусмотрена комбинированная терапия на основе наногеля на основе IL-15 и IL-12 TF, которая обеспечивает антиген-специфическую клеточную экспансию при встрече с антигеном, стимулирует продуцирование IFNg, обеспечивает сохранение фенотипов памяти и состояний активации после встречи с антигеном, а также стимулирует долговременную антиген-специфичную цитотоксичность мишени.

В некоторых вариантах осуществления здесь предусмотрена комбинированная терапия на основе наногеля на основе IL-15 и IL-12 TF, которая обеспечивает специфическую в отношении антигена MART-1 клеточную экспансию при встрече с антигеном, стимулирует продуцирование IFNg, обеспечивает сохранение фенотипов памяти и состояний активации после встречи с антигеном, и/или обеспечивает антиген-специфичную цитотоксичность мишени.

Определения

Определенные термины определены здесь ниже. Дополнительные определения

приведены по тексту заявки.

В соответствии с используемым здесь значением, существительные в единственном числе обозначают один или несколько, например, по меньшей мере, один соответствующий указанному существительному грамматический объект. Использование существительных в единственном числе при их использовании вместе с термином "включающий" здесь может означать "один", но также соответствует значению "один или несколько", "по меньшей мере, один", и "один или более чем один".

В соответствии с используемым здесь значением, термины "около" и "приблизительно" в целом означают приемлемую степень отклонения для количества, измеряемого с учетом природы или точности измерений. Примеры степеней отклонения соответствуют рамкам в виде 20 процентов (%), обычно 10% и, более обычно, 5% указанного диапазона значений. Термин "по существу" означает более чем 50%, предпочтительно более чем 80% и, наиболее предпочтительно, более чем 90% или 95%.

Термин "аутологичный" обозначает любой материал, полученный от того же лица, которому он будет позже повторно введен. Термин "аллогенный" обозначает любой материал, полученный от другого животного того же вида, что и субъект, которому вводят данный материал.

Термин "антитело" или "молекула антитела" в соответствии с используемым здесь значением означает белок, например цепь иммуноглобулина или его фрагмент, включающий, по меньшей мере, одну последовательность вариабельного домена иммуноглобулина. Молекула антитела охватывает антитела (например полноразмерные антитела) и фрагменты антител. В рамках одного варианта осуществления молекула антитела включает антигенсвязывающий или функциональный фрагмент полноразмерного антитела или цепь полноразмерного иммуноглобулина. Например, полноразмерное антитело представляет собой молекулу (например, IgG) иммуноглобулина (Ig), которая встречается в природе или образуется с помощью нормальных рекомбинантных процессов в отношении фрагмента гена иммуноглобулина. В рамках вариантов осуществления термин "молекула антитела" обозначает иммунологически активную антигенсвязывающую часть молекулы иммуноглобулина, такую как фрагмент антитела. Фрагмент антитела, например функциональный фрагмент, представляет собой часть антитела, например Fab, Fab', F(ab')2, F(ab)2, вариабельный фрагмент (Fv), доменное антитело (dAb), или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). Функциональный фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознается интактным (например полноразмерным) антителом. Термины "фрагмент антитела" или "функциональный фрагмент" также включают выделенные фрагменты, состоящие из вариабельных участков, такие как "Fv" фрагменты, состоящие из вариабельных участком тяжелых и легких цепей, или рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых легкие и тяжелые вариабельные участки соединены пептидным линкером ("scFv белки"). В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела не включает части антител без антигенсвязывающей активности, такие как Fc фрагменты

или одиночные аминокислотные остатки. Примеры молекул антител включают полноразмерные антитела и фрагменты антител, например dAb (доменное антитело), имеющие одиночную цепь, Fab, Fab', и $F(ab')_2$ фрагменты, и одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv). Термины "Fab" и "фрагмент Fab" используются взаимозаменяемы образом и обозначают участок, который включает один константный и один вариабельный домен из каждой тяжелой и легкой цепи антитела, то есть V_L, C_L, V_H, и C_H1.

В соответствии с используемым здесь значением, термин "последовательность вариабельного домена иммуноглобулина" обозначает аминокислотную последовательность, которая может образовывать структуру вариабельного домена иммуноглобулина. Например, данная последовательность может включать всю или часть аминокислотной последовательности встречающегося в природе вариабельного домена. Например, данная последовательность может включать или не включать одну, две, или более N- или C-концевые аминокислоты, или может включать другие изменения, которые совместимы с образованием структуры белка.

В рамках вариантов осуществления молекула антитела является моноспецифичной, например она имеет специфичность связывания в отношении одного эпитопа. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела является мультиспецифичной, например она имеет несколько последовательностей вариабельного домена иммуноглобулина, при этом первая последовательность вариабельного домена иммуноглобулина имеет специфичность связывания в отношении первого эпитопа, а вторая последовательность вариабельного домена иммуноглобулина имеет специфичность связывания в отношении второго эпитопа. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела представляет собой биспецифичную молекулу антитела. Термин "биспецифичная молекула антитела" в соответствии с используемым здесь значением обозначает молекулу антитела, которая имеет специфичность в отношении более чем одного (например двух, трех, четыре или более) эпитопов и/или антигенов.

Термин "антиген" (Ag) в соответствии с используемым здесь значением обозначает макромолекулу, включая все белки или пептиды. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой молекулу, которая провоцирует иммунный ответ, например активирующую определенные иммунные клетки и/или продуцирование антител. Антигены участвуют не только в продуцировании антител. Т-клеточные рецепторы также распознают антигены (хотя и антигены, чьи пептиды или пептидные фрагменты образуют комплекс с молекулой MHC). Любая молекула, включая практически все белки или пептиды, может являться антигеном. Антигены также могут быть получены на основе геномного рекомбинанта или ДНК. Например, любая ДНК, включающая нуклеотидную последовательность или частичную нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок, способный вызывать иммунный ответ, кодирует "антиген". В рамках вариантов осуществления антиген не обязательно должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена, при этом антиген также вовсе не обязательно должен кодироваться геном. В рамках вариантов осуществления антиген может быть синтезирован или может быть получен из биологического образца, например

образца ткани, образца опухоли, клетки или жидкости с другими биологическими компонентами. В соответствии с используемым здесь значением, термин "опухолевый антиген" или, взаимозаменяемым образом, "раковый антиген" включает любую молекулу, присутствующую или связанную с раком, например раковой клеткой или микросредой опухоли, которая может провоцировать иммунный ответ. В соответствии с используемым здесь значением, термин "антиген иммунной клетки" включает любую молекулу, присутствующую или связанную с иммунной клеткой, которая может провоцировать иммунный ответ.

Термин "антигенсвязывающий участок" или "антигенсвязывающий фрагмент" или "антигенсвязывающая часть" молекулы антитела (используются здесь взаимозаменяемым образом) обозначает часть молекулы антитела, например молекулы иммуноглобулина (Ig), такой как IgG, которая участвует в связывании антигена. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок образован аминокислотными остатки вариабельных (V) участков тяжелых (H) и легких (L) цепей. Три сильно дивергентных участка в рамках вариабельных участков тяжелых и легких цепей, обозначаемые как гипервариабельные участки, располагаются между более консервативными фланкирующими участками, называемыми "каркасными участками" (FR). FR представляют собой аминокислотные последовательности, которые естественным образом встречаются между и по соседству с гипервариабельными участками в иммуноглобулинах. В рамках вариантов осуществления в молекуле антитела указанные три гипервариабельных участка легкой цепи и три гипервариабельных участка тяжелой цепи располагаются относительно друг друга в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности, которая является комплементарной по отношению к трехмерной поверхности связываемого антигена. Указанные три гипервариабельных участка каждой из тяжелой и легкой цепей обозначаются как "определяющие комплементарность участки" или "CDR". Каркасный участок и CDR были определены и описаны, например, у Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, и Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917. Каждая вариабельная цепь (например вариабельная тяжелая цепь и вариабельная легкая цепь) обычно состоит из трех CDR и четырех FR, которые располагаются от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, и FR4. CDR вариабельной легкой цепи (VL) в целом определяются в качестве включающих остатки в положениях 27-32 (CDR1), 50-56 (CDR2), и 91-97 (CDR3). CDR вариабельной тяжелой цепи (VH) в целом определяются в качестве включающих остатки в положениях 27-33 (CDR1), 52-56 (CDR2), и 95-102 (CDR3). Среднему специалисту в данной области будет очевидно, что петли могут иметь различную длину в зависимости от антитела, при этом системы нумерации, такие как Kabat или Chotia, обеспечивают единообразную нумерацию каркасов в рамках различных антител.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела (например при включении в качестве части слитой молекулы) может иметь недостаток или вовсе не иметь полноразмерный Fc домен. В определенных вариантах осуществления

антигенсвязывающий фрагмент не включает полноразмерный IgG или полноразмерный Fc, но может включать один или несколько константных участков (или их фрагментов) из легких и/или тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может быть полностью свободным от какого-либо Fc домена. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может являться по существу свободным от полноразмерного Fc домена. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может включать часть полноразмерного Fc домена (например CH2 или CH3 домен или его часть). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может включать полноразмерный Fc домен. В некоторых вариантах осуществления Fc домен представляет собой домен IgG, например Fc домен IgG1, IgG2, IgG3, или IgG4. В некоторых вариантах осуществления Fc домен включает домен CH2 и домен CH3.

В соответствии с используемым здесь значением, термин "молекула цитокина" обозначает полноразмерный, представляющий собой фрагмент или вариант встречающегося в природе цитокина дикого типа (включая его фрагменты и функциональные варианты, имеющие, по меньшей мере, 10% активности встречающейся в природе молекулы цитокина). В рамках вариантов осуществления молекула цитокина имеет, по меньшей мере, 30%, 50%, или 80% активности, например иммуномодулирующей активности, относительно встречающейся в природе молекулы. В рамках вариантов осуществления молекула цитокина также включает рецепторный домен, например цитокиновый рецепторный домен, необязательно связанный с Fc участком иммуноглобулина. В рамках других вариантов осуществления молекула цитокина связана с Fc участком иммуноглобулина.

Термин "совместное введение" в рамках настоящего изобретения обозначает введение различных фрагментов в виде иммунных агонистов, например нагруженной связанным продуктом слияния IL-12 Т-клетки и нагруженной наногелем на основе IL-15 Т-клетки при таких условиях, что данные элементы, например иммунный агонист на основе IL-12 и иммунный агонист на основе IL-15 обеспечивают синергичный эффект в рамках, по меньшей мере, одного требуемого параметра, например синергичную активность и/или синергичную эффективность. Фрагменты могут быть введены в рамках одной и той же или различных композиций, которые при разделении вводятся с небольшим перерывом относительно друг друга, например в течение 24 часов относительно друг друга, или в течение приблизительно 1-8 часов относительно друг друга, и/или в течение 1-4 часов относительно друг друга или почти одновременно. Относительные количества представляют собой дозировки, которые обеспечивают достижение требуемого синергизма.

Термин "комбинированная терапия" охватывает введение каждого агента или терапию последовательным образом в рамках курса лечения, который будет обеспечивать полезные эффекты комбинации, а также совместное введение данных агентов или видов лечения по существу последовательным образом, например в рамках одной композиции, имеющей фиксированное соотношение данных активных агентов, или в рамках нескольких отдельных композиций для каждого агента. Комбинированная терапия также включает комбинации, в рамках

которых отдельные элементы могут быть введены в различное время и/или различными способами, но которые действуют в виде комбинации для обеспечения полезного эффекта за счет совместного действия или фармакокинетического и фармакодинамического эффекта каждого агента или подходов для лечения опухолей в рамках комбинированной терапии.

В соответствии с используемым здесь значением, термин "иммунная клетка" обозначает любую из различных типов клеток, которые функционируют в рамках иммунной системы, например для защиты против инфекционных агентов и чужеродных веществ. В рамках вариантов осуществления данный термин включает лейкоциты, например нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, лимфоциты и моноциты. Термин "иммунная клетка" включает описанные здесь иммунные эффекторные клетки. Термин "иммунная клетка" также обозначает модифицированные версии клеток, участвующих в иммунном ответе, например модифицированные NK-клетки, включая линию NK-клеток NK-92 (ATCC кат. номер CRL-2407), haNK (вариант NK-92, который экспрессирует Fc рецептор FcγRIIIa (158V) с высокой аффинностью) и taNK (нацеленные NK-92 клетки, трансфецированные геном, который экспрессирует CAR для соответствующего опухолевого антигена), например как описано у Klingemann et al. *supra*.

Термин "CD45", также известный как общий антиген лейкоцитов, обозначает белок CD45 человека и его виды, изоформы и другие варианты последовательности. Таким образом, CD45 может являться нативным полноразмерным белком или может представлять собой усеченный фрагмент или вариант последовательности (например встречающуюся в природе изоформу или рекомбинантный вариант), который сохраняет, по меньшей мере, одну биологическую активности нативного белка. CD45 представляет собой связанную с рецептором протеин-тирозинфосфатазу, которая экспрессируется на лейкоцитах и которая играет важную роль в плане функционирования данных клеток (описано в Altin, JG (1997) Immunol Cell Biol. 75(5):430-45, который приведен здесь в качестве ссылки). Например, внеклеточный домен CD45 экспрессируется в нескольких различных изоформах Т-клеток, при этом конкретная экспрессируемая изоформа (изоформы) зависят от конкретной субпопуляции клеток, их состояния зрелости, и подвергания воздействию антигена. Экспрессия CD45 является важной для активации Т-клеток за счет TCR, при этом различные изоформы CD45 демонстрируют различную способность обеспечивать активацию Т-клеток.

Термин "иммунная эффекторная клетка" в соответствии с используемым здесь значением обозначает клетку, которая участвует в иммунном ответе, например при промотировании иммунного эффекторного ответа. Примеры иммунных эффекторных клеток включают, но без ограничения, Т-клетки, например CD4 Т-клетки, CD8 Т-клетки, альфа Т-клетки, бета Т-клетки, гамма Т-клетки, и дельта Т-клетки; В-клетки; природные киллерные (NK) клетки; природные киллерные Т-клетки (NKT); дендритные клетки; и тучные клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой иммунную клетку (например Т-клетку или NK-клетку), которая включает, например экспрессирует, химерный антигенный рецептор (CAR),

например CAR, который связывается с раковым антигеном. В других вариантах осуществления иммунная клетка экспрессирует экзогенный Fc рецептор с высокой аффинностью. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка включает, например, экспрессирует модифицированный Т-клеточный рецептор. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой опухоль-инфильтрирующий лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки включают популяцию иммунных клеток и включают Т-клетки, которые были обогащены в плане специфичности в отношении опухоль-ассоциированного антигена (TAA), например обогащены путем сортинга Т-клеток со специфичностью в отношении MHC с представляющим интерес TAA, например MART-1. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки включают популяцию иммунных клеток и включают Т-клетки, которые были "обучены" для получения специфичности против TAA с помощью антигенпрезентирующей клетки (APC), например дендритной клетки с представляющими интерес TAA пептидами. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки являются обученными против TAA, выбранного из одного или нескольких из MART-1, MAGE-A4, NY-ESO-1, SSX2, сурвивина, и других. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки включают популяцию Т-клеток, которые были "обучены" для получения специфичности против нескольких TAA с помощью APC, например дендритной клетки с множеством представляющих интерес TAA пептидов. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой цитотоксическую Т-клетку (например CD8 Т-клетку). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой хелперную Т-клетку, например CD4 Т-клетку.

Термин "эффекторная функция" или "эффекторный ответ" обозначает специализированную функцию клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, включая секретирование цитокинов.

В соответствии с используемым здесь значением, термин "цитотоксические Т-лимфоциты" (CTL) обозначает Т-клетки, которые имеют способность убивать клетку-мишень. Активация CTL может осуществляться после двух следующих этапов: 1) осуществлено взаимодействие между связанной с антигеном молекулой MHC на клетке-мишени и Т-клеточным рецептором на CTL; и 2) передан костимулирующий сигнал путем активации костимулирующих молекул на Т-клетке и клетке-мишени. Затем CTL распознают конкретные антигены на клетках-мишенях и индуцируют разрушение данных клеток-мишеней, например с помощью лизиса клеток. В некоторых вариантах осуществления CTL экспрессирует CAR. В некоторых вариантах осуществления CTL экспрессирует модифицированный Т-клеточный рецептор.

Композиции и способы по настоящему изобретению охватывают полипептиды и нуклеиновые кислоты, имеющие указанные последовательности, или последовательности, являющиеся по существу идентичными или аналогичными им, например последовательности, являющиеся, по меньшей мере, на 85%, 90%, 95% или более идентичными указанным последовательностям. В контекста аминокислотной последовательности термин "по существу

идентичная" используется здесь для обозначения первой аминокислоты, которая содержит достаточное или минимальное количество аминокислотных остатков, которые i) идентичны или ii) представляют собой консервативные замещения сопоставленных аминокислотных остатков во второй аминокислотной последовательности, так что первая и вторая аминокислотная последовательность могут иметь общий структурный домен и/или общую функциональную активность. Например, аминокислотные последовательности, которые содержат общий структурный домен, имеющие, по меньшей мере, приблизительно 85%, 90%. 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность относительно контрольной последовательности, например указанной здесь последовательности.

В контексте нуклеотидной последовательности термин "по существу идентичная" используется здесь для обозначения первой последовательности нуклеиновой кислоты, которая содержит достаточное или минимальное количество нуклеотидов, которые идентичны сопоставленным нуклеотидам во второй последовательности нуклеиновой кислоты, так что первая и вторая последовательность нуклеиновой кислоты кодирую полипептид, имеющий общую функциональную активность, или кодируют общий структурный полипептидный домен или общую функциональную полипептидную активность. Например, нуклеотидные последовательности, имеющие, по меньшей мере, приблизительно 85%, 90%. 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность относительно контрольной последовательности, например указанной здесь последовательности.

Вычисления гомологии или идентичности последовательности между двух последовательностей (данные термины используются здесь взаимозаменяемым образом) осуществляются следующим образом.

Для определения процентного показателя идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновой кислоты последовательности сопоставляют в целях оптимального сравнения (например, в одну или обе из первой и второй аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты могут быть внесены гэпы для оптимального сопоставления, при этом негомологичные последовательности могут быть исключены для целей сравнения). В предпочтительном варианте осуществления длина контрольной последовательности, сопоставленной для целей сравнения, составляет, по меньшей мере, 30%, предпочтительно, по меньшей мере, 40%, более предпочтительно, по меньшей мере, 50%, 60%, и даже более предпочтительно, по меньшей мере, 70%, 80%, 90%, 100% длины контрольной последовательности. Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих аминокислотных положениях или нуклеотидных положениях. В том случае, если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы являются идентичными по данному положению (в соответствии с используемым здесь значением, "идентичность" аминокислоты или нуклеиновой кислоты эквивалентна "гомологии" аминокислоты или нуклеиновой кислоты).

Процентный показатель идентичности двух последовательностей зависит от количества положений идентичных аминокислот у этих двух последовательностей с учетом количества гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо ввести для оптимального сопоставления двух последовательностей.

Сравнение последовательностей и определение процентного показателя идентичности двух последовательностей может быть осуществлено с помощью математического алгоритма. Кроме того, процентный показатель идентичности двух аминокислотных последовательностей может быть определен с помощью алгоритма Needleman и Wunsch (Needleman and Wunsch. J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)), который включён в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступен на сайте www.gcg.com), с использованием матрицы Blossum 62 или матрицы PAM250, а также веса гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В другом предпочтительном варианте осуществления процентный показатель идентичность двух нуклеотидных последовательностей определяют с помощью программы GAP из пакета программного обеспечения GCG (доступен на сайте http://www.gcg.com) с использованием матрицы NWSgapdna.CMP и веса гэпа 40, 50, 60, 70, или 80 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5, или 6. Особенно предпочтительный набор параметров (и тот, который должен использоваться, если не указано иное) представляет собой скоринговую матрицу Blossum 62 со штрафом за гэп 12, штрафом за удлинение гэпа 4, и штрафом за гэп сдвига рамки считывания 5.

Процентный показатель идентичности двух аминокислотных последовательностей может быть определен с помощью алгоритма E. Meyers и W. Miller ((1989) CABIOS, 4:11-17), который был включён в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов остатков PAM120, штрафа за длину гэпа 12 и штрафа за гэп 4.

Описанные здесь последовательности нуклеиновых кислот и белков могут использоваться в качестве "последовательности для запроса" для осуществления поиска по публичным базам данных, например для идентификации других элементов семейства или родственных последовательностей. Такие поиски могут быть проведены с использованием программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиск нуклеотидов BLAST может быть осуществлен с использованием программы NBLAST, баллы = 100, длина слова = 12 с получением нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты (например SEQ ID NO: 1) по изобретению. Поиск белков BLAST может быть осуществлен с использованием программы XBLAST, балл = 50, длина слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белков по изобретению. Для получения сопоставлений с гэпами в целях сравнения может быть использована программа Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут быть использованы параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. http://www.ncbi.nlm.nih.gov. Очевидно, что молекулы по настоящему изобретению могут иметь дополнительные консервативные или несущественные аминокислотные замещения, которые не оказывают значительного влияния на их

функции.

Термин "аминокислота" предназначен для охватывания всех молекул, являющихся встречающимися в природе или синтетическими, которые включают как аминогруппы, так и карбоксильные (кислотные) группы и могут входить в состав полимеров встречающихся в природе аминокислот. Примеры аминокислот включают встречающиеся в природе аминокислоты; их аналоги, производные и родственные им; аналоги аминокислот, имеющие вариантные боковые цепи; и все стереоизомеры любых из вышеперечисленных. В соответствии с используемым здесь значением, термин "аминокислота" включает как D- или L- оптические изомеры, так и пептидомиметики.

"Консервативное аминокислотное замещение" представляет собой замещение, в котором аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком с аналогичной боковой цепью. В данной области были определены семейства аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи. Такие семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Термин "функциональный вариант" или "вариант" или "вариантная форма" в контексте полипептидов обозначает полипептид, который способен иметь, по меньшей мере, 10% одной или нескольких активностей встречающейся в природе последовательности. В некоторых вариантах осуществления функциональный вариант имеет значительную идентичность аминокислотной последовательности относительно встречающейся в природе последовательности или кодируется по существу идентичной нуклеотидной последовательностью, так что данный функциональный вариант имеет одну или несколько активностей встречающейся в природе последовательности.

Термин "молекула" в соответствии с используемым здесь значением может обозначать полипептид или нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, как указано в контексте. Данный термин включает полноразмерный, представляющий собой фрагмент или вариант встречающегося в природе относящегося к дикому типу полипептида или нуклеиновую кислоту, кодирующую его, например его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления вариант представляет собой производное, например мутант полипептида дикого типа или нуклеиновую кислоту, кодирующую его.

В соответствии с используемым здесь значением термин "выделенный" обозначает материал, который удален из его исходного или нативного окружения (например природной среды, если он встречается в природе). Например, встречающийся в природе полинуклеотид или полипептид, присутствующий в живом животном, не является выделенным, однако тот же полинуклеотид или полипептид, отделенный в результате вмешательства человека из того же или

всех сопутствующих материалов в рамках природной системы, является выделенным. Подобные полинуклеотиды могут представлять собой часть вектора и/или подобные полинуклеотиды или полипептиды могут представлять собой часть композиции и все равно являться выделенными, поскольку подобный вектор или композиция не является частью окружения, в котором они находится в природе.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" (в случае наличия одной цепи) используются здесь взаимозаменяемым образом для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может являться линейным или разветвленным, он может включать модифицированные аминокислоты и он может прерываться отличными от аминокислот фрагментами. Данные термины также охватывают аминокислотный полимер, который подвергся модификации; например, образованию дисульфидной связи, гликозилированию, липидизации, ацетилированию, фосфорилированию, или любой другой манипуляции, такой как конъюгирование с компонентом-меткой. Полипептид может быть выделен из природных источников, может быть получен с помощью рекомбинантных способов из эукариотического или прокариотического хозяина, или может являться продуктом синтетических способов.

Термины "нуклеиновая кислота", "последовательность нуклеиновой кислоты", "нуклеотидная последовательность", или "полинуклеотидная последовательность" и "полинуклеотид" используются взаимозаменяемым образом. Они обозначают полимерную форму нуклеотидов любой длины, которые представляют собой дезоксирибонуклеотиды или рибонуклеотиды, или их аналоги. Полинуклеотиды могут быть одноцепочечными или двуцепочечными, при этом в случае наличия одной цепи она может представлять собой кодирующую цепь или некодирующую (антисмысловую) цепь. Полинуклеотид может включать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. В последовательность нуклеотидов могут быть включены ненуклеотидные компоненты. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, такой как конъюгация с компонентом-меткой. Нуклеиновая кислота может представлять собой рекомбинантный полинуклеотид или полинуклеотид геномного, связанного с кДНК, полусинтетического или синтетического происхождения, который либо не встречается в природе, или связан с другим полинуклеотидом в рамках не относящейся к природе среды.

Термин "исходный полипептид" обозначает полипептид дикого типа, при этом аминокислотная последовательность или нуклеотидная последовательность полипептида дикого типа представляет собой часть публично доступной базы данных белков (например EMBL Nucleotide Sequence Database, NCBI Entrez, ExPasy, Protein Data Bank и им подобных).

Термин "мутантный полипептид" или "полипептидный вариант" или "мутеин" обозначает форму полипептида, в рамках которой его аминокислотная последовательность отличается от аминокислотной последовательности соответствующей ему формы дикого типа (исходной), встречающейся в природе формы или любой другой исходной формы. Мутантный полипептид

может содержать одну или несколько мутаций, например замещение, вставку, делецию и так далее, которые приводят к образованию мутантного полипептида.

Термин "соответствующий исходному полипептиду" (или грамматические вариации данного термина) используется для описания полипептида по настоящему изобретению, в рамках которого аминокислотная последовательность полипептида отличается от аминокислотной последовательности соответствующего исходного полипептида только наличием, по меньшей мере, вариации аминокислоты. Как правило, аминокислотные последовательности вариантного полипептида и исходного полипептида демонстрируют высокий процентный показатель идентичности. В одном примере термин "соответствующий исходному полипептиду" означает, что аминокислотная последовательность вариантного полипептида имеет, по меньшей мере, приблизительно 50% идентичность, по меньшей мере, приблизительно 60% идентичность, по меньшей мере, приблизительно 70% идентичность, по меньшей мере, приблизительно 80% идентичность, по меньшей мере, приблизительно 90% идентичность, по меньшей мере, приблизительно 95% идентичность или, по меньшей мере, приблизительно 98% идентичность относительно аминокислотной последовательности исходного полипептида. В другом примере последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует вариантный полипептид, имеет, по меньшей мере, приблизительно 50% идентичность, по меньшей мере, приблизительно 60% идентичность, по меньшей мере, приблизительно 70% идентичность, по меньшей мере, приблизительно 80% идентичность, по меньшей мере, приблизительно 90% идентичность, по меньшей мере, приблизительно 95% идентичность или, по меньшей мере, приблизительно 98% идентичность относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей исходный полипептид.

Термин "вносящий (или добавляющий и так далее) вариацию в исходный полипептид" (или его грамматические вариации) или "модифицирующий исходный полипептид" для включения вариации (или его грамматические вариации) не обязательно означает, что исходный полипептид физически представляет собой исходный материал для подобного превращения, но означает, что исходный полипептид обеспечивает наличие направляющей аминокислотной последовательности для получения варианта полипептида. В одном примере "внесение варианта в исходный полипептид" означает, что ген исходного полипептида подвергается модификации за счет подходящих мутаций для создания нуклеотидной последовательности. которая кодирует вариант полипептида. В другом примере "внесение варианта в исходный полипептид" означает, что полученный полипептид теоретически сконструирован с использованием последовательности исходного полипептида в качестве направляющей. Затем сконструированный полипептид может быть получен с помощью химических или иных спобов.

В соответствии с настоящим изобретением представляющая собой мишень "иммунная клетка" представляет собой содержащую ядро клетку, например содержащую ядро клетку, как описано здесь ниже. В более конкретных вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой, например иммунную эффекторную клетку (например иммунную клетку, выбранную из

лимфоцита, Т-клетки, В-клетки, или природной киллерной клетки (NK) или гемопоэтической стволовой клетки). В рамках вариантов осуществления иммунная клетка включает лимфоцит. В рамках вариантов осуществления иммунная клетка включает Т-клетку. В рамках вариантов осуществления иммунная клетка включает В-клетку. В рамках вариантов осуществления иммунная клетка включает природную киллерную клетку (NK). В рамках вариантов осуществления иммунная клетка включает гемопоэтическую стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой иммунную клетку (например Т-клетку или NK-клетку), которая включает, например экспрессирует, химерный антигенный рецептор (CAR), например CAR, который связывается с раковым антигеном. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка включает, например, экспрессирует модифицированный Т-клеточный рецептор. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой опухоль-инфильтрирующий лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой цитотоксическую Т-клетку (например CD8 Т-клетку). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой регуляторную Т-клетку ("Treg"). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой популяцию иммунных эффекторных клеток, например популяцию иммунных эффекторных клеток, выбранных из одного или нескольких следующих типов клеток: Т-клеток, например CD4 Т-клеток, CD8 Т-клеток, альфа Т-клеток, бета Т-клеток, гамма Т-клеток, и дельта Т-клеток; В-клеток; природных киллерных клеток (NK); природных киллерных Т- клеток (NKT); или дендритные клеток. В рамках вариантов осуществления иммунная клетка, например иммунная эффекторная клетка, имеет рецептор клеточной поверхности, который связывается с фрагментом для нацеливания на иммунную клетку. В рамках вариантов осуществления иммунная клетка представляет собой иммунную клетку, полученную от пациента, например из крови пациента. В других вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой иммунную клетку, полученную от здорового донора. В рамках вариантов осуществления иммунная клетка представляет собой иммунную клетку из эмбриональной стволовой клетки и/или iPSC клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой линию клеток, например линию стабильных или иммортализированных клеток.

Различные аспекты изобретения описаны более подробно ниже. Дополнительные определения приведены в рамках всего объема описания.

Молекулы цитокинов

Цитокины представляют собой белковоподобные сигнальные соединения, представляющие собой медиаторы иммунного ответа. Они контролируют многие различные клеточные функции, включая пролиферацию, дифференциацию и клеточную выживаемость/апоптоз; цитокины также принимают участие в нескольких патофизиологических процессах, включая вирусные инфекции и аутоиммунные заболевания. Цитокины синтезируются в результате воздействия различных стимулов различными клетками, включая клетки как

врожденной иммунной системы (моноциты, макрофаги, дендритные клетки), так и адаптивной иммунной системы (Т- и В-клетки). Цитокины могут быть разделены на две группы: про- и противовоспалительные. Провоспалительные цитокины, включая IFN- γ, IL-1, IL-6 и TNF-α, по большей части происходят из клеток врожденной иммунной системы и клеток Th1. Противовоспалительные цитокины, включая IL-10, IL-4, IL-13 и IL-5, синтезируются из иммунных клеток Th2.

В некоторых вариантах осуществления молекула цитокина IFM и/или белкового наногеля включает иммуномодуляторный цитокин, например провоспалительный цитокин или противовоспалительный цитокин. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой элемент семейства цитокинов с общей γ-цепью (γc). В некоторых вариантах осуществления молекула цитокина включает цитокин, выбранный из одного или нескольких из интерлейкина-15 (IL-15), интерлейкина-1, например интерлейкина-1 альфа (IL-1α) или интерлейкина-1 бета (IL-1β), интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-5 (IL-5), интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-7 (IL-7), интерлейкина-9 (IL-9), интерлейкина-10 (IL-10), интерлейкина-12 (IL-12), интерлейкина-13 (IL-13), интерлейкина-18 (IL-18), интерлейкина-21 (IL-21), интерлейкина-23 (IL-23), интерлейкина-27 (IL-27), интерлейкина-35 (IL-35), IFNγ, TNFα, IFNα, IFNβ, GM-CSF, или GCSF, включая их вариантные формы (например производное цитокина, комплекс, включающий молекулу цитокина с полипептидом, например комплекс цитокинового рецептора, и другие его агонистные формы). В некоторых вариантах осуществления молекула цитокина представляет собой молекулу провоспалительного цитокина, выбранную из молекулы цитокина IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, или IL-27. В некоторых вариантах осуществления молекула цитокина представляет собой молекулу противовоспалительного цитокина, выбранную из молекулы цитокина IL-4, IL-10, IL-13, IL-35. В некоторых вариантах осуществления молекула цитокина выбрана из IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 или IL-27, включая их вариантные формы (например производное цитокина, комплекс, включающий цитокиновую молекулу с полипептидом, например комплекс в виде цитокинового рецептора, и другие его агонистные формы, например ненейтрализующую молекулу антитела против цитокина). В некоторых вариантах осуществления молекула цитокина представляет собой суперагонист (SA), например как описано здесь. Например, суперагонист может иметь повышенную цитокинную активность, например, по меньшей мере, на 10%, 20%, 30% более высокую по сравнению со встречающимся в природе цитокином. В некоторых вариантах осуществления молекула цитокина представляет собой мономер или димер. В рамках вариантов осуществления молекула цитокина дополнительно включает рецептор или его фрагмент, например цитокиновый рецепторный домен.

Настоящее изобретение предусматривает, *inter alia*, IFM (например IFM полипептиды) и/или белковые наногели, которые включают, например являются модифицированными для включения, одного или несколько цитокиновых молекул, например иммуномодулирующих (например провоспалительных) цитокинов и их вариантов, например функциональных вариантов. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления молекула цитокина представляет собой

интерлейкин или вариант, например его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления интерлейкин представляет собой провоспалительный интерлейкин.

В рамках вариантов осуществления цитокиновая молекула представляет собой полноразмерную молекулу, фрагмент или вариант цитокина, например цитокина, включающего одну или несколько мутаций. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула включает цитокин, выбранный из интерлейкина-15 (IL-15), интерлейкина-1 альфа (IL-1 альфа), интерлейкина-1 бета (IL-1 бета), интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-5 (IL-5), интерлейкина-7 (IL-7), интерлейкина-12 (IL-12), интерлейкина-18 (IL-18), интерлейкина-21 (IL-21), интерлейкина-23 (IL-23), интерферона (IFN) α, IFN-β, IFN-γ, некроза опухоли альфа, GM-CSF, GCSF, или их фрагмента или варианта, или комбинацию из любых вышеуказанных цитокинов. В других вариантах осуществления цитокиновая молекула выбрана из интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-12 (IL-12), интерлейкина-15 (IL-15), интерлейкина-18 (IL-18), интерлейкина-21 (IL-21), или интерферона гамма, или их фрагмента или варианта, или комбинации из любых вышеуказанных цитокинов. Цитокиновая молекула может представлять собой мономер или димер. В рамках вариантов осуществления цитокиновая молекула также включает рецепторный домен, например цитокиновый рецепторный домен.

В некоторых вариантах осуществления цитокин или молекула фактора роста может представлять собой Treg ингибиторную молекулу, выбранную из одного или нескольких из IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-21, IL-23, IL-27 или TNF-α. IFN-γ промотирует хрупкость Treg и может снижать супрессию в рамках микросреды опухоли. IL-1 и IL-6, IL-21 и IL-23 могут индуцировать продуцирование Treg провоспалительного IL-17 и/или обеспечивать превращение Treg в подмножество Т-клеток Th17 Т. IL-12 промотирует продуцирование IFN-γ в Treg, что приводит к хрупкости Treg и в целом проиммуногенной среде. TNF-α как нарушает развитие Treg, так и снижает функцию существующих Treg. Таким образом, данные цитокины могут нарушать развитие Treg, снижать функцию Treg или индуцировать транс-дифференцирование Treg в активирующие иммунитет клетки.

В контексте рака, в рамках которого является желательным снижать активность Treg, один или несколько из ингибиторных цитокинов Treg могут быть системно доставлены с помощью Treg-специфичных IFM для общего снижения супрессии Treg. Биспецифическое нацеливание (например CD4:CD25, CD4:NRP1, CD4:CD39) может использоваться для направления системно инъецированных IFM к клеткам Treg *in vivo*. Данная концепция нацеливания на определенную популяцию клеток описана в Примерах. Затем данные IFM снижают количество и/или функцию Treg и переводят их в провоспалительное или иммуногенное состояние.

Кроме того, Treg-специфичные IFM могут быть загружены на противоопухолевые иммунные клетки *ex vivo* и доставлены к Treg с помощью trans или паракринной передачи сигнала. В данном случае данные противоопухолевые клетки создают локальную противосупрессивную среду за счет повышения локальной концентрации ингибиторных цитокинов Treg. Это может промотировать локальную (вместо общей) дисфункцию Treg.

В одном варианте осуществления молекула цитокина включает цитокин дикого типа, например относящийся к дикому типу, например имеющий аминокислотную последовательность человека. В других вариантах осуществления молекула цитокина включает аминокислотную последовательность, которая является по существу идентичной последовательности цитокина дикого типа, например последовательности цитокина человека. В некоторых вариантах осуществления молекула цитокина включает аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 95-100% идентична или имеет, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более аминокислотных изменений (например замещений, делеций или вставок, например консервативных замещений) по сравнению с последовательностью цитокина дикого типа, например последовательностью цитокина человека. В рамках вариантов осуществления молекула цитокина включает не более чем пять, десять или пятнадцать изменений (например замещений, делеций, или вставок, например консервативных замещений) по сравнению с последовательностью цитокина дикого типа, например последовательностью цитокина человека.

Здесь описаны примеры аминокислотных последовательностей цитокина, например аминокислотная последовательность IL-15 приведена в виде, например, SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:40; аминокислотная последовательность IL-12A приведена в виде, например, SEQ ID NO:46 и SEQ ID NO:47; аминокислотная последовательность IL-12B приведена в виде, например, SEQ ID NO:48 и SEQ ID NO:49; примеры продуктов слияния IL-12A и IL-12B описаны в виде, например, SEQ ID NO:50 и SEQ ID NO:51.

Молекулы IL-12

Интерлейкин-12 (IL-12) представляет собой гетеродимерный цитокин, состоящий из субъединиц p35 и p40, которые кодируются 2 отдельными генами, IL-12A и IL-12B, соответственно. IL-12 принимает участие в дифференциации наивных Т-клеток в клетки Th1. Он известен как стимулирующий Т-клетки фактор, который может стимулировать рост и функцию Т-клеток. Он стимулирует продуцирование интерферона-гамма (IFN-γ) и фактора-альфа некроза опухоли (TNF-α) из Т-клеток и естественных киллерных клеток (NK-клеток) и снижает опосредованную IL-4 супрессию IFN-γ. Т-клетки, которые продуцируют IL-12, имеют корецептор CD30, который связан с активностью IL-12.

IL-12 играет важную роль в плане активности NK-клеток и Т-лимфоцитов. IL-12 опосредует стимулирование цитотоксической активности NK-клеток и CD8 цитотоксических Т-лимфоцитов. Похоже, что также существует связь между IL-2 и сигнальной трансдукцией IL-12 в NK-клетках. IL-2 стимулирует экспрессию двух рецепторов IL-12: IL-12R-β1 и IL-12R-β2, обеспечивающих экспрессию критического белка, участвующего в передаче сигнала IL-12 в NK-клетках. Подвергнутый стимулированию функциональный ответ демонстрируется на основе продуцирования IFN-γ и гибели клеток-мишеней.

IL-12 также обладает антиангиогенной активностью, что означает, что он может блокировать образование новых кровяных сосудов. Он обеспечивает это благодаря повышению

продуцирования интерферона гамма, который в свою очередь повышает продуцирование хемокина, называемого индуцированным белком-10 (IP-10 или CXCL10). IP-10 затем опосредует данный антиангиогенный эффект. В связи с его способностью индуцировать иммунные ответы и его антиангиогенной активностью существовал интерес в отношении тестирования IL-12 в качестве положительного противоракового лекарства. Существует связь между IL-12 и псориазом и воспалительным заболеванием кишечника, которая может являться полезной при лечении.

IL-12 связывается с рецептором IL-12, который представляет собой гетеродимерный рецептор, образованный IL-12R-β1 и IL-12R-β2. Считается, что IL-12R-β2 играет ключевую роль в плане функционирования IL-12, поскольку он присутствует на активированных Т-клетках и стимулируется цитокинами, которые промотируют развитие Th1-клеток, и ингибируется цитокинами, которые промотируют развитие Th2-клеток. При связывании IL-12R-β2 фосфорилируется по тирозину и обеспечивает наличие участков связывания для киназ Tyk2 и Jak2. Они являются важными в плане активации критических белков-факторов транскрипции, таких как STAT4, которые участвуют в передаче сигнала IL-12 в Т-клетках и NK-клетках.

IL-12 является сильным цитокином, который потенциально может модифицировать противовоспалительную среду в солидных опухолях. Тем не менее, его клиническое применение было ограничено вследствие серьезной токсичности как при введении в растворимом виде , так и с помощью адаптивно перенесенных Т-клеток, являющихся модифицированными для секретирования IL-12. Описанный здесь связанный продукт слияния (TF) обеспечивает улучшенный контроль в плане дозировки и биораспределения цитокинов. В рамках систем на основе *in vitro* моделей цитокин IL12-TF обеспечивает стабильную нагрузку IL-12 на поверхность Т-клеток и устойчивую активацию Т-клеток и передачу сигнала ниже рецепторов IL-12. В свою очередь, это может обеспечивать активацию врожденного и приобретенного иммунитета.

IL-12 в рамках связанного продукта слияния может присутствовать в форме одной цепи, содержащей как IL-12A, так и IL-12B субъединицы. В некоторых вариантах осуществления IL-12 может присутствовать в виде неодиночной цепи (то есть в виде гетеродимера IL-12A и IL-12B, который представляет собой природную форму IL-12). Например, TF может быть получен путем совместной экспрессии трех субъединиц белка (тяжелой цепи Fab, легкой цепи Fab с IL-12A (или IL-12B) и IL-12B (или IL-12A).

Молекулы IL-15

В некоторых вариантах осуществления IFM и/или наногеля цитокиновая молекула представляет собой молекулу IL-15, например полноразмерную молекулу, фрагмент или вариант IL-15, например IL-15 человека. В рамках вариантов осуществления молекула IL-15 представляет собой IL-15 дикого типа человека, например имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В других вариантах осуществления молекула IL-15 представляет собой вариант IL-5 человека, например имеющий один или несколько аминокислотных модификаций.

В некоторых вариантах осуществления вариант IL-15 включает или состоит из мутации в

положении 45, 51, 52, или 72, например как описано в US 2016/0184399. В некоторых вариантах осуществления вариант IL-15 включает четыре, пять, или шесть или более мутаций.

В некоторых вариантах осуществления вариант IL-15 включает или состоит из одной или нескольких мутаций в аминокислотном положении 8, 10, 61, 64, 65, 72, 101, или 108 (относительно последовательности IL-15 человека, SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах осуществления вариант IL-15 обладает повышенной активностью по сравнению с IL-15 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант IL-15 обладает пониженной активностью по сравнению с IL-15 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант IL-15 обладает приблизительно двукратно, четырехкратно, десятикратно, 20-кратно, 40-кратно, 60-кратно, 100-кратно, или более чем 100-кратно сниженной активностью по сравнению с IL-15 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления мутация выбрана из D8N, K10Q, D61N, D61H, E64H, N65H, N72A, N72H, Q101N, Q108N, или Q108H (по сравнению с последовательностью IL-15 человека, SEQ ID NO: 11). Как будет очевидно средним специалистам в данной области, любая комбинация положений может быть подвергнута мутированию. В некоторых вариантах осуществления вариант IL-15 включает две или более мутации. В некоторых вариантах осуществления вариант IL-15 включает три или более мутации. В некоторых вариантах осуществления вариант IL-15 включает четыре, пять, или шесть или более мутаций. В некоторых вариантах осуществления вариант IL-15 включает мутации в положениях 61 и 64. В некоторых вариантах осуществления мутации в положениях 61 и 64 представляют собой D61N или D61H и E64Q или E64H. В некоторых вариантах осуществления вариант IL-15 включает мутации в положениях 61 и 108. В некоторых вариантах осуществления мутации в положениях 61 и 108 представляют собой D61N или D61H и Q108N или Q108H.

В рамках вариантов осуществления цитокиновая молекула также включает рецепторный домен, например цитокиновый рецепторный домен. В одном варианте осуществления цитокиновая молекула включает рецептор IL-15 или его фрагмент (например домен связывания IL-15 рецептора альфа IL-15), как описано здесь. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула представляет собой молекулу IL-15, например IL-15 или суперагонист IL-15, как описано здесь. В соответствии с используемым здесь значением, форма в виде "суперагониста" молекулы цитокина демонстрирует повышенную активность, например, по меньшей мере, на 10%, 20%, 30% более высокую по сравнению со встречающимся в природе цитокином. Примером суперагониста является IL-15 SA. В некоторых вариантах осуществления IL-15 SA включает комплекс IL-15 и связывающего фрагмента IL-15 рецептора IL-15, например рецептор альфа IL-15 или его связывающий IL-15 фрагмент, например как описано здесь. В рамках других вариантов осуществления цитокиновая молекула также включает рецепторный домен, например внеклеточный домен IL-15R альфа, необязательно связанный с Fc иммуноглобулина или молекулой антитела. В рамках вариантов осуществления цитокиновая молекула представляет собой суперагонист IL-15 (IL-15SA), как описано в WO 2010/059253. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула включает IL-15 и домен рецептора

альфа растворимого IL-15, слитый с Fc (например слитый белок sIL-15Ra-Fc), например как описано у Rubinstein et al *PNAS* 103:24 стр. 9166-9171 (2006).

Молекула IL-15 может также включать полипептид, например цитокиновый рецептор, например домен цитокинового рецептора, и второй являющийся гетерологичным домен. В одном варианте осуществления гетерологичный домен представляет собой Fc участок иммуноглобулина. В других вариантах осуществления гетерологичный домен представляет собой молекулу антитела, например фрагмент Fab, фрагмент Fab_2, фрагмент scFv, или фрагмент или производное аффитела, например фрагмент sdAb (нанотело), фрагмент антитела с тяжелой цепью. В некоторых вариантах осуществления полипептид также включает третий гетерологичный домен. В некоторых вариантах осуществления домен цитокинового рецептора представляет собой N-конец второго домена, а в других вариантах осуществления домен цитокинового рецептора представляет собой C-конец второго домена.

В других вариантах осуществления молекула IL-15 дополнительно включает рецепторный домен, например внеклеточный домен IL-15R альфа, необязательно связанный с Fc иммуноглобулина или молекулой антитела. В рамках вариантов осуществления цитокиновая молекула представляет собой суперагонист IL-15 (IL-15SA), как описано в WO 2010/059253. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула включает IL-15 и домен рецептора альфа растворимого IL-15, слитый с Fc (например слитый белок sIL-15Ra-Fc), например как описано у Rubinstein et al PNAS 103:24 стр. 9166-9171 (2006).

Молекула IL-15 может также включать полипептид, например цитокиновый рецептор, например домен цитокинового рецептора, и второй являющийся гетерологичным домен. В одном варианте осуществления гетерологичный домен представляет собой Fc участок иммуноглобулина. В других вариантах осуществления гетерологичный домен представляет собой молекулу антитела, например фрагмент Fab, фрагмент Fab_2, фрагмент scFv, или фрагмент или производное аффитела, например фрагмент sdAb (нанотело), фрагмент антитела с тяжелой цепью. В некоторых вариантах осуществления полипептид также включает третий гетерологичный домен. В некоторых вариантах осуществления домен цитокинового рецептора представляет собой N-конец второго домена, а в других вариантах осуществления домен цитокинового рецептора представляет собой C-конец второго домена.

Последовательность рецептора альфа IL-15 дикого типа и фрагменты и варианты данной последовательности приведены ниже.

Последовательность рецептора альфа IL-15 дикого типа (Genbank кат. # AAI21141.1): SEQ ID NO: 41.

Внеклеточный домен рецептора альфа IL-15 дикого типа (часть кат. # Q13261): SEQ ID NO: 63.

Изоформа CRA_d внеклеточного домена рецептора альфа IL-15 (часть кат. # EAW86418): SEQ ID NO: 64.

Последовательность рецептора альфа IL-15 дикого типа приведена выше в виде SEQ ID

NO: 41. Рецептор альфа IL-15 содержит внеклеточный домен, трансмембранный сегмент длиной 23 аминокислоты, и цитоплазматический хвост длиной 39 аминокислот. Внеклеточный домен рецептора альфа IL-15 приведен в виде SEQ ID NO: 63.

В других вариантах осуществления может использоваться агонист IL-15. Например, агонист рецептора IL-15, например молекула антитела (например агонистное антитело) для рецептора IL-15, которая обеспечивает, по меньшей мере, один вид активности встречающегося в природе цитокина. В рамках вариантов осуществления рецептор IL-15 или его фрагмент получен от человека или не являющегося человеком животного, например млекопитающего, например не являющегося человеком примата.

Описанные здесь композиции и способы могут включать часть IL-15Rα, например домен Sushi IL-15Rα. В некоторых вариантах осуществления полипептид включает домен Sushi и второй являющийся гетерологичным домен. В некоторых вариантах осуществления полипептид также включает третий гетерологичный домен. В некоторых вариантах осуществления домен Sushi представляет собой N-конец второго домена, а в других вариантах осуществления домен Sushi представляет собой C-конец второго домена. В рамках вариантов осуществления второй домен включает Fc домен.

Последовательность рецептора альфа IL-15 дикого типа приведена в виде SEQ ID NO: 41. Рецептор альфа IL-15 содержит внеклеточный домен, трансмембранный сегмент длиной 23 аминокислоты, и цитоплазматический хвост длиной 39 аминокислот. Домен sushi был описан в литературе, включая, например, Bergamaschi *et al.* (2008), *JBC* VOL. 283, NO. 7, pp. 4189–4199; Wei *et al.* (2001), *Journal of Immunology* 167:277-282; Schluns *et al.* (2004) *PNAS* Vol 110 (15) 5616–5621; US 2016/0184399 (содержание каждого из которых приведено здесь в качестве ссылки).

Внеклеточный домен рецептора альфа IL-15 приведен в виде SEQ ID NO: 63. Внеклеточный домен рецептора альфа IL-15 включает домен, обозначаемый как домен sushi, который связывает IL-15. Общий домен sushi, также обозначаемый как модули белка контроля комплемента (CCP) или короткие консенсусные повторы (SCR), представляет собой домен белка, присутствующий в различных белках, включая множество элементов комплементарной системы. В домене sushi используется бета-сэндвич складка, которая связывается первым и четвертым цистеином из четырех высококонсервативных цистеиновых остатков, образуя последовательность приблизительно из 60 аминокислот (Norman, Barlow, et al. J Mol Biol. 1991 Jun 20;219(4):717-25). Аминокислотные остатки, связанные первым и четвертым цистеинами домена sushi в 15Rα, включают полипептид длиной 62 аминокислоты, обозначаемый как минимальный домен (SEQ ID NO: 52). Включение дополнительных аминокислот IL-15Rα на N- и C-конце минимального домена sushi, например включение N-концевых остатков Ile и Thr и C-концевых остатков Ile и Arg приводит к получению удлиненного домена sushi длиной 65 аминокислот (SEQ ID NO: 9).

Домен sushi, как описано здесь, может включать одну или несколько мутаций по сравнению с доменом sushi дикого типа. Например, остаток 77 IL-15Ra представляет собой лейцин в гене дикого типа (и подчеркнут в SEQ ID NO: 41), но он может быть подвергнут

мутированию в изолейцин (L77I). Соответственно, минимальный домен sushi, включающий L77I (с нумерацией, соответствующей IL-15Ra дикого типа согласно SEQ ID NO: 41), указан как SEQ ID NO: 65. Удлиненный домен sushi, включающий L77I (с нумерацией, соответствующей IL-15Ra дикого типа согласно SEQ ID NO: 41), указан как SEQ ID NO: 66.

Минимальный домен sushi дикого типа:
CPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKC (SEQ ID NO: 52)

Удлиненный домен sushi дикого типа:
ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR (SEQ ID NO: 9)

Минимальный домен sushi, L77I:
CPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVINKATNVAHWTTPSLKCI (SEQ ID NO: 65)

Удлиненный домен sushi, L77I:
ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVINKATNVAHWTTPSLKCIR (SEQ ID NO: 66)

В некоторых вариантах осуществления домен sushi состоит из 62-171 аминокислот согласно SEQ ID NO: 63 или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно нее, имеющих активность в виде связывания IL-15. В некоторых вариантах осуществления домен sushi состоит из 65-171 аминокислот согласно SEQ ID NO: 63 или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно нее, имеющих активность в виде связывания IL-15. В некоторых вариантах осуществления домен sushi состоит из 171 аминокислот согласно SEQ ID NO: 63 или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно нее, имеющих активность в виде связывания IL-15. В некоторых вариантах осуществления домен sushi состоит из 62-171, 62-160, 62-150, 62-140, 62-130, 62-120, 62-110, 62-100, 62-90, 62-80, 62-70, 65-171, 65-160, 65-150, 65-140, 65-130, 65-120, 65-110, 65-100, 65-90, 65-80, или 65-70 аминокислот согласно SEQ ID NO: 63 или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно нее, имеющих активность в виде связывания IL-15. В некоторых вариантах осуществления домен sushi состоит из 62-171, 62-160, 62-150, 62-140, 62-130, 62-120, 62-110, 62-100, 62-90, 62-80, 62-70, 65-171, 65-160, 65-150, 65-140, 65-130, 65-120, 65-110, 65-100, 65-90, 65-80, или 65-70 аминокислот согласно SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления домен sushi включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 52.

В некоторых вариантах осуществления домен sushi состоит из 62-171 аминокислот согласно SEQ ID NO: 63 или последовательности, имеющей до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, или 40 модификаций (например замещений) по сравнению с ней, имеющих активность в

виде связывания IL-15. В некоторых вариантах осуществления домен sushi состоит из 171 аминокислот согласно SEQ ID NO: 63 или последовательности, имеющей до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, или 40 модификаций (например замещений) по сравнению с ней, имеющих активность в виде связывания IL-15. В некоторых вариантах осуществления домен sushi состоит из 62-171, 62-160, 62-150, 62-140, 62-130, 62-120, 62-110, 62-100, 62-90, 62-80, 62-70, 65-171, 65-160, 65-150, 65-140, 65-130, 65-120, 65-110, 65-100, 65-90, 65-80, или 65-70 аминокислот согласно SEQ ID NO: 63 или последовательности, имеющей до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, или 40 модификаций (например замещений) по сравнению с ней, имеющих активность в виде связывания IL-15.

В некоторых вариантах осуществления домен sushi включает, по меньшей мере, 62 аминокислоты согласно SEQ ID NO: 63 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно нее, при этом последовательность включает мутацию L77I по сравнению с IL-15Ra дикого типа, имеющих активность в виде связывания IL-15. В некоторых вариантах осуществления домен sushi включает, по меньшей мере, 65 аминокислоты согласно SEQ ID NO: 63 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно нее, при этом последовательность включает мутацию L77I по сравнению с IL-15Ra дикого типа, имеющих активность в виде связывания IL-15. В некоторых вариантах осуществления домен sushi включает часть SEQ ID NO: 63 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно нее, при этом последовательность включает мутацию L77I по сравнению с IL-15Ra дикого типа, имеющих активность в виде связывания IL-15. В некоторых вариантах осуществления домен sushi включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 52.

В некоторых вариантах осуществления домен sushi включает, по меньшей мере, 62 аминокислоты согласно SEQ ID NO: 63 или последовательность, имеющую до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, или 40 модификаций (например замещений) по сравнению с ней, при этом последовательность включает мутацию L77I по сравнению с IL-15Ra дикого типа, имеющих активность в виде связывания IL-15. В некоторых вариантах осуществления домен sushi включает часть SEQ ID NO: 66 или последовательность, имеющую до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, или 40 модификаций (например замещений) по сравнению с ней, при этом последовательность включает мутацию L77I по сравнению с IL-15Ra дикого типа, имеющих активность в виде связывания IL-15.

В рамках вариантов осуществления домен sushi включает, по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 62, 65, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, или 160 последовательных аминокислот SEQ ID NO: 63 или последовательность, имеющую мутацию L77I по сравнению с ними. В рамках вариантов осуществления домен sushi состоит из 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, или 160-170 последовательных аминокислот SEQ ID NO: 63 или последовательности, имеющей мутацию L77I

по сравнению с ними.

В рамках вариантов осуществления домен sushi представляет собой домен sushi человека или не являющегося человеком животного, например млекопитающего, например не являющегося человеком примата.

В некоторых вариантах осуществления полипептид может иметь второй, являющийся гетерологичным домен, например Fc домен или Fab домен.

В некоторых вариантах осуществления полипептид, включающий рецептор IL-15 или его фрагмент, включает Fc домен. В рамках вариантов осуществления Fc домен представляет собой эффектор-аттенуированный домен, например Fc домен IgG2 человека, например Fc домен IgG2 человека согласно SEQ ID NO: 54 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность относительно него.

В рамках вариантов осуществления эффектор-аттенуированный Fc домен имеет пониженную эффекторную активность, например по сравнению с Fc доменом IgG1 дикого типа, например по сравнению с Fc доменом IgG1 дикого типа согласно SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления эффекторная активность включает антитело-зависимую клеточную токсичность (ADCC). В рамках вариантов осуществления эффекторная активность снижена на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, или 99% в рамках ADCC анализа, например по сравнению с Fc доменом IgG1 дикого типа согласно SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления эффекторная активность включает комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). В рамках вариантов осуществления эффекторная активность снижена на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% в рамках CDC анализа, например CDC анализа, описанного в Armour et al., “Recombinant human IgG molecules lacking Fc gamma receptor I binding and monocyte triggering activities.” Eur J Immunol (1999) 29:2613-24”, например по сравнению с Fc доменом IgG1 дикого типа согласно SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления Fc домен включает Fc домен IgG1 согласно SEQ ID NO: 67 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность относительно него.

В некоторых вариантах осуществления Fc домен включает константный участок IgG2 согласно SEQ ID NO: 68 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность относительно него.

В некоторых вариантах осуществления Fc домен включает Fc домен IgG2Da согласно SEQ ID NO: 55 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность относительно него. В рамках вариантов осуществления Fc домен включает одну или обе из мутаций A330S и P331S с использованием нумерации по Kabat. В рамках вариантов осуществления Fc домен представляет собой домен, описанный в Armour et al. “Recombinant human IgG molecules lacking Fc gamma receptor I binding and monocyte triggering activities.” Eur J Immunol (1999) 29:2613-24.

В некоторых вариантах осуществления Fc домен имеет димеризационную активность. В

других вариантах осуществления Fc домен представляет собой домен IgG, например Fc домен IgG1, IgG2, IgG3, или IgG4. В одном варианте осуществления Fc домен включает домен CH2 и домен CH3. В некоторых вариантах осуществления наночастица включает белок, имеющий последовательность согласно SEQ ID NO: 56 (sushi-IgG2Da-Fc) или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность относительно него.

В некоторых вариантах осуществления IFM включает описанный здесь домен sushi (например в SEQ ID NO: 9) и описанный здесь Fc домен, например Fc домен IgG2 (например SEQ ID NO: 54 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно него). В некоторых вариантах осуществления IFM включает домен sushi согласно SEQ ID NO: 9 и описанный здесь Fc домен, например Fc домен IgG1, например Fc домен согласно SEQ ID NO: 67 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно него. В некоторых вариантах осуществления IFM включает домен sushi согласно SEQ ID NO: 52 и Fc домен IgG2, например Fc домен согласно SEQ ID NO: 54 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно него. В некоторых вариантах осуществления IFM включает домен sushi согласно SEQ ID NO: 52 и Fc домен IgG1, например Fc домен согласно SEQ ID NO: 67 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно него.

В некоторых вариантах осуществления IFM включает домен sushi согласно SEQ ID NO: 9 и Fc домен IgG2Da, например Fc домен согласно SEQ ID NO: 56 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно него. В некоторых вариантах осуществления IFM включает домен sushi согласно SEQ ID NO: 52 и Fc домен согласно SEQ ID NO: 56 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно него. В некоторых вариантах осуществления IFM включает белок sushi-IgG2Da-Fc, имеющий последовательность согласно SEQ ID NO: 56 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность относительно него.

В рамках вариантов осуществления домен sushi представляет собой домен sushi человека или не являющегося человеком животного, например млекопитающего, например не являющегося человеком примата.

В рамках вариантов осуществления композиция включает, например наночастица включает комплекс IL-15, при этом комплекс IL-15 включает молекулу IL-15 в виде комплекса, например на основе ковалентной или нековалентной связи, с полипептидов, при этом полипептид включает первый домен, включающий:

i) по меньшей мере, 62 аминокислоты внеклеточного домена рецептора альфа IL-15 дикого типа согласно SEQ ID NO: 63, при этом наиболее длинная непрерывная последовательность рецептора альфа IL-15 полипептида имеет длину не более 171 аминокислоты, или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно него, имеющих активность в виде связывания IL-15;

ii) по меньшей мере, 62 аминокислоты согласно SEQ ID NO: 63, при этом наиболее длинная непрерывная последовательность рецептора альфа IL-15 полипептида имеет длину не более 171 аминокислоты, или последовательность, отличающуюся не более чем на 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислот от соответствующей последовательности согласно SEQ ID NO: 63, имеющих активность в виде связывания IL-15;

iii) по меньшей мере, 62 аминокислоты согласно SEQ ID NO: 63, при этом наиболее длинная непрерывная последовательность рецептора альфа IL-15 полипептида имеет длину не более 171 аминокислоты, имеющих активность в виде связывания IL-15;

iv) активный фрагмент, например фрагмент для связывания IL-15 минимального домена sushi и не более чем 171 последовательных аминокислотных остатков согласно SEQ ID NO: 63 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно него;

v) активный фрагмент, например фрагмент для связывания IL-15 минимального домена sushi и не более чем 171 последовательных аминокислотных остатков согласно SEQ ID NO: 63 или последовательность, отличающуюся не более чем на 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислот от соответствующей последовательности согласно SEQ ID NO: 63;

vi) активный фрагмент, например фрагмент для связывания IL-15 минимального домена sushi и не более чем 171 последовательных аминокислотных остатков согласно SEQ ID NO: 63;

vii) активный фрагмент, например фрагмент для связывания IL-15 удлиненного домена sushi и не более чем 171 последовательных аминокислотных остатков согласно SEQ ID NO: 63 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно него;

viii) активный фрагмент, например фрагмент для связывания IL-15 удлиненного домена sushi и не более чем 171 последовательных аминокислотных остатков согласно SEQ ID NO: 63 или последовательность, отличающуюся не более чем на 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислот от соответствующей последовательности согласно SEQ ID NO: 63;

ix) активный фрагмент, например фрагмент для связывания IL-15 удлиненного домена sushi и не более чем 171 последовательных аминокислотных остатков согласно SEQ ID NO: 63; или

x) по меньшей мере, 62 аминокислоты согласно SEQ ID NO: 63 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно нее, имеющих активность в виде связывания IL-15, при этом

аминокислота 77 (с нумерацией на основе рецептора альфа IL-15 дикого типа согласно SEQ ID NO: 41) представляет собой изолейцин;

xi) по меньшей мере, 62 аминокислоты согласно SEQ ID NO: 63 или последовательность, которая отличается не более чем 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислот от соответствующей последовательности согласно SEQ ID NO: 63, имеющих активность в виде связывания IL-15, и при этом аминокислота 77 представляет собой изолейцин;

xii) по меньшей мере, 62 аминокислоты согласно SEQ ID NO: 63, имеющих активность в виде связывания IL-15, и при этом аминокислота 77 представляет собой изолейцин;

xiii) активный фрагмент, например фрагмент для связывания IL-15 минимального или удлиненного домена sushi или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно него, при этом аминокислота 77 представляет собой изолейцин;

xiv) активный фрагмент, например фрагмент для связывания IL-15 минимального или удлиненного домена sushi или последовательность, которая отличается не более чем на 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислот от соответствующей последовательности согласно SEQ ID NO: 63, при этом аминокислота 77 представляет собой изолейцин; или

xv) активный фрагмент, например фрагмент для связывания IL-15 минимального или удлиненного домена sushi, при этом аминокислота 77 представляет собой изолейцин; и

необязательно второй, являющийся гетерологичным домен, например Fc домен или Fab домен.

В некоторых вариантах осуществления полипептид, включающий рецептор IL-15 или его фрагмент, включает домен Fc. В рамках вариантов осуществления Fc домен представляет собой эффектор-аттенуированный Fc домен, например Fc домен IgG2 человека, например домен IgG2 человека согласно SEQ ID NO: 54 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность относительно него.
ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 54)

В рамках вариантов осуществления эффектор-аттенуированный Fc домен имеет пониженную эффекторную активность, например по сравнению с Fc доменом IgG1 дикого типа, например по сравнению с Fc доменом IgG1 дикого типа согласно SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления эффекторная активность включает антитело-зависимую клеточную токсичность (ADCC). В рамках вариантов осуществления эффекторная активность снижена на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, или 99% в рамках ADCC анализа, например по сравнению с Fc доменом IgG1 дикого типа согласно SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления эффекторная активность включает комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). В рамках вариантов осуществления эффекторная активность снижена на 10%, 20%, 30%,

40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% в рамках CDC анализа, например CDC анализа, описанного в Armour et al., “Recombinant human IgG molecules lacking Fc gamma receptor I binding and monocyte triggering activities.” Eur J Immunol (1999) 29:2613-24”, например по сравнению с Fc доменом IgG1 дикого типа согласно SEQ ID NO: 53.

В некоторых вариантах осуществления Fc домен включает Fc домен IgG1 согласно SEQ ID NO: 53 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность относительно него.
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 53)

В некоторых вариантах осуществления Fc домен включает константный участок IgG2 согласно SEQ ID NO: 68 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность относительно него.
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 68)

В некоторых вариантах осуществления Fc домен включает Fc домен IgG2Da согласно SEQ ID NO: 55 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность относительно него. В рамках вариантов осуществления Fc домен включает одну или обе из мутаций A330S и P331S с использованием нумерации по Kabat. В рамках вариантов осуществления Fc домен представляет собой домен, описанный в Armour et al. “Recombinant human IgG molecules lacking Fc gamma receptor I binding and monocyte triggering activities.” Eur J Immunol (1999) 29:2613-24.
ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPssIEKTISKTKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 55; IgG2Da-Fc)

В некоторых вариантах осуществления Fc домен имеет димеризационную активность. В других вариантах осуществления Fc домен представляет собой домен IgG, например Fc домен IgG1, IgG2, IgG3, или IgG4. В одном варианте осуществления Fc домен включает домен CH2 и домен CH3. В некоторых вариантах осуществления наночастица включает белок, имеющий последовательность согласно SEQ ID NO: 56 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность относительно нее.

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR
ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 56; sushi-IgG2Da-Fc)

В некоторых вариантах осуществления наночастица включает описанный здесь домен sushi (например в SEQ ID NO: 9) и описанный здесь Fc домен, например Fc домен IgG2 (например SEQ ID NO: 54 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно него). В некоторых вариантах осуществления наночастица включает домен sushi согласно SEQ ID NO: 9 и описанный здесь Fc домен, например Fc домен IgG1, например Fc домен согласно SEQ ID NO: 53 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно него. В некоторых вариантах осуществления наночастица включает домен sushi согласно SEQ ID NO: 52 и Fc домен IgG2, например Fc домен согласно SEQ ID NO: 54 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно него. В некоторых вариантах осуществления наночастица включает домен sushi согласно SEQ ID NO: 52 и Fc домен IgG1, например Fc домен согласно SEQ ID NO: 53 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно него.

В некоторых вариантах осуществления наночастица включает домен sushi согласно SEQ ID NO: 9 и Fc домен IgG2Da согласно SEQ ID NO: 55 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно него. В некоторых вариантах осуществления наночастица включает домен sushi согласно SEQ ID NO: 52 и Fc домен IgG2Da согласно SEQ ID NO: 55 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность относительно него. В некоторых вариантах осуществления наночастица включает белок sushi-IgG2Da-Fc, имеющий последовательность согласно SEQ ID NO: 56 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность относительно него.

В рамках вариантов осуществления молекула IL-15 представляет собой молекулу, описанную в международной заявке WO2017/027843, которая полностью приведена здесь в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления молекула IL-15 представляет собой IL-15SA. Комбинация IL-15 человека с растворимым IL-15Ra человека обеспечивает образование комплекса, обозначаемого как суперагонист IL-15 (IL-15SA), который обладает более высокой биологической активностью, чем IL-15 человека в самостоятельном виде.

Растворимый IL-15Ra человека, а также усеченные версии внеклеточного домена были описаны, например в (Wei et al., 2001, J. of Immunol. 167: 277-282). Аминокислотная последовательность IL-15Ra человека указана здесь в SEQ ID NO: 2. Соответственно, некоторые аспекты изобретения относятся к IL-15SA, включающему комплекс IL-15 человека и молекулы растворимого IL-15R человека. В некоторых аспектах изобретения IL-15SA включает комплекс IL-15 человека и растворимый IL-15Ra человека, включающий весь или часть внеклеточного домена без трансмембранного или цитоплазматического домена. В некоторых аспектах изобретения IL-15SA включает комплекс IL-15 человека и растворимый IL-15Ra человека, включающий полноразмерный внеклеточный домен или усеченную форму внеклеточного домена, которая сохраняет активность в виде связывания IL-15. Некоторые аспекты изобретения относятся к IL-15SA, включающему комплекс IL-15 человека и растворимый IL-15Ra человека, включающий усеченную форму внеклеточного домена, который сохраняет активность в виде связывания IL-15, например аминокислоты 1-60, 1-61 , 1-62, 1-63, 1-64 или 1-65 IL-15Ra человека. В некоторых аспектах изобретения IL-15SA включает комплекс IL-15 человека и растворимый IL-15Ra человека, включающий усеченную форму внеклеточного домена, который сохраняет активность в виде связывания IL-15, например аминокислоты 1-80, 1-81, 1-82, 1-83, 1-84 или 1-85 IL-15Ra человека. В некоторых аспектах изобретения IL-15SA включает комплекс IL-15 человека и растворимый IL-15Ra человека, включающий усеченную форму внеклеточного домена, который сохраняет активность в виде связывания IL-15, например аминокислоты 1 -180, 1-181, или 1-182 IL-15Ra человека.

Некоторые аспекты изобретения относятся к IL-15SA, включающему комплекс IL-15 человека и растворимый IL-15Ra человека, включающий усеченную форму внеклеточного домена, которая сохраняет активность в виде связывания IL-15 и включает домен sushi. Усеченные формы растворимого IL-15Ra человека, которые сохраняют активность в виде связывания IL-15 и включают домен sushi, используются в рамках IL-15SA по настоящему изобретению.

Мутантные формы IL-15 человека были описаны, например, в Zhu et al, 2009 J of Immunol. 183:3598. Соответственно, настоящее изобретение предусматривает любые из указанных выше комплексов IL-15SA, в которых IL-15 человека относится к дикому типу или представляет собой мутантный IL-15, включающий одну или несколько мутаций (например одно или несколько аминокислотных замещений, добавлений или делеций). Пример мутанта IL-15, имеющего повышенную биологическую активность по сравнению с IL-15 дикого типа для применения в рамках IL-15SA по настоящему изобретению, включает замещение аспарагина на аспарагиновую кислоту в аминокислотном положении 72 (N72D).

В рамках любого из приведенных выше вариантов осуществления настоящее изобретение относится к комплексу, включающему растворимый IL-15Ra человека, экспрессируемый в виде слитого белка, например продукта слияния Fc, как описано здесь (например Fc IgG1 человека), с IL-15. В некоторых вариантах осуществления IL-15SA включает димерный слитый белок IL-

15RaFc человека (например Fc IgG1 человека) в виде комплекса с двумя молекулами IL-15 человека. В некоторых вариантах осуществления цитокиновый комплекс IL-15SA включает молекулу IL-15, включающую аминокислотную последовательность, указанную здесь в SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления цитокиновый комплекс IL-15SA включает молекулу IL-15, включающую аминокислотную последовательность, указанную здесь в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 международной заявки WO2017/027843, которая приведена здесь в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления цитокиновый комплекс IL-15SA включает молекулу растворимого IL-15Ra, включающую аминокислотную последовательность, указанную здесь в SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 65, или SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления цитокиновый комплекс IL-15SA включает молекулу растворимого IL-15Ra, включающую последовательность, указанную здесь в SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 52 международной заявки WO2017/027843, которая приведена здесь в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления IL-15SA представляет собой цитокиновый комплекс, включающий димерный слитый белок IL-15RaFc в виде комплекса с двумя молекулами IL-15. В некоторых вариантах осуществления IL-15-SA включает димерный IL-15RaSu(домен sushi)/Fc (SEQ ID NO: 13) и две молекулы IL-15N72D (SEQ ID NO: 11). В рамках вариантов осуществления IL-15SA включает ALT-803, как описано в заявке US20140134128, которая приведена здесь в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления IL-15SA включает димерную молекулу IL-15RaSu/Fc (SEQ ID NO: 13) и две молекулы IL-15 (SEQ ID NO: 10).

В некоторых вариантах осуществления IL-15SA включает молекулу растворимого IL-15Ra (например SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 52) и две молекулы IL-15 (например SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11).

Белковый наногель/наночастицы

Здесь описаны композиции, например наночастицы (например наногели), которые включают один или несколько белков (например биологически активных белков, например терапевтических белков). Примеры наночастиц (например наногелей) и способы их получения описаны в публикации международной заявки WO 2010/059253, озаглавленной “Способы и композиции для локализованной доставки агентов” и публикации международной заявки WO 2015/048498, озаглавленной “Биологически активные белковые наночастицы без носителя”, содержание обеих из которых полностью приведено здесь в качестве ссылки.

Термин "частица" в соответствии с используемым здесь значением включает множество белков (например, по меньшей мере, 2), например множество цитокиновых молекул, как описано здесь. В некоторых вариантах осуществления частицы представляют собой наночастицы, имеющие диаметр в диапазоне 1-1000 нанометров (нм). В некоторых вариантах осуществления

диаметр наночастиц находится в диапазон 20-750 нм, или 20-500 нм, или 20-250 нм. В некоторых вариантах осуществления диаметр наночастиц находится в диапазон 50-750 нм, или 50-500 нм, или приблизительно 100-300 нм. В некоторых вариантах осуществления диаметр наночастиц составляет около 100, около 150, около 200 нм, около 250 нм, или около 300 нм. В рамках вариантов осуществления наночастицы являются по существу сферическими.

В рамках вариантов осуществления наночастицы имеют средний гидродинамический диаметр (например при измерении на основе динамического рассеяния света) от 30 нм до1200 нм, от 40 нм до 1100 нм, от 50 нм до 1000 нм, например 50-500 нм, более типично от 70 до 400 нм.

В некоторых вариантах осуществления наночастицы включают или состоят из наногеля, например как описано здесь. В рамках вариантов осуществления белки в наногелях являются связанными, например ковалентно связанными или поперечно связанными друг с другом и/или со вторым компонентом частицы (например белки обратимо связаны с помощью расщепляемого линкера). В рамках вариантов осуществления белки присутствуют в полимере или диоксиде кремния, например в оболочке на основе полимера или диоксида кремния. В рамках вариантов осуществления наночастица включает нанооболочку, как описано здесь.

В рамках вариантов осуществления белок является обратимо связанным с помощью расщепляемого линкера с функциональной группой или полимером или "обратимо модифицированным". В некоторых вариантах осуществления нанооболочка может быть образована с помощью полимеризации функциональных групп (например силанов) белкового конъюгата с поперечным линкером (например силан-PEG-силаном) в присутствии катализатора (например NaF). Пример белковой наночастицы представляет собой "белковый наногель", обозначающий множество белков, являющихся поперечно связанными друг с другом (например поперечно связанных обратимым образом или ковалентно) с помощью расщепляемого линкера (см., например, Фиг.9 WO2015/048498). В некоторых вариантах осуществления белки наногеля являются поперечно связанными (например поперечно связанными обратимым образом или ковалентно) с полимером (например гидрофильным полимером, таким как полиэтиленгликоль (PEG); см., например, Фиг.9A WO2015/048498). В некоторых вариантах осуществления полимер может быть поперечно связан с поверхностью наногеля (например с белками на поверхности наногеля).

Размер белкового наногеля может быть определен, по меньшей мере, двумя способами: на основе его "сухого размера" и на основе его "гидродинамического размера". Термин "сухой размер" белкового наногеля обозначает диаметр наногеля в виде сухого твердого вещества. Термин "гидродинамический размер" белкового наногеля обозначает диаметр наногеля в виде гидратированного геля (например наногеля в водном буфере). Сухой размер наногеля может быть определен, например, с помощью просвечивающей электронной микроскопии, в то время как гидродинамический размер наногеля может быть определен, например, с помощью динамического рассеяния света.

В некоторых вариантах осуществления сухой размер наногеля составляет менее чем 400 нм. В некоторых вариантах осуществления сухой размер наногеля составляет менее чем 300 нм, менее чем 200 нм, менее чем 100 нм, менее чем 80 нм, менее чем 75 нм, менее чем 70 нм, менее чем 65 нм, или менее чем 60 нм. В некоторых вариантах осуществления сухой размер наногеля составляет от 40 до 90 нм, от 40 до 80 нм, от 40 до 70 нм, от 40 до 60 нм, от 50 до 90 нм, от 60 до 80 нм, от 50 до 70 нм, или от 50 до 60 нм. В некоторых вариантах осуществления сухой размер наногеля составляет 40 нм, 45 нм, 50 нм, 55 нм, 60 нм, 65 нм, 70 нм, 75 нм, 80 нм, 85 нм, 90 нм или 95 нм.

В некоторых вариантах осуществления средний сухой размер наночастицы (например наногеля) в рамках множества наночастиц составляет менее чем 400 нм. В некоторых вариантах осуществления средний сухой размер наночастицы в рамках подобного множества варьируется на более чем на 5% или 10%. В некоторых вариантах осуществления средний сухой размер наночастицы (например наногеля) в рамках множества наночастиц составляет менее чем 300 нм, менее чем 200 нм, менее чем 100 нм, менее чем 80 нм, менее чем 75 нм, менее чем 70 нм, менее чем 65 нм, или менее чем 60 нм. В некоторых вариантах осуществления средний сухой размер наночастицы (например наногеля) в рамках множества наночастиц составляет от 40 до 90 нм, от 40 до 80 нм, от 40 до 70 нм, от 40 до 60 нм, от 50 до 90 нм, от 60 до 80 нм, от 50 до 70 нм, или от 50 до 60 нм. В некоторых вариантах осуществления сухой размер наногеля составляет 40 нм, 45 нм, 50 нм, 55 нм, 60 нм, 65 нм, 70 нм, 75 нм, 80 нм, 85 нм, 90 нм или 95 нм.

В некоторых вариантах осуществления средний гидродинамический размер наночастицы (например наногеля) в рамках множества наночастиц составляет менее чем 1000 нм. В некоторых вариантах осуществления средний гидродинамический размер наночастицы рамках подобного множества имеет индекс полидисперсности при измерении с помощью динамического рассеяния света менее чем 0,35. В некоторых вариантах осуществления средний гидродинамический размер наночастицы (например наногеля) в рамках множества наночастиц составляет менее чем 500 нм, менее чем 400 нм, менее чем 300 нм, менее чем 200 нм или менее чем 100 нм. В некоторых вариантах осуществления средний гидродинамический размер наночастицы (например наногеля) в рамках множества наночастиц составляет от 400 до 500 нм, от 300 до 400 нм, от 200 до 300 нм, от 100 до 200 нм, от 50 до 100 нм.

В некоторых вариантах осуществления сухой размер биологически активных белково-полимерных наногелей составляет менее чем 300 нм в диаметре. Например, сухой размер биологически активных белково-полимерных наногелей может составлять 50-200 нм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления белковые наногели множества, как предусмотрено здесь, имеют схожий сухой размер (например где 70% наногелей имеют 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 100% диаметр относительно друг друга и имеют индекс полидисперсности при измерении с помощью динамического рассеяния света менее чем 0,35).

В некоторых вариантах осуществления гидродинамический размер биологически активных белково-полимерных наногелей составляет менее чем 150 нм в диаметре. Например,

гидродинамический размер биологически активных белково-полимерных наногелей может составлять 50-100 нм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления белковые наногели множества, как предусмотрено здесь, имеют схожий гидродинамический размер (например где 70% наногелей имеют 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 100% диаметр относительно друг друга и имеют индекс полидисперсности при измерении с помощью динамического рассеяния света менее чем 0,35).

В некоторых вариантах осуществления наночастицы предусмотрены в сухой твердой форме, например лиофилизированной форме. В других вариантах осуществления наночастицы предусмотрены в гидратированной форме, например водном или ином жидком растворе. В других вариантах осуществления наночастицы предусмотрены в замороженной форме.

В некоторых вариантах осуществления белки наночастиц обратимо связаны друг с другом с помощью расщепляемого линкера, так что при физиологических условиях линкер расщепляется и высвобождает интактный биологически активный белок. В других вариантах осуществления белки наночастиц обратимо связаны с функциональными группами с помощью расщепляемого линкера, так что при физиологических условиях линкер расщепляется и высвобождает интактный биологически активный белок. В каждом случае белки рассматриваются в качестве являющихся обратимо модифицированными, как описано ниже.

Белок, который является "обратимо связанным с другим белком" обозначает здесь белок, который присоединен (например ковалентно присоединен) к другому белку с помощью расщепляемого линкера. Подобные белки рассматриваются в качестве являющихся связанными (например поперечно связанными) друг с другом с помощью расщепляемого линкера. В некоторых вариантах осуществления наночастицы (например наногели) содержат один (например один тип) биологически активного белка (например IL-15, IL-15-Fc, Fab-фрагмент IL-15, IL-2, или IL-2-Fc, Fab-фрагмент, FAB_2 фрагмент, scFv фрагмент, или фрагмент или производное аффитела, например фрагмент sdAb (нанотело), фрагмент в виде тяжелой цепи антитела и так далее), в то время как в других вариантах осуществления наночастицы содержат более чем один биологически активный белок (например 2, 3, 4, 5 или более) (например комбинацию различных белков, например IL-2 и IL-15 (или IL-15SA) или IL-15 и IL-21). Например, белковый наногель может содержать комбинацию Белка А и Белка В, при этом Белок А связан с Белком А, Белок А связан с Белком В и/или Белок В связан с Белком В.

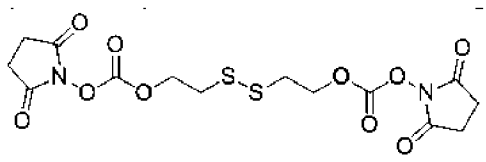
Белок, который является "обратимо связанным с функциональной группой" или белок, который является "обратимо модифицированным" обозначает здесь белок, который присоединен (например ковалентно присоединен) к функциональной группе с помощью расщепляемого линкера. Подобные белок может быть обозначен здесь как "белковый конъюгат" или "обратимо модифицированный белковый конъюгат", при этом данные термины могут использоваться здесь взаимозаменяемым образом. Следует понимать, что как белки, так и полимеры содержат функциональные группы, к которым может быть присоединен белок с помощью обратимого линкера (например расщепляемого линкера, такого как дисульфидный линкер). Примеры

белковых конъюгатов и обратимо модифицированных белков, как указано здесь, включают, без ограничения, белок, являющийся обратимо связанным (например с помощью расщепляемого линкера) с другим белком, белок, являющийся обратимо связанным с полимером, и белок, являющийся обратимо связанным с другой функциональной группой. Следует понимать, что термин "белок" включает слитые белки.

Расщепляемые линкеры

Подходящие расщепляемые линкеры, например поперечные линкеры, для описанных здесь наночастиц могут содержать, например, две N-гидроксисукцинимидных (NHS) сложноэфирные группы, соединенные вместе с помощью гибкого дисульфид-содержащего линкера, который является чувствительным к физиологической среде, или гидролизуемого линкера, который является чувствительным к кислой физиологической среде (pH < 7, например pH 4-5, 5-6, или от 6- до менее чем 7, например 6.9), или чувствительного к протеазам линкера, который является чувствительным к одному или нескольким ферментам, присутствующим в биологической среде, таким как протеазы в опухолевой микросреде, например матриксным металлопротеазам, присутствующим в опухолевой микросреде или воспаленной ткани (например матриксной металлопротеазе 2 (MMP2) или матриксной металлопротеазе 9 (MMP9)). Поперечный линкер, чувствительный к физиологической среде, представляет собой, например, поперечный линкер с дисульфид-содержащим линкером, который будет реагировать с аминогруппами на белках на основе присутствия NHS групп, которые поперечно связывают белки с образованием белковых наногелей высокой плотности. Используемый здесь в Примере 1 поперечный линкер включает бис[2-(N-сукцинимидил-оксикарбонилокси)этил]дисульфид.

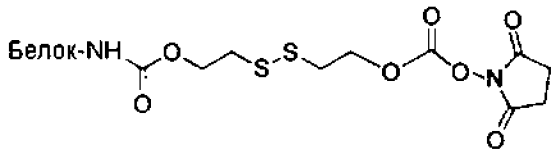
В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает, по меньшей мере, один N-гидроксисукцинимидный сложный эфир. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер представляет собой редокс-чувствительный линкер. В некоторых вариантах осуществления редокс-чувствительный линкер включает дисульфидную связь. В некоторых вариантах предусмотренные здесь расщепляемые линкеры включают, по меньшей мере, один N-гидроксисукцинимидный сложный эфир, который способен реагировать с белками при нейтральном pH (например от около 6 до около 8, или около 7) без значительного расщепления белка. В некоторых вариантах осуществления расщепляемые линкеры представляют собой "редокс-чувствительные" линкеры, что означает, что они расщепляются в присутствии восстановительного агента (например глутатиона, GSH) при физиологических условиях (например 20-40 °C и/или pH 4-8), тем самым обеспечивая высвобождение интактного белка из соединения, с которым они обратимо связаны. Пример расщепляемого линкера для применения в соответствии с настоящим изобретением является следующим:



Формула I.

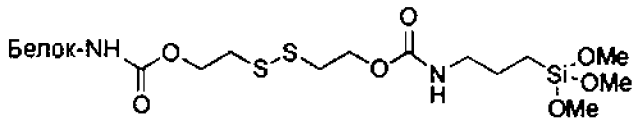
Линкер Формулы I содержит дисульфид, который расщепляется в присутствии восстанавливающего агента. Например, при физиологических условиях дисульфидная связь линкера Формулы I расщепляется глутатионом.

Белки могут являться соединенными (например ковалентно соединенными) с расщепляемым линкером с помощью любой терминальной или внутренней $-NH_2$ группы (например боковой цепи лизина). Таким образом, промежуточный вид, образованный при обратимой модификации белка расщепляемым линкером Формулы I, является следующим:



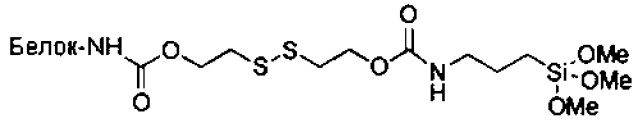
Формула II.

Также здесь предусмотрены обратимо модифицированные белковые конъюгаты, которые включают Формулу III:

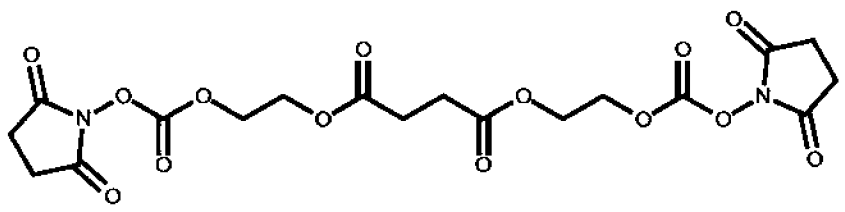


Линкеры могут быть конъюгированы с представляющим интерес белком в аминогруппе, такой как концевой амин или внутренний амин. Внутренние амины включают амины боковых цепей, такие как амины лизина.

Изобретение дополнительно охватывает белковые конъюгаты, включающие Формулу III:



Кроме того, изобретение дополнительно предусматривает белковые конъюгаты, включающие Формулу IV:



CL17

BP на основе сложного эфира

бис(2-((((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)карбонил)окси)этил)сукцинат

Наночастицы на основе диоксида кремния с высокой эффективностью встраивания (например > ~90%) и высокой эффективностью нагрузки лекарства на основе белка (например > ~80%) образуются за счет полимеризации белков, которые обратимо модифицированы силаном. Таким образом, здесь предусмотрены наночастицы, образованные с помощью полимеризации белковых конъюгатов Формулы III с поперечными линкерами, такими как, например, полимеры на основе силан-PEG-силана.

В других вариантах осуществления белки могут быть связаны с помощью чувствительного к ферментам линкера. В рамках вариантов осуществления линкер расщепляется или гидролизуется под действием фермента (например протеазы или эстеразы). В некоторых вариантах осуществления линкер включает субстратный пептид, который расщепляется, например активируется, ферментом, выбранным из матриксной металлопротеазы MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-14, плазмина, PSA, PSMA, CATHEPSIN D, CATHEPSIN K, CATHEPSIN S, ADAM10, ADAM12, ADAMTS, каспазы-1, каспазы-2, каспазы-3, каспазы-4, каспазы-5, каспазы-6, каспазы-7, каспазы-8, каспазы-9, каспазы-10, каспазы-11, каспазы-12, каспазы-13, каспазы-14, или TACE. В рамках вариантов осуществления линкер включает последовательность субстрата, описанную в заявке на патент США 2015/0087810, патенте США 8541203, патенте США 8580244. В некоторых вариантах осуществления линкер включает последовательность, описанную в одной из следующих статей: van Kempen, et al. *Eur Cancer* (2006) 42:728-734; Desnoyers, L.R. et al. *Sci Transl Med* (2013) 5:207; Rice, J.J. et al. *Protein Sci* (2006) 15:825-836; Boulware, K.T. and Daugherty, P.S. *Proc Natl Acad Sci USA* (2006) 103:7583-7588; и Eckhard, U et al *Matrix Biol* (2015) doi: 10.1016/j.matbio.2015.09.003 (epub). Содержание любой из указанных здесь публикаций полностью приведено здесь в качестве ссылки.

Другие линкеры, которые могут использоваться в рамках наногелей по настоящему изобретению, описаны в PCT заявках PCT/US2018/049594 и PCT/US2018/049596, содержание каждой из которых полностью приведено здесь в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления предусмотренные здесь обратимо модифицированные белки могут быть образованы или подвергнуты самосборке с образованием различных наночастиц, включая, без ограничения, конъюгаты белок-гидрофильный полимер (например обратимо модифицированный PEG), конъюгаты белок-гидрофобный полимер (например обратимо модифицированный PLA или PLGA), крупные поперечно связанные белковые гидрогели, частицы поперечно связанного белкового наногеля, белковые нанокапсулы с оболочкой из различных материалов (например диоксида кремния), конъюгированные с белком наночастицы (например липосомы, мицеллы, полимерные наночастицы, неорганические наночастицы), например как описано в WO2015/048498. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления поперечно связанные друг с другом белки, как предусмотрено здесь, могут быть образованы или подвергнуты самосборке в белковые наночастицы.

В некоторых вариантах осуществления белковые наночастицы (например белковые наногели, включая белково-полимерные наногели) содержат белки-носители или другие

молекулы-носители. Белки-носители обычно обеспечивают диффузию и/или транспорт различных молекул и могут повышать стабильность наночастиц и/или повышать стабильность наночастиц на клеточной поверхности и/или повышают аффинность наночастицы в отношении клеточной поверхности. Следует понимать, что термин "белок-носитель" в соответствии с используемым здесь значением обозначает белок, который не оказывает негативного влияния на биологически активный белок белковой наночастицы. В некоторых вариантах осуществления белок-носитель представляет собой инертный белок. В некоторых вариантах осуществления белок-носитель или молекулы-носители выбраны из альбумина, протамина, углеводов на основе хитозана, гепаран-сульфатных протеогликанов, природных полимеров, полисахаридов, декстрамеров, целлюлозы, фибронектина, коллагена, фибрина или протеогликанов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления белки-носители не являются биологически активными.

В некоторых вариантах осуществления здесь предусмотрено монодисперсное множество биологически активных белково-полимерных частиц, например наночастиц, например наногелей. В рамках вариантов осуществления белки наногелей являются обратимо и ковалентно поперечно связанными друг с другом с помощью расщепляемого линкера, при этом белки наногелей поперечно связаны с полимером. В некоторых вариантах осуществления полимер является поперечно связанным с поверхностью наногеля (и, таким образом, считается являющимся конъюгированным с поверхностью).

В некоторых вариантах осуществления наночастицы (например наногель) включают, состоят или состоят по существу из (a) одного или нескольких биологически активных белков, являющихся обратимо и ковалентно поперечно связанными друг с другом с помощью расщепляемого линкера (например дисульфидного линкера), и (b) полимеров, являющихся поперечно связанными с находящимися на поверхности белками наногеля (например обратимо и ковалентно связанными с помощью расщепляемого линкера). В некоторых вариантах осуществления мас.% белков, являющихся поперечно связанными друг с другом превышает 75% мас.% (например превышает 80%, 85% или 90% мас.%) наногеля.

Считается, что множество наногелей является "монодисперсным" в композиции (например водной или иным образом жидкой композиции), если наногели имеют сходный размер (например диаметр) относительно друг друга, например если индекс полидисперсности, определенный с помощью динамического рассеяния света, составляет менее чем 0,35, более предпочтительно менее чем 0,3, например менее чем 0,25 или менее чем 0,2. Наногели множества могут рассматриваться в качестве имеющих сходный размер относительно друг друга, если размеры наногелей в рамках множества варьируются на более чем на 5%-10%.

В рамках других аспектов настоящего изобретения предусмотрены наногели, включающие полимер и, по меньшей мере, 75% (например приблизительно 80%) мас.% белков, которые обратимо и ковалентно поперечно связаны друг с другом с помощью расщепляемого линкера. В

некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер представляет собой редокс-чувствительный линкер, такой как, например, дисульфидный линкер (например Формулы I).

В рамках других аспектов настоящего изобретения предусмотрены способы получения множества биологически активных белковых наногелей, при этом способы включают (a) контактирование белка с расщепляемым линкером (например дисульфидным линкером) при условиях, которые обеспечивают обратимое ковалентное поперечное связывание белков друг с другом с помощью расщепляемого линкера, тем самым обеспечивая получение множества белковых наногелей, и (b) контактирование белковых наногелей с полимером (например полиэтиленгликолем) при условиях, которые обеспечивают поперечное связывание полимера с белками белковых наногелей, тем самым обеспечивая получение множества биологически активных белково-полимерных наногелей.

В некоторых вариантах осуществления условия (a) включают контактирование белка с расщепляемым линкером в водном буфере при температуре от 4° C до 25° C. В некоторых вариантах осуществления условия (a) включают контактирование белка с расщепляемым линкером в водном буфере в течение от 30 минут до одного часа. В некоторых вариантах осуществления условия (b) включают контактирование белковых наногелей с полимером в водном буфере при температуре от 4° C до 25° C. В некоторых вариантах осуществления условия (b) включают контактирование белковых наногелей с полимером в водном буфере в течение от 30 минут до одного часа. В некоторых вариантах осуществления водный буфер включает фосфатный буферный солевой раствор (PBS).

В некоторых вариантах осуществления условия (a) не включают контактирование белка с расщепляемым линкером в водном буфере при температуре более чем 30° C. В некоторых вариантах осуществления условия (b) не включают контактирование белковых наногелей с полимером при температуре более чем 30° C.

В некоторых вариантах осуществления условия (a) не включают контактирование белка с расщепляемым линкером в органическом растворителе (например спирте). В некоторых вариантах осуществления условия (b) не включают контактирование белковых наногелей с полимером в органическом растворителе.

В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой цитокин, фактор роста, антитело или антиген. Например, белок может представлять собой молекулу цитокина, как описано здесь. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула представляет собой молекулу IL-12. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула представляет собой молекулу IL-15, например IL-15 или IL-15SA.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер представляет собой редокс-чувствительный линкер. В некоторых вариантах осуществления редокс-чувствительный линкер включает дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает или состоит из Формулы I.

В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой гидрофильный полимер. В некоторых вариантах осуществления гидрофильный полимер включает полиэтиленгликоль (PEG). Например, гидрофильный полимер может представлять собой имеющий 4 плеча PEG-NH_2 полимер.

В некоторых вариантах осуществления концентрация белка в водном буфере составляет от 10 мг/мл до 50 мг/мл (например 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мг/мл).

В некоторых вариантах осуществления мас.% белка (например биологически активного белка, поперечно связанного белка) в биологически активных белково-полимерных наногелях составляет, по меньшей мере, 75%. В некоторых вариантах осуществления мас.% белка в биологически активных белково-полимерных наногелях составляет, по меньшей мере, 80%. В некоторых вариантах осуществления мас.% белка в биологически активных белково-полимерных наногелях составляет, по меньшей мере, 85%. В некоторых вариантах осуществления мас.% белка в биологически активных белково-полимерных наногелях составляет, по меньшей мере, 90%.

В некоторых вариантах осуществления белок при физиологических условиях высвобождается в его нативной конформации из наногеля и является биологически активным. В некоторых вариантах осуществления специфичная активность высвобожденного белка соответствует, по меньшей мере, 50% (например, по меньшей мере, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) специфичной активности белка до его поперечного связывания с другим белком с помощью расщепляемого линкера.

В рамках некоторых аспектов изобретения предусмотрены белки, являющиеся обратимо связанными с помощью расщепляемого линкера с полимеризуемой функциональной группой. Подобные белки рассматриваются здесь в качестве являющихся обратимо модифицированными белками.

В некоторых вариантах осуществления полимеризуемая функциональная группа включает силан и/или способный подвергаться поперечному связыванию полимер. В некоторых вариантах осуществления способный подвергаться поперечному связыванию полимер включает поли(этиленоксид), полимолочную кислоту, и/или поли(молочно-гликолевую кислоту). В некоторых вариантах осуществления белки являются обратимо связанными с помощью расщепляемого линкера с силаном.

Другие аспекты изобретения предусматривают множества любых описанных здесь обратимо модифицированных белков. В некоторых вариантах осуществления обратимо модифицированные белки в подобных множествах являются поперечно связанными.

В других вариантах осуществления изобретение предусматривает наночастицы, которые включают полимер и, по меньшей мере, 50 мас.% белка, который обратимо связан с помощью расщепляемого линкера с полимеризуемой функциональной группой. "мас.%" обозначает здесь массу белка относительно массы наночастицы (например наногеля). Термин "полимеризуемая функциональная группа" в соответствии с используемым здесь значением обозначает группу

атомов и связей, которые могут химически реагировать для образования полимерной цепи или сети. Термин "полимер" обозначает цепь или сеть повторяющихся единиц или спесь различных повторяющихся единиц. В соответствии с используемым здесь значением, полимер сам по себе является функциональной группой. Примеры полимеризуемых функциональных групп для применения в соответствии с изобретением включают, без ограничения, силан, оксид этилена, молочную кислоту, лактид, гликолевую кислоту, N-(2-гидроксипропил)метакриламид, диоксид кремния, поли(этиленоксид), полимолочную кислоту, поли(молочно-гликолевую кислоту), полиглутамат, полилизин, циклодекстрин и декстран-хитозан. Другие полимеризуемые функциональные группы также охватываются и могут применяться в соответствии с изобретением. Однако следует понимать, что "полимер" в соответствии с используемым здесь значением не является белком (является отличным от белка), не является пептидом (является отличным от пептида) и не является аминокислотой (является отличным от аминокислоты).

Термин "полимер" охватывает "сополимер". То есть полимер может включать смесь различных функциональных групп (например силан-PEG-силан), включая более короткие полимеры или сополимеры. Функциональные группы обычно подвергаются полимеризации при совместимых с белками нейтральных условиях. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления полимеризация функциональных групп осуществляется в, по меньшей мере, частично водном растворе при pH от около 6 до около 8. Например, полимеризация функциональных групп может осуществляться при pH 6, pH 6.5, pH 7, pH 7,5 или pH 8. В некоторых вариантах осуществления полимеризация функциональных групп осуществляется при pH около 7.

В некоторых вариантах осуществления реакция полимеризации катализируется фторидом натрия, фторидом калия или любым другим растворимым фторидом.

Примеры полимеров, которые могут быть обратимо связаны с белками и/или использованы для образования наночастиц (например нанокапсул, наногелей, гидрогелей) включают, без ограничения, алифатические полисложные эфиры, поли(молочную кислоту) (PLA), поли(гликолевую кислоту) (PGA), поли(молочно-ко-гликолевую кислоту) (PLGA), поликарпролактон (PCL), полиангидриды, поли(орто)сложные эфиры, полиуретаны, поли(масляную кислоту), поли(валериановую кислоту) и поли(лактид-ко-капролактон), и природные полимеры, такие как альгинат и другие полисахариды, включая декстран и целлюлозу, коллаген, их химические производные, включая замещения, добавления химических групп, таких как, например, алкил, алкилен, гидроксилирование, окисление, и другие модификации, обычно выполняемые специалистами в данной области), альбумин и другие гидрофильные белки, зеин и другие проламины и гидрофобные белки, сополимеры и их смеси. В целом, данные материалы расщепляются либо за счет ферментативного гидролиза или подверганию действию воды *in vivo* за счет поверхностной или объемной эрозии. Другие полимеры также охватываются и могут применяться в рамках изобретения.

В некоторых вариантах осуществления белки являются обратимо связанными с гидрофильными полимерами, такими как, например, полиэтиленгликоль (PEG), полиэтиленгликоль-b-полилизин (PEG -PLL) и/или полиэтиленгликоль-b-полиаргинин (PEG-PArg).

Некоторые варианты настоящего изобретения связаны с наночастицами (например наногелями), включающими поликатион на своей поверхности. Поликатион представляет собой молекулу или химический комплекс, имеющий положительные заряды в нескольких участках. В целом, поликатионы имеют общий положительный заряд. Примеры поликатононв для применения в соответствии с настоящим изобретением включают, без ограничения, полилизин (поли-L-лизин и/или поли-D-лизин), поли(аргининатглицерилсукцинат) (PAGS, полимер на основе аргинина), полиэтиленимин, полигистидин, полиаргинин, сульфат протамина, полиэтиленгликоль-b-полилизин (PEG -PLL) или полиэтиленгликоль-g-полилизин.

В некоторых вариантах осуществления поликатион добавляется на поверхность наногеля. В некоторых вариантах осуществления поликатион (например полиэтиленгликоль-b-полилизин) добавляется на поверхность наногеля. В некоторых вариантах осуществления поликатион представляет собой полиэтиленгликоль-b-полилизин. В некоторых вариантах осуществления поликатион добавляется в наногель с/без антитела против CD45.

В рамках вариантов осуществления наночастица включает polyK30. В рамках вариантов осуществления наночастица включает полиэтиленгликоль (PEG), полиэтиленгликоль-b-полилизин (PEG-PLL) или полиэтиленгликоль-b-полиаргинин (PEG-PArg). В рамках вариантов осуществления наночастица включает polyK200.

В рамках вариантов осуществления наночастица включает, по меньшей мере, один полимер, катионный полимер, или катионный блок-сополимер на поверхности наночастицы. В некоторых вариантах осуществления катионный полимер включает полилизин, например polyK30 или polyK200. В некоторых вариантах осуществления полилизин представляет собой поли-L-лизин. В рамках вариантов осуществления полилизин имеет среднюю длину 20-30, 30-40, 40-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, или 400-500 аминокислот.

В рамках вариантов осуществления наночастица включает полиэтиленгликоль (PEG). В рамках вариантов осуществления PEG имеет молекулярную массу 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, или 9-10 кДа.

В некоторых вариантах осуществления наночастицы включает катионный блок-сополимер, включающий PEG (например PEG5k) и полилизин, например polyK30 или polyK200. В рамках вариантов осуществления катионный блок-сополимер включает PEG5k-polyK30 или PEG5k-polyK200.

Без связи с теорией, в некоторых вариантах осуществления наночастица, включающая полилизин с низкой молекулярной массой (например имеющую среднюю длину 10-150, 20-100, 20-80, 20-60, 20-40, или около 30 аминокислот) демонстрирует лучшие свойства по сравнению с наночастицей, включающей полилизин с более высокой молекулярной массой (например

имеющей среднюю длину около 200 аминокислот). Лучшие качества могут заключаться, например, в низкой токсичности, низкой агрегации, или высокой загрузке на клетку, или любой из комбинации.

В рамках вариантов осуществления наночастица, включающая полилизин с низкой молекулярной массой, демонстрирует низкую токсичность по сравнению с Т-клетками, например при анализе путем количественного определения числа живых Т-клеток после замораживания и размораживания, например с помощью способа из раздела Примеры. В рамках вариантов осуществления низкая токсичность включает клетки, которые подвергаются, по меньшей мере, 1,2-кратной, 1,4-кратной, 1,6-кратной, 1,8-кратной, 2-кратной, 2,5-кратной, 3-кратной, 4-кратной, или 5-кратной экспансии после замораживания и размораживания.

В рамках вариантов осуществления наночастица, включающая полилизин с низкой молекулярной массой, демонстрирует низкую агрегацию, например при измерении с помощью динамического рассеяния света, например как описано в разделе Примеры. В рамках вариантов осуществления низкая агрегация включает популяцию наночастиц, имеющих размер около 80 нм (например 70-90 нм, 60-100 нм, или 50-150 нм).

В рамках вариантов осуществления наночастица, включающая полилизин с низкой молекулярной массой, демонстрирует высокую загрузку на клетку при измерении на основе средней интенсивности флуоресценции (MFU) наночастиц, загружаемых на активированные наивные Т-клетки, например как описано в разделе Примеры. В рамках вариантов осуществления высокая загрузка на клетку включает, по меньшей мере, в 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, или 500 раз более высокую MFU, чем у контрольной наночастицы, которая иным образом является схожей, но имеет polyK200.

В других вариантах осуществления белки являются обратимо связанными с гидрофобными полимерами, такими как, например, полимолочная кислота (PLA) и/или поли(молочно-ко-гликолевую кислоту) (PLGA). В некоторых вариантах осуществления данные конъюгаты белок-гидрофобный полимер могут подвергаться самосборке в наночастицы.

В некоторых вариантах осуществления белковые конъюгаты по настоящему изобретению могут быть поперечно связаны с образованием сети гидрогеля, частицы наногеля, или белкового наногеля, например как описано в WO2015/048498 и WO2017/027843, все из которых рассматриваются здесь в качестве являющихся "наночастицами".

В некоторых вариантах осуществления полимеризуемая функциональная группа включает силан и/или способный подвергаться поперечному связыванию полимер. В некоторых вариантах осуществления способный подвергаться поперечному связыванию полимер включает поли(этиленоксид), полимолочную кислоту, и/или поли(молочно-ко-гликолевую кислоту).

В некоторых вариантах осуществления наночастицы включают, по меньшей мере, 75 мас.% белка, который обратимо связан с полимеризуемой функциональной группой. В некоторых вариантах осуществления наночастицы включают, по меньшей мере, 80 мас.% белка, который обратимо связан с полимеризуемой функциональной группой. Также здесь охватываются

наночастицы, которые включают от около 50 мас.% до около 90 мас.% белка, который обратимо связан с полимеризуемой функциональной группой. Например, в некоторых вариантах осуществления наночастица может иметь около 50 мас.%, около 55 мас.%, около 60 мас.%, около 65 мас.%, около 70 мас.%, около 75 мас.%, около 80 мас.%, около 85 мас.%, или около 90 мас.% белка, который обратимо связан с полимеризуемой функциональной группой.

В рамках других аспектов изобретения предусмотрены способы получения наночастицы, при этом способы включают модифицирование белка с использованием расщепляемого линкера и полимеризуемых функциональных групп и полимеризацию полимеризуемых функциональных групп с поперечным линкером и растворимым фторидом.

В некоторых вариантах осуществления полимеризуемая функциональная группа включает силан и/или способный подвергаться поперечному связыванию полимер. В некоторых вариантах осуществления способный подвергаться поперечному связыванию полимер включает поли(этиленоксид), полимолочную кислоту, и/или поли(молочно-ко-гликолевую кислоту).

В некоторых вариантах осуществления растворимый фторид представляет собой фторид натрия. В некоторых вариантах осуществления растворимый фторид представляет собой фторид калия.

В некоторых вариантах осуществления наночастицы включают одну или несколько реактивных групп на своей поверхности. В рамках вариантов осуществления указанная одна или несколько реактивных групп на их внешней поверхности могут реагировать с реактивными группами на имеющих ядра клетках (например Т-клетках). Примеры реактивных групп наночастиц включают, без ограничения, тиол-реактивные малеимидные головные группы, галоацетильные (например, йодацетильные) группы, имидоэфирные группы, сложные эфиры N-гидроксисукцинимида, пиридилдисульфидные группы и им подобные. Данные реактивные группы реагируют с группами на поверхности имеющих ядро клеток и, таким образом, наночастицы связываются с клеточной поверхностью. В рамках вариантов осуществления при модифицировании поверхности подобным образом наночастицы предназначаются для применения с определенными клетками-носителями, имеющими "комплементарные" реактивные группы (например реактивные группы, которые реагируют с группами наночастиц). В некоторых вариантах осуществления указанные наночастицы не будут интегрироваться в липидный бислой, который образует клеточную поверхность. Как правило, наночастицы на будут значительно фагоцитозированы (или значительно интернализированы) имеющими ядра клетками.

В некоторых вариантах осуществления реактивная группа представляет собой малеимидную, родаминовую или представляющую собой IR783 реактивную группу.

В рамках вариантов осуществления молекула IL-15 представляет собой молекулу, описанную в публикации международной PCT заявки WO2017/027843, которая полностью приведена здесь в качестве ссылки.

Иммуностимулирующие слитые молекулы/Связанные продукты слияния

В определенных вариантах осуществления IFM может быть представлена в виде следующей формулы в рамках ориентации от N- к C-концу: R1-(необязательно L1)-R2 или R2-(необязательно L1)-R1; при этом R1 включает фрагмент для нацеливания на иммунную клетку, L1 включает линкер (например описанный здесь пептидный линкер), а R2 включает иммуностимулирующий фрагмент, например молекулу цитокина.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий фрагмент, например молекула цитокина, соединен, например ковалентно соединен, с фрагментом для нацеливания на иммунную клетку.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий фрагмент, например молекула цитокина, функционально соединен, например ковалентно соединен (например с помощью химической связи, слияния, нековалентной связи или иным образом) с фрагментом для нацеливания на иммунную клетку. Например, иммуностимулирующий фрагмент может быть ковалентно соединен непрямым образом, например через линкер, с фрагментом для нацеливания на иммунную клетку.

В рамках вариантов осуществления линкер выбран из: расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, пептидного линкера, гибкого линкера, жесткого линкера, спирального линкера или неспирального линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер. Пептидный линкер может иметь длину 5-20, 8-18, 10-15, или около 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер включает Gly и Ser, например линкер включает аминокислотную последовательность $(Gly_4\text{-}Ser)n$, при этом n обозначает количество повторов мотива, например n=1, 2, 3, 4 или 5 (например $(Gly_4Ser)_2$ или $(Gly_4Ser)_3$ линкер). В некоторых вариантах осуществления линкер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, 37, 38, или 39, или аминокислотную последовательность, которая является по существу идентичной им (например имеющей 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислотных замещений). В одном варианте осуществления линкер включает аминокислотную последовательность GGGSGGGS (SEQ ID NO: 37). В другом варианте осуществления линкер включает аминокислоты из шарнирного участка IgG4, например аминокислоты DKTHTSPPSPAP (SEQ ID NO: 38).

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер выполнен с возможностью подвергаться расщеплению ферментом, таким как протеаза (например, пепсин, трипсин, термолизин, матриксная металлопротеиназа (MMP), дезинтегрин и металлопротеиназа (ADAM; например, ADAM-10 или ADAM-17)), гликозидаза (например, α-, β-, γ-амилаза, α-, β-глюкозидаза или лактаза) или эстераза (например, ацетилхолинэстераза, псевдохолинэстераза или ацетилэстераза). Другие ферменты, которые могут расщеплять расщепляемый линкер, включают активатор плазминогена урокиназы (uPA), тканевой активатор плазминогена (tPA), гранзим A, гранзим B, лизосомальные ферменты, катепсины, простатоспецифический антиген, протеазу вируса простого герпеса, протеазу цитомегаловируса, тромбин, каспазу, и интерлейкин 1 бета-превращающий фермент.

Другой пример представляет собой сверхэкспрессию фермента, например протеаз (например пепсина, трипсина) в представляющей интерес ткани, при этом специально сконструированный пептидный линкер будет расщепляться при поступлении в представляющую интерес ткань. Соответствующие примеры подходящих линкеров в данном отношении представляют собой Gly-Phe-Ser-Gly (SEQ ID NO: 105), Gly-Lys-Val-Ser (SEQ ID NO: 106), Gly-Trp-Ile-Gly (SEQ ID NO: 107), Gly-Lys-Lys-Trp (SEQ ID NO: 108), Gly-Ala-Tyr-Met (SEQ ID NO: 109).

В другом примере сверхэкспрессия фермента, например глюкозидаз (например α-амилазы) в представляющей интерес ткани вызывает расщепление специально сконструированного углеводного линкера при поступлении в представляющую интерес ткань. Соответствующие примеры подходящих линкеров в данном отношении представляют собой -(α-1-4-D-глюкоза)n-, где n≧4.

Расщепляемый линкер может включать всего от 2 до 60 атомов, например от 2 до 20 атомов. Расщепляемый линкер может включать аминокислотные остатки и может представлять собой пептидную связь, например длиной от 1 до 30 или от 2 до 10 аминокислотных остатков. В одном варианте расщепляемый линкер B состоит из от 1 до 30, например от 2 до 10, или от 2 до 8, или от 3 до 9, или 4-10 аминокислот. Для чувствительных к pH линкеров количество атомов обычно составляет от 2 до 50, например 2-30.

В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер включает связь на основе аминокапроновой кислоты (также называемой аминогексановой кислотой) или связь, состоящую из от 1 до 30, или от 2 до 10 углеводных остатков.

Помимо субстратного пептида линкер может содержать коннекторы, принимающие участие в образовании связи или связей с терапевтическим белком. Каждый подобный коннектор может состоять из одного аминокислотного остатка или олигопептида, содержащего от 2 до 10, например от 3 до 9, или от 4 до 8, или от 2 до 8 аминокислотных остатков. Аминокислотный остаток или олигопептид, такой как коннекторы, может, при его наличии, связываться с обоими концами субстратного пептида или может связываться только с одним концом субстратного пептида, соответствуя одной из структур. Типы одной аминокислоты, которая может использоваться в качестве коннектора (коннекторов), и аминокислотные остатки, состоящие из олигопептида, которые могут использоваться в качестве коннектора (коннекторов), не являются особенно ограниченными, при этом может использоваться один аминокислотный остаток произвольного типа или произвольный олигопептид, содержащий, например, от 2 до 8 одинаковых или различающихся аминокислотных остатков произвольных типов. Примеры олигопептидов, которые могут использоваться в качестве коннектора (коннекторов) включают, например, коннекторы, которые имеют высокое содержание Gly аминокислот. Другие органические фрагменты также могут использоваться в качестве коннекторов.

В других вариантах осуществления иммуностимулирующий фрагмент напрямую ковалентно связан с фрагментом для нацеливания на иммунную клетку без линкера.

В других вариантах осуществления иммуностимулирующий фрагмент и фрагмент для нацеливания на иммунную клетку IFM не являются ковалентно связанными, например являются связанными нековалентно.

Примеры форматов слияния молекулы цитокина с молекулой антитела, например фрагментом в виде иммуноглобулина (Ig), например антителом (IgG) или фрагментом антитела (Fab, scFv и им подобным) могут включать продукт слияния с амино-концом (N-концом) или карбокси-концом (C-концом) молекулы антитела, обычно C-концом молекулы антитела. В одном варианте осуществления слитая молекула в виде цитокина-Ig фрагмента, включающая цитокиновый полипептид, комплекс цитокин-рецептор или комплекс цитокин-Fc рецептор, присоединенный к Ig полипептиду, подходящая связь между цепью цитокинового полипептида и цепью Ig полипептида, включает прямую полипептидную связь, связь с полипептидным линкером между данными двумя цепями и химическую связь между данными цепями. Типичная связь представляет собой гибкий линкер, состоящий из малого Gly4Ser линкера $(GGGGS)_N$, где $_N$ обозначает количество повторов мотива. $(GGGGS)_2$ и $(GGGGS)_3$ представляют собой предпочтительные варианты осуществления линкеров для применения в рамках слитых конструктов по изобретению.

Примеры описанных здесь иммуностимулирующих слитых молекул могут включать аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, или аминокислотной последовательности, являющейся по существу идентичной им (например аминокислотной последовательности, являющейся, по меньшей мере, на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичной любой из вышеуказанных аминокислотных последовательностей).

Здесь описаны примеры иммуностимулирующих слитых молекул (или их частей) по настоящему изобретению. Следует отметить, что в раках определенных scFv структура представляет собой VH-линкер-VL. Однако структура VL-линкер-VH также может применяться

без влияния

Дополнительные последовательности, которые могут быть включены в IFM по настоящему изобретению, показаны в Таблице 4 ниже. В некоторых вариантах осуществления IFM включает константный лямбда или лямбда участок. Примеры константных лямбда или лямбда участков включают SEQ ID NO: 74-78. В различных вариантах осуществления описанные здесь IFM могут включать одну или несколько из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-104 или аминокислотную последовательность, являющуюся по существу идентичной им (например аминокислотную последовательность, являющуюся, по меньшей мере, на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичной любой одной из SEQ ID NOS: 1-104 или имеющую, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 или более аминокислотных изменений (например замещений, делеций или вставок, например консервативных замещений) по сравнению с любой одной из SEQ ID NO: 1-104. В рамках вариантов осуществления IFM включает не более чем пять, десять или пятнадцать изменений (например замещений, делеций, или вставок, например консервативных замещений) по сравнению с любой одной из SEQ ID NO: 1-104.

Таблица 4. Дополнительные последовательности

SEQ ID NO:	**Название**	**Описание/Комментарии**
9	IL-15Rα-sushi (также обозначаемый как sushi)	Домен sushi IL-15Rα дикого типа
10	IL15-WT	IL-15 дикого типа, соответствующий зрелому полипептиду из последовательности полноразмерного IL-15, описанной в SEQ ID NO: 40.
11	IL15-N72D	IL-15, содержащий мутацию N72D
12	sushiL77I-Fc	Домен sushi из IL-15Rα, слитого с IgG1-Fc; домен sushi содержит мутацию L77I
13	sushi-Fc	Домен sushi из IL-15Rα, слитого с IgG1-Fc
33	Лидерная-1	Лидерная последовательность (например сигнальная последовательность, сигнальный пептид), используемая для легкой цепи антитела, IL-15, N-концевых продуктов слияния IL-15, и N-концевого продукта слияния sushi с легкой цепью Fab.
34	Лидерная-2	Лидерная последовательность (например сигнальная последовательность, сигнальный пептид), используемая для тяжелой цепи антитела.
35	Лидерная последовательность IL-15Rα	Лидерная последовательность, используемая для конструктов sushi и sushi-Fc
36	Линкер-1 (L1)	(G4S)3 линкер
40	Полная последовательность IL-15 человека	Genbank кат. # CAA62616.1
41	Полная последовательность IL-15Rα человека	Genbank кат. # AAI21141.1

SEQ ID NO:	Название	Описание/Комментарии
46	Полная последовательность IL-12A (также обозначаемого как IL-12p35)	Genbank кат. # P29459
47	Зрелая последовательность IL-12A	
48	Полная последовательность IL-12B (также обозначаемого как IL-12p40)	Genbank кат. # P29460
49	Зрелая последовательность IL-12B	
50	scIL-12p70-BA	Синтетическая последовательность; IL-12B и IL-12A, соединенные гибким линкером
51	scIL-12p70-AB	Синтетическая последовательность; IL-12A и IL-12B, соединенные гибким линкером
52	Минимальный домен sushi	
53	IgG1-Fc	Fc домен (CH2 и CH3 домены) IgG1 человека
54	IgG2-Fc	Fc домен (CH2 и CH3 домены) IgG2 человека
55	IgG2Da-Fc	Fc домен IgG2 человека, содержащий две точечные мутации
56	sushi-IgG2Da-Fc (также обозначаемый как sushi-Fc2Da)	Домен sushi IL-15Rα, слитого с IgG2Da-Fc
59	Вариабельный домен тяжелой цепи 9.4	
60	Вариабельный домен легкой цепи 9.4	
70	Линкер-5 (L5)	$(G_3S)_4$ линкер, например как описано выше в SEQ ID NO: 50 и 51
71	Линкер-6 (L6)	$(G_4S)_4$ линкер
72	scIL-12p70-BA-L6	Синтетическая последовательность; IL-12B и IL-12A, соединенные линкером L5.
73	scIL-12p70-AB-L5	Синтетическая последовательность; IL-12A и IL-12B, соединенные линкером L5.
79	HC-h9.4Fab	Тяжелая цепь гуманизированного антитела против CD45; содержит гуманизированный вариабельный домен тяжелой цепи 9.4 (h9.4) и домен CH1 IgG1 человека
80	HC-h9.4Fab-h9.4scFv	Тяжелая цепь гуманизированного антитела против CD45, соединенная с scFv гуманизированного антитела против CD45; содержит вариабельный домен тяжелой цепи h9.4 и домен CH1 IgG1 человека. scFv h9.4 является генетически слитым с С-концом тяжелой цепи Fab с помощью гибкого линкера (Линкер-1, SEQ ID NO: 36).

SEQ ID NO:	Название	Описание/Комментарии
82	LC-h9.4Fab-scIL-12p70	Легкая цепь гуманизированного антитела против CD45; содержит вариабельный домен легкой цепи h9.4 и константный каппа домен человека, одноцепочечный IL-12p70 дикого типа человека (SEQ ID NO: 50), генетически слитый с С-концом легкой цепи антитела с помощью гибкого линкера (Линкер-1, SEQ ID NO: 36); одноцепочечный IL-12p70 человека включает генетический продукт слияния IL-12A человека и IL-12B с помощью гибкого линкера (Линкер-5; SEQ ID NO: 70).
91	h9.4 scFv	scFv, включающий гуманизированное 9.4 антитело; вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи генетически слиты с помощью гибкого линкера (Линкер-6; SEQ ID NO: 71).
102	LC-h9.4Fab-scIL-12p70AB	Легкая цепь гуманизированного антитела против CD45; содержит вариабельный домен легкой цепи h9.4 и константный каппа домен человека; содержит одноцепочечный IL-12p70 человека (SEQ ID NO: 51), генетически слитый с С-концом легкой цепи антитела с помощью гибкого линкера (Линкер-1, SEQ ID NO: 36); одноцепочечный IL-12p70 человека включает генетический продукт слияния IL-12A человека и IL-12B с помощью гибкого линкера (Линкер-5; SEQ ID NO: 70).
103	LC-h9.4Fab-IL-12A	Легкая цепь гуманизированного антитела против CD45; содержит вариабельный домен легкой цепи h9.4 и константный каппа домен человека; содержит IL-12A человека (SEQ ID NO: 47), генетически слитый с С-концом легкой цепи антитела с помощью гибкого линкера (Линкер-1, SEQ ID NO: 36).
104	LC-h9.4Fab-IL-12B	Легкая цепь гуманизированного антитела против CD45; содержит вариабельный домен из легкой цепи h9.4 и константный каппа домен человека; содержит IL-12B человека (SEQ ID NO: 49), генетически слитый с С-концом легкой цепи антитела с помощью гибкого линкера (Линкер-1, SEQ ID NO: 36).

Варианты белков

Ниже описаны полноразмерные полипептиды и их варианты. Последовательность полноразмерного IL-15 (SEQ ID NO: 40) взята из Genbank кат. # CAA62616.1; зрелый IL-15 не имеет сигнальной последовательности и указан в SEQ ID NO: 10. Полноразмерный IL-15Rα (SEQ ID NO: 41) взят из Genbank кат. # AAI21141.1. Домен sushi IL-15Rα (IL-15Rα-sushi) указан в SEQ ID NO: 9. Минимальный домен sushi, охватывающий первый и четвертый цистеины и промежуточные аминокислоты (SEQ ID NO: 52) также были описаны и являются подходящими заместителями. Аналогичным образом, необязательные N-концевые добавления для минимального домена sushi, включающие нативный Thr или Ile-Thr, и/или необязательные С-концевые добавления для минимального домена sushi, включающие Ile или Ile-Arg остатки, также являются подходящими.

В рамках описанных ниже вариантов белков указаны названия субъединиц белков и SEQ ID NO, соответствующие зрелым белкам. Каждая субъединица белка была рекомбинантно

экспрессирована с помощью N-концевого сигнального пептида для осуществления секретирования из экспрессирующей клетки. Сигнальный пептид нативного IL-15Rα (SEQ ID NO: 35) использовали для sushi, sushi-L77I-Fc, and sushi-Fc. Лидерную последовательность в SEQ ID NO: 33 использовали для обеспечения секретирования легких цепей антитела, IL15-WT, N-концевых продуктов слияния IL-15, IL15-N72D, и N-концевого продукта слияния sushi с легкой цепью Fab. Лидерную последовательность в SEQ ID NO: 34 использовали для обеспечения секретирования тяжелых цепей антитела.

Для номенклатуры "тяжелой цепи" и "легкой цепи" здесь использовали стандартную систему наименования для антител. Например, в Fab-фрагменте антитела обе цепи имеют приблизительно одинаковую молекулярную массу, однако тяжелая цепь обозначает цепь Fab-фрагмента, соответствующую тяжелой цепи в полноразмерном антителе (например содержащем вариабельные домены тяжелой цепи и CH1). Далее, в случае продуктов слияния цитокина с легкой цепью Fab-фрагмента, легкая цепь будет иметь на самом деле бóльшую молекулярную массу, чем тяжелая цепь, вследствие слияния с цитокином; однако для единообразия сохраняется стандартная система наименований, в рамках которых вариабельный домен легкой цепи и константный каппа домен и продукт слияния с цитокином включают "легкую цепь", в то время как вариабельный домен тяжелой цепи и домен CH1 включают "тяжелую цепь".

В некоторых вариантах осуществления IFM включает h9.4Fab-scIL-12p70 или h9.4Fab-h9.4scFv-scIL-12p70, как определено ниже.

Название белка: h9.4Fab-scIL-12p70

Данный белок был получен путем совместной экспрессии двух субъединиц: HC-h9.4Fab (SEQ ID NO: 79) и LC-h9.4Fab-scIL-12p70 (SEQ ID NO: 82). Полученный белок включает продукт слияния одноцепочечного IL-12p70 человека с C-концом легкой цепи Fab-фрагмента h9.4 с помощью Линкера-1 (SEQ ID NO: 36). Fab h9.4 представляет собой Fab-фрагмент антитела против CD45R человека, включающий вариабельные домены тяжелой и легкой цепей (VH и VL) из h9.4 и константные домены человека (константный каппа домен человека и CH1 домен IgG1 человека).

Название белка: h9.4Fab-h9.4scFv-scIL-12p70

Данный белок был получен путем совместной экспрессии двух субъединиц: HC-h9.4Fab-h9.4scFv (SEQ ID NO: 80) и LC-h9.4Fab-scIL-12p70 (SEQ ID NO: 82). Полученный белок включает продукт слияния одноцепочечного IL-12p70 человека с C-концом легкой цепи Fab-фрагмента h9.4 с помощью Линкера-1 (SEQ ID NO: 36) и продукт слияния scFv h9.4 с тяжелой цепью Fab-фрагмента h9.4 с помощью Линкера-1.

Фрагменты для нацеливания на иммунную клетку

В определенных вариантах осуществления описанные здесь иммуностимулирующие слитые молекулы включают фрагмент для нацеливания на иммунную клетку. Фрагмент для нацеливания на иммунную клетку может быть выбран из молекулы антитела (например антигенсвязывающего домена, как описано здесь), рецептора или фрагмента рецептора, или

лиганда или фрагмента лиганда, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку ассоциируется, например связывается с иммунной клеткой (например молекулой, например антигеном, присутствующим на поверхности иммунной клетки). В определенных вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку нацеливает, например направляет описанные здесь иммуностимулирующие слитые молекулы на иммунную клетку (например лимфоцит, например Т-клетку).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку выбран из молекулы антитела (например полноразмерного антитела (например антитела, которое включает, по меньшей мере, одну и, предпочтительно, две полные тяжелые цепи и, по меньшей мере, одну и, предпочтительно, две полные легкие цепи), или антигенсвязывающего фрагмента (например Fab, F(ab')2, Fv, одноцепочечного Fv, однодоменного антитела, диатела (dAb), двухвалентного антитела, или биспецифического антитела или его фрагмента, его однодоменного варианта, или антитела верблюдовых)), не относящегося к антителу каркаса, или лиганда, который связывается с рецептором CD45.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку нацеливает IFM на устойчивые, присутствующие в большом количестве и/или подвергаемые рециркуляции рецепторы клеточной поверхности и молекулы, экспрессируемые на поверхности иммунной клетки. Данные рецепторы/молекулы включают, например, CD45 (на основе, например, BC8 (ACCT: HB-10507), 9.4 (ATTC: HB- 10508), GAP8.3 (ATTC: HB-12), моноклональных антител), CD8 (на основе моноклонального антитела OKT8), молекулы трансмембранного интегрина CD11a (на основе моноклонального антитела MHM24) или CD18 (на основе химерного моноклонального антитела 1B4). В других предпочтительных вариантах осуществления фрагмент для нацеливания направляется к маркеру, выбранному из группы, состоящей из CD4, CD8, CD11a, CD18, CD19, CD20, и CD22. В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку выбран из молекулы антитела, например антигенсвязывающего домена, не относящегося к антителу каркаса, или лиганда, который связывается с CD45, CD4, CD8, CD3, CD11a, CD11b, CD11c, CD25, CD127, CD137, CD19, CD20, CD22, HLA-DR, CD197, CD38, CD27, CD196, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CD84, CD229, CCR1, CCR5, CCR4, CCR6, CCR8, или CCR10.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку IFM включает молекулу антитела или лиганд, который избирательно связывается с мишенью на поверхности иммунной клетки, например рецептором поверхности иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления мишень на поверхности иммунной клетки или рецептор может иметь одно, два, три или более из следующих свойств: (i) присутствует на поверхности иммунной клетки в большом количестве (например его количество превышает количество рецепторов молекулы цитокина, присутствующей на поверхности иммунной клетки); (ii) демонстрирует медленное снижение количества, интернализацию, и/или возврат на клеточную поверхность, например по сравнению с рецепторами, активированными цитокином IFM; (iii)

присутствует на поверхности иммунной клетки в течение продолжительного периода времени, например по сравнению с рецепторами, активированными цитокином IFM; или (iv) при интернализации по существу подвергается рециркуляции обратно на поверхность клетки, например, по меньшей мере, 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более мишени на поверхности иммунной клетки подвергается рециркуляции обратно на клеточную поверхность.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку IFM связывается с обеспечивающим рециркуляцию рецептором клеточной поверхности. Без связи с теорией, считается, что связывание с обеспечивающим рециркуляцию рецептором клеточной поверхности опосредует интернализацию рецептора и IFM. Например, IFM, подвергнутая интернализации наряду с рецептором, может быть изолирована в ранних эндосомах и впоследствии рециркулирована обратно на клеточную поверхность вместо подвергания дальнейшему расщеплению (например за счет опосредованного клатрином и независимого от клатрина эндоцитоза). Возвращение IFM/рецептора на клеточную поверхность может улучшать передачу сигналов цитокинов за счет восстановления цитокиновой молекулы IFM на клеточной поверхности, тем самым повышая время и доступность цитокиновой молекулы для связывания с ее собственным рецептором клеточной поверхности. Кроме того, связанные с передачей сигнала события, которые инициируются в области клеточной мембраны за счет связывания слитого белка по изобретению, могут продолжаться из эндосомальных компартментов.

В некоторых вариантах осуществления мишень или рецептор на поверхности иммунной клетки присутствует на поверхности иммунной клетки, но не присутствует на раковой или опухолевой клетке, например солидной опухоли или гематологической раковой клетке. В некоторых вариантах осуществления мишень или рецептор на поверхности иммунной клетки присутствует преимущественно на поверхности иммунной клетки в отличие от их присутствия на раковой или опухолевой клетке, например присутствуют на иммунной клетке при соотношении, по меньшей мере, 5:1, 10:1, 15:1, 20:1 по сравнению с раковой или опухолевой клеткой.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку IFM связывается с рецептором, экспрессируемым на клетке (например иммунной клетке), например на поверхностной мембране клетке, и далее клетка также экспрессирует цитокиновый рецептор (например рецептор цитокиновой молекулы IFM).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку IFM может быть выбран из молекулы антитела или молекулы лиганда, которая связывается с мишенью на поверхности иммунной клетки, например мишенью, выбранной из CD16, CD45, CD4, CD8, CD3, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD25, CD127, CD56, CD19, CD20, CD22, HLA-DR, CD197, CD38, CD27, CD137, OX40, GITR, CD56, CD196, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CD84, CD229, CCR1, CCR5, CCR4, CCR6, CCR8, или CCR10. В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку связывается с CD4, CD8, CD11a, CD18, CD20, CD56, или CD45. В других вариантах осуществления мишень на поверхности иммунной клетки выбрана из CD19, CD20, или CD22. В одном варианте осуществления фрагмент для нацеливания на

иммунную клетку включает молекулу антитела или молекулу лиганда, которая связывается с CD45 (также взаимозаменяемым образом обозначается здесь как "рецептор CD45" или "CD45R"). В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой CD45 (например изоформу CD45, выбранную из CD45RA, CD45RB, CD45RC или CD45RO). В рамках вариантов осуществления CD45 в основном экспрессируется на Т-клетках. Например CD45RA в основном экспрессируется на наивных Т-клетках; CD45RO в основном экспрессируется на активированных Т-клетках и Т-клетках памяти.

В других вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку IFM включает молекулу антитела (например антигенсвязывающий домен), рецепторную молекулу (например рецептор, фрагмент рецептора или его функциональный вариант), или молекулу лиганда (например лиганд, фрагмент лиганда или его функциональный вариант), или их комбинацию, которая связывается с иммунной клеткой-мишенью или рецептором.

В некоторых вариантах осуществления молекула антитела фрагмента для нацеливания на иммунную клетку IFM включает полноразмерное антитело (например антитело, которое включает, по меньшей мере, одну и, предпочтительно, две полные тяжелые цепи и, по меньшей мере, одну и, предпочтительно, две полные легкие цепи), или антигенсвязывающий фрагмент (например Fab, F(ab')2, Fv, одноцепочечный Fv, однодоменное антитела, диатело (dAb), двухвалентное антитело, или биспецифическое антитело или его фрагмент, его однодоменный вариант, или антитело верблюдовых)), которое связывается с иммунной клеткой-мишенью или рецептором.

Константный участок тяжелой цепи молекулы антитела может быть выбран из IgG1, IgG2, IgG3, или IgG4, или их фрагмента, и, более обычно, из IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления Fc участок тяжелой цепи может включать одно или несколько изменений, например замещений, для повышения или снижения одного или нескольких из: связывания Fc рецептора, связывания неонатального Fc рецептора, гликозилирования антитела, количества цистеиновых остатков, функции эффекторных клеток, комплементарной функции, или стабилизирования образования антител (например стабилизирования IgG4). Например, константный участок тяжелой цепи для IgG4, например IgG4 человека, может включать замещение в положении 228 (например замену Ser на Pro) (см., например, Angal, S, King, DJ, *et al.* (1993) *Mol Immunol* 30:105-108 (initially described as S241P using a different numbering system); Owens, R, Ball, E, *et al.* (1997) *Immunotechnology* 3:107-116).

Молекула антитела фрагмента для нацеливания на иммунную клетку IFM может связываться с антигеном-мишенью при константе диссоциации менее чем около 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 10 нМ, например менее чем 1 нМ (например около 10 – 100 пМ). В рамках вариантов осуществления молекула антитела связывается с конформационным или линейным эпитопом на антигене. В определенных вариантах осуществления антиген, связанный молекулой антитела фрагмента для нацеливания на иммунную клетку, стабильно экспрессируется на поверхности иммунной клетки. В рамках вариантов осуществления антиген представляет собой рецептор

клеточной поверхности, который присутствует в бóльших количествах на клеточной поверхности по сравнению с рецептором для цитокиновой молекулы IFM на клеточной поверхности.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент для нацеливания на иммунную клетку выбран из молекулы антитела (например полноразмерного антитела (например антитела, которое включает, по меньшей мере, одну и, предпочтительно, две полные тяжелые цепи и, по меньшей мере, одну и, предпочтительно, две полные легкие цепи), или антигенсвязывающего фрагмента (например Fab, F(ab')2, Fv, одноцепочечного Fv, однодоменного антитела, диатела (dAb), двухвалентного антитела, или биспецифического или мультиспецифического антитела или его фрагмента, его однодоменного варианта, или антитела верблюдовых)).

В некоторых вариантах осуществления молекула антитела (например моно- или биспецифические антитела) связывается с одним или несколькими из CD45, CD8, CD18 или CD11a, например IgG, например IgG4 человека или его антигенсвязывающий домен, например Fab, F(ab')2, Fv, одноцепочечный Fv, связывается с CD45, CD8, CD18 или CD11a. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела представляет собой полученное от человека, гуманизированное или химерное антитело. В рамках вариантов осуществления молекула антитела представляет собой рекомбинантное антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 представляет собой антитело против CD45 человека, гуманизированное антитело против CD45 человека, или химерное антитело против CD45 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45 представляет собой моноклональное антитело против CD45. Примеры антител против CD45 включают антитела BC8, 4B2, GAP8.3 или 9.4. Также охватываются антитела против других мишеней на поверхности иммунной клетки , например антитела против CD8, такие как моноклональные антитела OKT8, антитела против CD18, такие как моноклональные антитела 1B4, и антитела против CD11a, такие как антитела MHM24.

Настоящее изобретение также охватывает молекулы антител, имеющие описанные здесь аминокислотные последовательности или аминокислотную последовательность, являющуюся по существу идентичной им, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих их, клетки-хозяева и векторы, включающие данные молекулы нуклеиновой кислоты.

В одном варианте осуществления молекула антитела, которая связывается с CD45, является специфической в отношении одной изоформы CD45 или связывается с более чем одной изоформой CD45, например является пан-CD45 антителом В некоторых вариантах осуществления молекула антитела против CD45 связывается с CD45RA и CD45RO. В одном варианте осуществления молекула антитела против CD45 представляет собой антитело BC8. В некоторых вариантах осуществления антитело BC8 связывается с CD45RA и CD45RO. В других вариантах осуществления молекула антитела против CD45 представляет собой молекулу CD45RO-специфического или пан-CD45 антитела, например она связывается с активированными Т-клетками и Т-клетками памяти. Дополнительные примеры молекул антитела против CD45 включают, но не ограничены, GAP8.3, 4B2, и 9.4.

В одном варианте осуществления молекула антитела против CD45 представляет собой антитело BC8, например химерное или гуманизированное антитело BC8. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело BC8 включает:

(i) вариабельную аминокислотную последовательность легкой цепи (необязательно дополнительно включающую каппа последовательность легкой цепи), соответствующую части антитела с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 7, 21, или 22, или аминокислотную последовательность, являющуюся по существу идентичной ей (например аминокислотную последовательность, являющуюся, по меньшей мере, на 85%, 90%, 95% или более идентичной части антитела согласно SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 7, 21, или 22); и/или

(ii) вариабельную аминокислотную последовательность тяжелой цепи (необязательно дополнительно включающую последовательность тяжелой цепи IgG1 человека или последовательность IgG4 человека, имеющую замещение S228P) согласно аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:5, 6, или 8, соответственно, или аминокислотную последовательность, являющуюся по существу идентичной ей (например аминокислотную последовательность, являющуюся, по меньшей мере, на 85%, 90%, 95% или более идентичной SEQ ID NO: 5, 6, или 8, соответственно).

В других вариантах осуществления аминокислота согласно SEQ ID NO:1-4 или аминокислота, являющаяся по существу идентичной им (например аминокислота, являющаяся, по меньшей мере, на 85%, 90%, 95% или более идентичной SEQ ID NO: 1-4) (необязательно дополнительно включающая каппа последовательность легкой цепи) включает, необязательно через линкер, цитокин IL-15 или рецептор IL-15, например домен sushi, как описано здесь (например SEQ ID NO:9 или аминокислоту, по существу являющуюся идентичной им (например аминокислоту, являющуюся, по меньшей мере, на 85%, 90%, 95% или более идентичной SEQ ID NO: 9).

В других вариантах осуществления молекула антитела, которая связывается с CD45, представляет собой антитело 9.4, например химерное или гуманизированное антитело 9.4. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело 9.4 включает:

(i) вариабельную аминокислотную последовательность легкой цепи (необязательно дополнительно включающую каппа последовательность легкой цепи), соответствующую части антитела с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO:15, или аминокислотную последовательность, являющуюся по существу идентичной ей (например аминокислотную последовательность, являющуюся, по меньшей мере, на 85%, 90%, 95% или более идентичной части антитела согласно SEQ ID NO: 15); и/или

(ii) вариабельную аминокислотную последовательность тяжелой цепи (необязательно дополнительно включающую последовательность тяжелой цепи IgG1 человека) согласно аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 14, соответственно, или аминокислотную последовательность, являющуюся по существу идентичной ей (например аминокислотную последовательность, являющуюся, по меньшей мере, на 85%, 90%, 95% или

более идентичной SEQ ID NO: 14, соответственно). В рамках вариантов осуществления антитело 9.4 включает один, два, или все три CDR1, CDR2 или CDR3 вариабельного участка легкой цепи и/или вариабельного участка тяжелой цепи антитела 9.4, например в соответствии с определением Kabat, или близко связанный CDR, например CDR, которые имеют, по меньшей мере, одно аминокислотное изменение, но не более чем два, три или четыре изменения (например замещений, делеций или вставок, например консервативных замещений) из последовательности CDR согласно SEQ ID NO: 14 или 15.

В других вариантах осуществления молекула антитела, которая связывается с CD45, представляет собой антитело 4B2, например химерное или гуманизированное антитело 4B2. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело 4B2 включает:

(i) вариабельную аминокислотную последовательность легкой цепи (необязательно дополнительно включающую каппа последовательность легкой цепи), соответствующую части антитела с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO:17, или аминокислотную последовательность, являющуюся по существу идентичной ей (например аминокислотную последовательность, являющуюся, по меньшей мере, на 85%, 90%, 95% или более идентичной части антитела согласно SEQ ID NO: 17); и/или

(ii) вариабельную аминокислотную последовательность тяжелой цепи (необязательно дополнительно включающую последовательность тяжелой цепи IgG1 человека) согласно аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 16, соответственно, или аминокислотную последовательность, являющуюся по существу идентичной ей (например аминокислотную последовательность, являющуюся, по меньшей мере, на 85%, 90%, 95% или более идентичной SEQ ID NO: 16, соответственно). В рамках вариантов осуществления антитело 4B2 включает один, два, или все три CDR1, CDR2 или CDR3 вариабельного участка легкой цепи и/или вариабельного участка тяжелой цепи антитела 4B2, например в соответствии с определением Kabat, или близко связанный CDR, например CDR, которые имеют, по меньшей мере, одно аминокислотное изменение, но не более чем два, три или четыре изменения (например замещений, делеций или вставок, например консервативных замещений) из последовательности CDR согласно SEQ ID NO: 16 или 17.

Молекулы антител

Описанные здесь иммуностимулирующие слитые молекулы могут включать одну или несколько молекул антител. Например, активатор иммунных клеток может включать молекулу антитела. В одном варианте осуществления молекула антитела связывается с раковым антигеном, например опухолевым антигеном или стромальным антигеном. В некоторых вариантах осуществления раковый антиген представляет собой, например, раковый антиген млекопитающего, например человека. В других вариантах осуществления молекула антитела связывается с антигеном иммунной клетки, например антигеном иммунной клетки млекопитающего, например человека. Например, молекула антитела специфично связывается с

эпитопом, например линейным или конформационным эпитопом на раковом антигене или антигене иммунной клетки.

В одном варианте осуществления молекула антитела представляет собой молекулу моноспецифического антитела и связывается с одним эпитопом. Например, молекула моноспецифического антитела, имеющая множество последовательностей вариабельного домена иммуноглобулина, каждая из которых связывается с одним и тем же эпитопом.

В другом варианте осуществления молекула антитела является молекулой мультиспецифического антитела, например она включает множество последовательностей вариабельного домена иммуноглобулина, при этом первая последовательность вариабельного домена иммуноглобулина имеет специфичность связывания в отношении первого эпитопа, а вторая последовательность вариабельного домена иммуноглобулина имеет специфичность связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на одном и том же антигене, например одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы накладываются друг на друга. В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы не накладываются друг на друга. В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на различных антигенах, например различных белках (или различных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления молекула мультиспецифического антитела включает третий, четвертый или пятый вариабельный домен иммуноглобулина. В одном варианте осуществления молекула мультиспецифического антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела, молекулу триспецифического антитела или молекулу тетраспецифического антитела.

В одном варианте осуществления молекула мультиспецифического антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела. Биспецифическое антитело имеет специфичность в отношении не более чем двух антигенов. Молекула биспецифического антитела характеризуется последовательностью первого вариабельного домена иммуноглобулина, которая имеет специфичность связывания в отношении первого эпитопа, и последовательностью второго вариабельного домена иммуноглобулина, которая имеет специфичность связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на одном и том же антигене, например одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы накладываются друг на друга. В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы не накладываются друг на друга. В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на различных антигенах, например различных белках (или различных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления молекула биспецифического антитела включает последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые имеют специфичность связывания в отношении первого эпитопа, и последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательности вариабельного домена легкой цепи,

которые имеют специфичность связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления молекула биспецифического антитела включает половину антитела, имеющую специфичность связывания в отношении первого эпитопа, и половину антитела, имеющую специфичность связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления молекула биспецифического антитела включает половину антитела или его фрагмент, имеющий специфичность связывания в отношении первого эпитопа, и половину антитела или его фрагмент, имеющий специфичность связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления молекула биспецифического антитела включает scFv или Fab или их фрагмент, имеющий специфичность связывания в отношении первого эпитопа, и scFv или Fab или их фрагмент, имеющий специфичность связывания в отношении второго эпитопа.

В одном варианте осуществления молекула антитела включает диатело и одноцепочечную молекулу, а также антигенсвязывающий фрагмент антитела (например Fab, $F(ab')_2$, и Fv). Например, молекула антитела может включать последовательность вариабельного домена тяжелой цепи (H) (обозначаемого здесь как VH) и последовательность вариабельного домена легкой цепи (L) (обозначаемого здесь как VL). В одном варианте осуществления молекула антитела включает или состоит из тяжелой цепи и легкой цепи (обозначаемых здесь как половина антитела). В другом примере молекула антитела включает две последовательности вариабельного домена тяжелой цепи (H) и две последовательности вариабельного домена легкой цепи (L), тем самым образуя два антигенсвязывающих участка, например Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fc, Fd, Fd', Fv, одноцепочечные антитела (например scFv), антитела с одним вариабельным доменом, диатела (Dab) (двухвалентные и моно- или биспецифические), триатела (трехвалентные и моно- или мультиспецифические), и химерные или гуманизированные антитела, которые могут быть получены путем модифицирования цельных антител, или синтезированные de novo с использованием технологий рекомбинантной ДНК. Данные функциональные фрагменты антител сохраняют способность избирательно связываться с их соответствующим антигеном или рецептором. Антитела и фрагменты антител могут относится к любому классу антител, включая, но без ограничения, IgG, IgA, IgM, IgD, и IgE, и любому подклассу антител (например IgG1, IgG2, IgG3, и IgG4). Могут быть получены молекулы моноклональных или поликлональных антител. Молекула антитела также может относится к человеку, являться гуманизированной, иметь подсаженный CDR, или являться полученным *in vitro* антителом. Антитело может иметь константный участок тяжелой цепи, выбранный, например, из IgG1, IgG2, IgG3, или IgG4. Антитело также может иметь легкую цепь, выбранную, например, из каппа или лямбда. Термин "иммуноглобулин" (Ig) используется здесь взаимозаменяемым образом с термином "антитело".

Пример антигенсвязывающих фрагментов молекулы антитела включают: (i) Fab-фрагмент – одновалентный фрагмент, состоящий из VL, VH, CL и CH1 доменов; (ii) фрагмент F(ab')2 – двухвалентный фрагмент, включающий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент в виде диатела (dAb),

который состоит из домена VH; (vi) вариабельный домен верблюдовых или превращенный в него домен; (vii) одноцепочечный Fv (scFv), см, например, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; и Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883); (viii) однодоменное антитело. Такие фрагменты антител получают с использованием стандартных способов, известных специалистам в данной области, при этом эти фрагменты подвергают скринингу таким же образом, что и интактные антитела.

Молекулы антител включают интактные молекулы, а также их функциональные фрагменты. Константные участки молекул антител могут быть изменены, например подвергнуты мутированию, для модифицирования свойств антитела (например повышения или снижения одного или нескольких из: связывания Fc-рецептора, гликозилирования антитела, количества цистеиновых остатков, функции эффекторных клеток, или комплементарной функции).

Молекулы антител также могут представлять собой однодоменные антитела. Однодоменные антитела могут включать антитела, чьи определяющие комплементарность участки представляют собой часть однодоменного полипептида. Примеры включают, но без ограничения, антитела с тяжелыми цепям; антитела, которые естественным образом не имеют легких цепей; однодоменные антитела, полученные из стандартных антител с 4 цепями; модифицированные антитела и однодоменные каркасы, отличные от полученных на основе антител. Однодоменные антитела могут являться любыми из известных в данной области или любыми открытыми в будущем однодоменными антителами. Однодоменные антитела могут быть получены от любого вида, включая, но без ограничения, мышь, человека, верблюда, ламу, акулу, козу, кролика и корову. В соответствии с другим аспектом изобретения, однодоменное антитело представляет собой встречающееся в природе однодоменное антитело, известное как антитело с тяжелыми цепями, не имеющее легких цепей. Подобные однодоменные антитела описаны, например, в WO 9404678. Для ясности данный вариабельный домен, полученный на основе антитела с тяжелыми цепями, естественным образом не имеющего легкой цепи, известен здесь как VHH или нанотело для его отличения от стандартного VH с иммуноглобулинами в виде четырех цепей. Подобная молекула VHH может быть получена из антител, выращенных в верблюдовых *(Camelidae)*, например в верблюде, дромадере, альпаке и гуанако. Помимо верблюдовых, другие виды могут продуцировать антитела с тяжелыми цепями, естественным образом не имеющие легкую цепь; при этом подобные VHH находятся в рамках объема настоящего изобретения.

VH и VL участки могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), разделенные участками, которые являются более консервативными, называемыми "каркасными участками" (FR или FW).

Соотношение каркасного участка и CDR было точно определено с помощью ряда способов (см. Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia, C. *et al.* (1987)

J. Mol. Biol. 196:901-917; и определение AbM, использованное в программном обеспечении для моделирования AbM антител Oxford Molecular. В целом см. *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains.* In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg).

Термины "определяющий комплементарность участок" и "CDR" в соответствии с используемым здесь значением обозначают последовательности аминокислот в вариабельных участках антитела, которые обеспечивают специфичность в отношении антигена и аффинность связывания. В целом, существуют три CDR в каждом вариабельном участке тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три CDR в каждом вариабельном участке легкой цепи (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

Точные границы аминокислотных последовательностей конкретного CDR могут быть определены с помощью ряда известных способов, включая описанные Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD ("Kabat" numbering scheme), Al-Lazikani *et al.*, (1997) *JMB* 273,927-948 (схема нумерации "Chothia"). В соответствии с используемым здесь значением, CDR, определенные в соответствии со схемой нумерации "Chothia" также иногда обозначаются как "гипервариабельные петли".

Например, согласно Kabat, аминокислотные остатки CDR в вариабельном домене тяжелой цепи (VH) пронумерованы в виде 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2), и 95-102 (HCDR3); а аминокислотные остатки CDR в вариабельном домене легкой цепи (VL) пронумерованы в виде 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), и 89-97 (LCDR3). Согласно Chothia, аминокислоты CDR в VH пронумерованы в виде 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2), и 95-102 (HCDR3); а аминокислотные остатки в VL пронумерованы в виде 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2), и 91-96 (LCDR3). Каждый из VH и VL как правило включает три CDR и четыре FR, расположенные от амино-конца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Молекула антитела может представлять собой поликлональное или моноклональное антитело.

Термины "моноклональное антитело" или "композиция моноклональных антител" в соответствии с используемым здесь значением обозначают препарат на основе молекул антитела, имеющих один и тот же молекулярный состав. Композиция моноклональных антител демонстрирует единую специфичность связывания и аффинность в отношении определенного эпитопа. Моноклональное антитело может быть получено с помощью технологии на основе гибридом или с помощью способов, в рамках которых не используется технология на основе гибридом (например рекомбинантных способов).

Антитело может быть получено рекомбинантным способом, например получено с помощью фагового дисплея или с помощью комбинаторных способов.

В одном варианте осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело человека (например антитело, полученное в мыши, которая была генетически модифицирована

для продуцирования антитела с последовательностью иммуноглобулина человека) или не относящееся к человеку антитело, например антитело грызуна (мыши или крысы), козы, примата (например обезьяны), верблюда. Не относящееся к человеку антитело предпочтительно представляет собой антитело грызуна (антитело мыши или крысы). Способы получения антител грызунов известны в данной области.

Моноклональные антитела человека могут быть получены с помощью трансгенных мышей, несущих гены иммуноглобулина человека вместо системы мыши. Спленоциты из этих трансгенных мышей, иммунизированных представляющим интерес антигеном, используются для получения гибридом, которые секретируют mAb человека со специфической аффинностью в отношении эпитопов из белка человека (см., например, Wood *et al.* международная заявка WO 91/00906, Kucherlapati *et al.* PCT публикация WO 91/10741; Lonberg *et al.* международная заявка WO 92/03918; Kay *et al.* международная заявка 92/03917; Lonberg, N. *et al.* 1994 *Nature* 368:856-859; Green, L.L. *et al.* 1994 *Nature Genet.* 7:13-21; Morrison, S.L. *et al.* 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855; Bruggeman *et al.* 1993 *Year Immunol* 7:33-40; Tuaillon *et al.* 1993 *PNAS* 90:3720-3724; Bruggeman *et al.* 1991 *Eur J Immunol* 21:1323-1326).

Молекула антитела может представлять собой антитело, в котором вариабельный участок или его часть, например CDR, продуцированы в не являющемся человеком организме, например крысе или мыши. Изобретение охватывает химерные, имеющие подсаженные CDR, и гуманизированные антитела. Изобретение охватывает молекулы антител, продуцированные в не являющемся человеком организме, например в крысе или мыши, и затем подвергнутые модифицированию, например в вариабельном каркасном или константном участке, для снижения антигенности у человека Например, антитела против CD45 человека, такие как 9.4, 4B2 и BC8, могут быть гуманизированы с помощью известных в данной области способов для получения описанных здесь связанных продуктов слияния.

Молекула антитела может быть гуманизирована с помощью известных в данной области способов (см., например, Morrison, S. L., 1985, *Science* 229:1202-1207, by Oi *et al.,* 1986, *BioTechniques* 4:214, и Queen *et al.* патент США 5585089, патент США 5693761 и патент США 5693762, содержание всех из которых приведено здесь в качестве ссылки).

Гуманизированные или имеющие подсаженный CDR молекулы антител могут быть продуцированы с помощью подсаживания CDR или замещения CDR, при котором один, два, или все CDR цепи иммуноглобулина могут быть замещены. См., например, патент США 5225539; Jones *et al.* 1986 *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* 1988 *Science* 239:1534; Beidler *et al.* 1988 *J. Immunol.* 141:4053-4060; патент США 5225539 Winter, содержание всех из которых приведено здесь в качестве ссылки. Winter описывает способ подсаживания CDR, который может применяться для получения гуманизированных антител по настоящему изобретению (заявка на патент Соединенного Королевства GB 2188638A, поданная 26 марта 1987 г.; патент США 5225539 Winter), содержание которых приведено здесь в качестве ссылки.

Изобретение также охватывает молекулы гуманизированных антител, в которых

определенные аминокислоты были замещены, удалены или добавлены. Критерии выбора аминокислот от донора описаны в патенте США 5585089, например колонках 12-16 патента США 5585089, например колонках 12-16 патента США 5585089, содержание которых приведено здесь в качестве ссылки. Другие способы гуманизирования антител описаны в патенте EP 519596 A1 Padlan *et al.*, опубликованном 23 декабря 1992.

Молекула антитела может представлять собой одноцепочечное антитело. Одноцепочечное антитеол (scFv) может являться модифицированным (см., например, Colcher, D. *et al.* (1999) *Ann N Y Acad Sci* 880:263-80; и Reiter, Y. (1996) *Clin Cancer Res* 2:245-52). Одноцепочечное антитело может быть димеризировано или мультимеризировано для получения мультивалентных антител, имеющих специфичность в отношении различных эпитопов одного и того же белка-мишени.

В других вариантах осуществления молекула антитела имеет константный участок тяжелой цепи, выбранный, например, из константных участков тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, и IgE; в частности, выбранный, например, из (например относящихся к человеку) константных участков тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3, и IgG4. В другом варианте осуществления молекула антитела имеет константный участок легкой цепи, выбранный, например, из (например, относящихся к человеку) константных участков легкой цепи каппа или лямбда. Константный участок может быть изменен, например подвергнут мутированию, для модифицирования свойств антитела (например повышения или снижения одного или нескольких из: связывания Fc-рецептора, гликозилирования антитела, количества цистеиновых остатков, функции эффекторных клеток, и/или комплементарной функции). В одном варианте осуществления антитело имеет эффекторную функцию и может связывать комплемент. В других вариантах осуществления антитело не рекрутирует эффекторные клетки или не связывает комплемент. В другом варианте осуществления антитело имеет пониженную или отсутствующую способность связывать Fc-рецептор. Например, оно представляет собой изотип или подтип, фрагмент или другой мутант, который не обеспечивает связывание с Fc-рецептором, например оно имеет мутагенизированный или удаленный участок связывания Fc-рецептора.

Способы изменения константного участка антитела известны в данной области. Антитела с измененной функцией, например измененной аффинностью в отношении эффекторного лиганда, например FcR на клетке, или компонента C1 комплемента, могут быть получены путем замены, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка в константной части антитела другим остатком (см., например, EP 388151 A1, патент США 5624821 и патент США 5648260, содержание всех из которых приведено здесь в качестве ссылки). Может быть описан аналогичный тип изменений, который в случае применения в отношении иммуноглобулина мышей или других видов будет снижать или устранять данные функции.

Молекула антитела может быть производной или быть связана с другой функциональной молекулой (например молекулой цитокина, как описано здесь, или другими химическими или белковоподобными группами). В соответствии с используемым здесь значением обозначение

"производная" молекула антитела обозначает молекулу, которая подверглась модифицированию. Способы дериватизации включают, но без ограничения, добавление флуоресцентного фрагмента, радионуклида, токсина, фермента или аффинного лиганда, такого как биотин. Соответственно, молекулы антител по изобретению включают производные и иным образом модифицированные формы описанных здесь антител, включая молекулы иммуноадгезии. Например, молекула антитела может быть функционально связана (с помощью химического соединения, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным способом) с одной или несколькими молекулярными структурами, такими как молекула цитокина, другое антитело (например, биспецифическое антитело или диатело), детектируемый агент, цитотоксический агент, фармацевтический агент и/или белок или пептид, который может опосредовать ассоциацию антитела или части антител с другой молекулой (такой как участок ядра стрептавидина или полигистидиновая метка).

Один тип производной молекулы антитела представляет собой молекулу, продуцируемую с помощью поперечного связывания молекулы антитела с одним или несколькими белками, например молекулой цитокина, другой молекулой антитела (того же типа или других типов, например для создания биспецифических антител). Подходящие поперечные линкеры включают линкеры, которые являются гетеробифункциональными, имеющими две отличных в плане реактивности группы, разделенные подходящим спейсером (например сложный эфир m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимида) или гомобифункциональными (например дисукцинимидилсуберат). Такие линкеры предлагаются Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

Режимы дозирования

Терапевтически эффективная дозировка представляет собой количество нагруженных иммунным агонистом Т-клеток (например нагруженных связанным продуктом слияния IL-12 Т-клеток или нагруженных наногелем на основе IL-15 Т-клеток), которое способно продуцировать клинически желаемый результат (то есть достаточное количество для индуцирования или повышения иммунного ответа на основе специфических Т-клеток против клеток, сверхэкспрессирующих антиген (например ответа на основе цитотоксических Т-клеток) статистически значимым образом) у подвергаемого лечению человека или не являющегося человеком животного. Как хорошо известно в области медицины, дозировка для любого пациента зависит от многих факторов, включая размер пациента, вес, площадь поверхности тела, возраст, конкретную вводимую терапию, пол, время и способ введения, общее состояние здоровья, и другие одновременно вводимые лекарства. Дозировки варьируются, однако согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, дозировка для введения описанных здесь нагруженных иммунными агонистами Т-клеток составляет приблизительно 20 млн. клеток/м^2, 40 млн. клеток/м^2, 100 млн. клеток/м^2, 120 млн. клеток/м^2, 200 млн. клеток/м^2, 360 млн. клеток/м^2, 600 млн. клеток/м^2, 1 млрд. клеток/м^2, 1,5 млрд. клеток/м^2, 10^6 клеток/м^2, приблизительно 5 x 10^6 клеток/м^2 , приблизительно 10^7 клеток/м^2, приблизительно 5 x 10^7 клеток/м^2, приблизительно 10^8 клеток/м^2,

приблизительно 5 x 10^8 клеток/$м^2$, приблизительно 10^9 клеток/$м^2$, приблизительно 5 x 10^9 клеток/$м^2$, приблизительно 10^{10} клеток/$м^2$, приблизительно 5 x 10^{10} клеток/$м^2$, или приблизительно 10^{11} клеток/$м^2$.

В некоторых вариантах осуществления нагруженные связанным продуктом слияния IL-12 Т-клетки и нагруженные наногелем на основе IL-15 Т-клетки вводят при соотношении одного агента и другого агента приблизительно 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70; 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100, 1:120, 1:130, 1:140, 1:150, 1:160, 1:170, 1:180, 1;190, 1:200, 1:500, 1:1000. 1:5000, 1:10,000, 1:100,000, 2:3, 3:4, 2:5, 3:5, 3:10, 7:10, 9:10, 2:15, 4:15, 6:15, 7:15, 8:15, 11:15, 13:15, 14:15, 3:20, 7:20, 9:20, 11:20, 13:20, 17:20, 19:20, 1:25, 2:25, 4:25, 6:25, 7:25, 8: 25, 10:25, 11:25, 12:25, 13:25, 14:25, 16:25, 17:25, 18:25, 19:25, 21:25, 22:25, 23:25, или 24:25.

Виды терапии на основе синергичной комбинации по настоящему изобретению могут быть введены один раз или в виде двух или более повторных введений. Подобные виды комбинированной терапии могут быть введены ежедневно, еженедельно, один раз в две недели, или ежемесячно. Помимо этого или в качестве альтернативы, подобные виды комбинированной терапии могут быть введены приблизительно каждый час, 2 часа, 5 часов, 8 часов, 10, часов, 12 часов, 15 часов, 18 часов, 20 часов, 24 часов, 2 дня, 3 дня, 5 дней, 10 дней, 30 дней, 60 дней, 90 дней, 3 недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель, 10 недель, 12 недель, 15 недель, 18 недель, 24 недель, 36 недель, или 52 недели.

Нуклеиновые кислоты/векторы/клетки

Изобретение также охватывает нуклеиновые кислоты, включающие нуклеотидные последовательности, которые кодируют описанные здесь иммуностимулирующие слитые молекулы. Дополнительно здесь предусмотрены векторы, включающие нуклеотидные последовательности, кодирующие IFM и описанные здесь молекулы антител. В одном варианте осуществления векторы включают нуклеотиды, кодирующие IFM и описанные здесь молекулы антител. В одном варианте осуществления векторы включают описанные здесь нуклеотидные последовательности. Векторы включают, но без ограничения, вирус, плазмиду, космиду, лямбда фаг или дрожжевую искусственную хромосому (YAC). Могут применяться различные векторные системы. Например, в рамках одного класса векторов используются ДНК-элементы на основе вирусов животных, например вируса папилломы коровы, полиомавируса, аденовируса, вируса осповакцины, бакуловируса, ретровирусов (вируса саркомы Рауса, MMTV или MOMLV) или вируса SV40. В рамках другого класса векторов используются РНК-элементы на основе РНК-вирусов, таких как вирус леса Семлики, вирус восточного энцефалита лошадей и флавивирусы.

Кроме того, клетки со стабильно интегрированной ДНК в их хромосомах могут быть выбраны путем введения одного или нескольких маркеров, которые обеспечивают отбор трансфицированных клеток-хозяев. Маркер может обеспечивать, например, прототропию

ауксотрофного хозяина, резистентность к биоцидам (например, антибиотикам) или устойчивость к тяжелым металлам, таким как медь, или ей подобным. Маркерный ген для отбора может быть либо напрямую связан с экспрессируемыми ДНК-последовательностями, или введен в ту же клетку с помощью котрансформации. Также могут потребоваться дополнительные элементы для оптимального синтеза иРНК. Данные элементы могут включать сигналы сплайсинга, а также транскрипционные промотеры, энхансеры, и сигналы терминации.

После получения для экспрессии экспрессионного вектора или ДНК-последовательности, содержащей конструкты, векторы экспрессии могут быть трансфецированы или внесены в подходящую клетку-хозяина. Для достижения этого могут использоваться различные способы, такие как, например, слияние с протопластами, осаждение фосфата кальция, электропорация, ретровирусная трансдукция, вирусная трансфекция, генная пушка, трансфекция на основе липидов или другие стандартные способы. В случае слияния с протопластами клетки выращивают в питательной среде и подвергают скринингу на предмет подходящей активности. Способы и условия для культивирования полученных трансфицированных клеток и для выделения продуцированной молекулы антитела известны специалистам в данной области и могут варьироваться или быть оптимизированы в зависимости от конкретного вектора экспрессии и используемой клетки-хозяина млекопитающего на основе настоящего изобретения.

В другом аспекте изобретение предусматривает описанные здесь клетки-хозяева и векторы, содержащие нуклеиновые кислоты. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в одном векторе или различных векторах, присутствующих в той же клетке-хозяине или отдельной клетке-хозяине. Клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку, например клетку млекопитающего, клетку насекомого, дрожжевую клетку, или прокариотическую клетку, например *E. coli*. Например, клетка млекопитающего может представлять собой культивируемую клетку или линию клеток. Примеры клеток млекопитающих включают линии лимфоцитарных клеток (например NSO), клетки яичника китайского хомячка (CHO), COS клетки, ооцитные клетки, и клетки от трансгенного животного, например эпителиальные клетки молочных желез.

Изобретение также предусматривает клетки-хозяева, включающие нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу антитела, как описано здесь. В одном варианте осуществления клетки-хозяева являются генетически модифицированными для включения нуклеиновых кислот, кодирующих молекулу антитела. В одном варианте осуществления клетки-хозяева генетически модифицированы с использованием экспрессионной кассеты. Термин "экспрессионная кассета" обозначает нуклеотидные последовательности, которые способны влиять на экспрессию гена в хозяевах, являющихся совместимыми с такими последовательностями. Подобные кассеты могут включать помотер, открытую рамку считывания с/без интронов, и сигнал терминации. Также могут быть использованы дополнительные факторы, которые необходимы или являются полезными в рамках влияния на экспрессию, такие как, например, индуцируемый промотер. Изобретение дополнительно предусматривает клетки-хозяева, включающие описанные здесь векторы. Клетка может представлять собой, но без ограничения, эукариотическую клетку,

бактериальную клетку, клетку насекомого или клетку человека. Подходящие эукариотические клетки включают, но без ограничения, клетки Vero, клетки HeLa, клетки COS, клетки CHO, клетки HEK293, клетки BHK и клетки MDCKII. Подходящие клетки насекомых включают, но без ограничения, клетки Sf9.

Композиции

Здесь предусмотрены композиции, включая фармацевтические композиции, включающие иммуностимулирующие слитые молекулы и/или белковые наногели. Композиция может быть составлена в рамках фармацевтически приемлемых количеств в виде фармацевтически приемлемых композиций. Термин "фармацевтически приемлемый" означает нетоксичный материал, который не оказывает негативного влияния на эффективность биологической активности активных ингредиентов (например биологически активных белков наночастиц). В рамках некоторых вариантов осуществления подобные композиции могут содержать соли, буферирующие агенты, консерванты и необязательно другие терапевтические агенты. В рамках некоторых вариантов осуществления фармацевтические композиции также могут содержать подходящие консерванты. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут присутствовать в единичной лекарственной форме и могут быть получены с помощью любых способов, которые хорошо известны в области фармакологии. В рамках некоторых вариантов осуществления фармацевтические композиции, являющиеся подходящими для парентерального введения, включают стерильные водные или неводные препараты на основе наночастиц, которые в рамках некоторых вариантов осуществления являются изотоническими по отношению к крови субъекта-реципиента. Данный препарат может быть составлен в соответствии с известными способами. Стерильный инъецируемый препарат также может представлять собой стерильный инъецируемый раствор или суспензию в нетоксичном парентерально-приемлемом разбавителе или растворителе.

Дополнительные композиции включают модифицированные клетки, например модифицированные иммунные клетки, дополнительно включающие один или несколько связанных слитых белков на их клеточной поверхности. Это может быть полезно для *ex vivo* получения клеточной терапии, например адоптивной клеточной терапии, терапии на основе CAR-Т-клеток, терапии на основе модифицированных TCR Т-клеток, терапии на основе опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, терапии на основе обученных против антигена Т-клеток, терапии на основе обогащенных антиген-специфичных Т-клеток, или терапии на основе NK-клеток.

В некоторых вариантах осуществления IFM и/или наногели по настоящему изобретению могут быть введены напрямую нуждающемуся в этом пациенту, например в форме наночастицы или гидрогеля или биогеля, в виде агентов для специфической доставки терапевтических белков с помощью рецептор-опосредованного связывания рецепторов, являющихся уникальными в отношении определенных клеток (например CD4 или CD8). Подобное прямое введение может являться системным (например парентеральным, например представлять собой внутривенную

инъекцию или инфузию) или местным (например внутриопухолевым, например представлять собой инъекцию в микросреду опухоли). Термины "парентеральное введение" и "введенный парентерально" в соответствии с используемым здесь значением обозначают способы введения, отличные от энтерального (то есть через пищеварительный тракт) и местного введения, обычно с помощью инъекции или инфузии, и включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию.

В некоторых вариантах осуществления IFM и/или наногели по настоящему изобретению могут использоваться в качестве *ex vivo* агентов для индуцирования активации и экспансии выделенных аутологичных и аллогенных клеток перед введением или повторным введением пациенту с помощью системного или местного введения. Например подвергнутые экспансии клетки могут использоваться в рамках Т-клеточной терапии, включая АСТ (адоптивный перенос клеток), а также с другими важными типами иммунных клеток, включая, например, В-клетки, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, NK-клетки, антиген-специфические CD8 Т-клетки, генетически модифицированные Т-клетки для экспрессирования химерных антигенных рецепторов (CAR) или CAR-Т-клетки, генетически модифицированные Т-клетки для экспрессии Т-клеточных рецепторов, являющихся специфическими в отношении опухолевого антигена, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), и/или "тренированные" с использованием антигена Т-клетки (например Т-клетки, которые были "тренированы" с помощью антигенпрезентирующих клеток (APC), включающих представляющие интерес антигены, например опухоль-ассоциированные антигены (TAA)).

Варианты и способы терапевтического применения

Описанные здесь композиции и способы имеют множество вариантов терапевтического применения, включая, например, лечение рака и инфекционных заболеваний. Настоящее изобретение предусматривает, *inter alia*, способы индуцирования иммунного ответа у субъекта с раком для лечения имеющего рак субъекта. Примеры способов включают введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из описанных здесь иммуностимулирующих слитых молекул, при этом IFM выбрана и сконструирована для повышения доступности цитокина на клеточной поверхности и поэтому обеспечивает передачу его сигнала.

Описанные здесь способы включают лечение рака у субъекта путем использования IFM, например IFM и/или наночастицы, включающей IFM, как описано здесь, например с использованием описанной здесь фармацевтической композиции. Также предусмотрены способы снижения или облегчения симптома рака у субъекта, а также способы ингибирования роста рака и/или уничтожения одной или нескольких раковых клеток. В рамках вариантов осуществления описанные здесь способы снижают размер опухоли и/или понижают количество раковых клеток у

субъекта, которому вводят описанную здесь фармацевтическую композицию.

В рамках вариантов осуществления рак представляет собой гематологический рак. В рамках вариантов осуществления гематологический рак представляет собой лейкоз или лимфому. В соответствии с используемым здесь значением, термин "гематологический рак" обозначает опухоль гемопоэтических или лимфоидных тканей, например опухоль, которая затрагивает кровь, костный мозг или лимфатические узлы. Примеры гематологических злокачественных новообразований включают, но без ограничения, лейкоз (например, острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелогенный лейкоз (CML), волосатоклеточный лейкоз, острый моноцитарный лейкоз (AMoL), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (JMML) или крупнозернистый лимфоцитарный лейкоз), лимфому (например, лимфому, связанная со СПИДом, кожную Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина (например, классическую лимфому Ходжкина или лимфому Ходжкина с преобладанием лимфоцитов), грибовидный микоз, неходжкинскую лимфому (например, В-клеточную неходжкинскую лимфому (например, лимфому Беркитта, малую лимфоцитарную лимфому (CLL / SLL), диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, иммунобластную крупноклеточную лимфому, предшественник В-лимфобластной лимфомы, или мантийноклеточную лимфому) или Т-клеточную неходжкинскую лимфому (грибовидный микоз, анапластическую крупноклеточную лимфому, или предшественник Т-лимфобластной лимфомы)), первичную лимфому центральной нервной системы, синдром Сезари, макроглобулинемию Вальденстрема), хроническое миелопролиферативное новообразование, гистиоцитоз клеток Лангерганса, множественную миелому / новообразование плазматических клеток, миелодиспластический синдром или миелодиспластическое/миелопролиферативное новообразование.

В рамках вариантов осуществления рак представляет собой солидный рак. Примеры солидного рака включают, но без ограничения, рак яичника, рак прямой кишки, рак желудка, рак яичка, рак анальной области, рак матки, рак толстой кишки, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак, рак печени, немелкоклеточную карциному легкого, рак тонкой кишки, рак пищевода, меланому, саркому Капоши, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак матки, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак шейки матки, карциному маточных труб, карциному эндометрия, карциному влагалища, саркому мягких тканей, рак уретры, рак вульвы, рак полового члена, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, опухоль оси позвоночника, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичная лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, метастатические поражения при указанных видах рака или их комбинации.

В рамках вариантов осуществления иммуностимулирующие слитые молекулы и/или

белковые наногели (или их фармацевтические композиции) вводят с помощью способа, являющегося подходящим для подвергаемого лечению или предотвращению заболевания. Количество и частота введения будут определены на основе таких факторов, как состояние пациента и тип и тяжесть заболевания пациента. Подходящие дозировки могут быть определены с помощью клинических испытаний. Например при указании в виде "эффективного количества" или "терапевтического количества" конкретное количество фармацевтической композиции (или иммуностимулирующих слитых молекул) для введения может быть определено лечащим врачом с учетом индивидуальных различий в плане размера опухоли, тяжести инфекции или метастазов, возраста, веса и состояния субъекта. В рамках вариантов осуществления описанная здесь фармацевтическая композиция может быть введена в дозировке от 10^4 до 10^9 клеток/кг массы тела, например от 10^5 до 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целые значения в рамках данных диапазонов. В рамках вариантов осуществления описанная здесь фармацевтическая композиция может быть введена насколько раз при указанных дозировках. В рамках вариантов осуществления описанная здесь фармацевтическая композиция может быть введена с помощью способов на основе инфузии, описанных в области иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988).

В рамках вариантов осуществления иммуностимулирующие слитые молекулы и/или белковые наногели или их фармацевтическое композиции вводят субъекту парентерально. В рамках вариантов осуществления клетки вводят субъекту внутривенно, подкожно, внутриопухолевым способом (внутрь опухоли), интранодально (внутрь узлов), внутримышечно, внутрикожно или внутрибрюшинно. В рамках вариантов осуществления клетки вводят, например инъецируют, напрямую в опухоль или лимфатический узел. В рамках вариантов осуществления клетки вводят в виде инфузии (например как описано у Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988) или с помощью внутривенного введения. В рамках вариантов осуществления клетки вводят в виде инъецируемой депо-композиции.

В рамках вариантов осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В рамках вариантов осуществления субъект представляет собой человека, обезьяну. свинью, собаку, кошку. корову, овцу, козу, кролика, крысу или мышь. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В рамках вариантов осуществления субъект представляет собой субъекта-ребенка. например возрастом менее 18 лет, например возрастом менее 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 лет, 1 года или менее. В рамках вариантов осуществления субъект представляет собой взрослого субъекта, например в возрасте, по меньшей мере, 18 лет, например, по меньшей мере, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, или 80-90 лет.

Дополнительные комбинации

Комбинации описанного здесь связанного продукта слияния и наногеля могут использоваться в рамках дополнительных комбинаций с одним или несколькими

терапевтическими агентами или процедурой.

В некоторых вариантах осуществления комбинацию связанного продукта слияния и наногеля вводят в комбинации с радиотерапией.

В некоторых вариантах осуществления комбинацию связанного продукта слияния и наногеля вводят совместно с клеточной терапией, например клеточной терапией, выбранной из адоптивной клеточной терапии, терапии на основе CAR-T-клеток, терапии на основе модифицированных TCR T-клеток, терапии на основе опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, терапии на основе обученных против антигена Т-клеток, или терапии на основе обогащенных антиген-специфичных Т-клеток.

В рамках вариантов осуществления комбинацию связанных продуктов слияния и наногеля и дополнительный терапевтический агент или процедуру вводят/осуществляют после диагностирования у субъекта рака, например до устранения рака у субъекта. В рамках вариантов осуществления комбинацию связанного продукта слияния и наногеля и дополнительный терапевтический агент или процедуру вводят/осуществляют одновременно или в одно и то же время. Например, доставка одного лекарства осуществляется при доставке второго лекарств, например присутствует накладывание в плане введения лекарств. В других вариантах осуществления комбинацию связанного продукта слияния и наногеля и дополнительный терапевтически агент или процедуру вводят/осуществляют последовательно. Например, доставка одного лекарства завершается перед началом доставки второго лекарства.

В рамках вариантов осуществления дополнительная комбинированная терапия может приводить к боле эффективному лечению, чем комбинация связанного продукта слияния и наногеля или монотерапия с использованием любого агента самостоятельно. В рамках вариантов осуществления дополнительная комбинация является более эффективной (например приводит к большему снижению симптомов и/или раковых клеток), чем комбинация связанного продукта слияния и наногеля или дополнительная комбинация самостоятельно. В рамках вариантов осуществления дополнительная комбинированная терапия обеспечивает возможность применения более низкой дозы связанного продукта слияния, наногеля, и/или дополнительного агента, чем та, которая обычно требуется для достижения аналогичных эффектов при введении в виде монотерапии. В рамках вариантов осуществления дополнительная комбинированная терапия имеет частично аддитивный эффект, полностью аддитивный эффект, или более чем аддитивный эффект.

В одном варианте осуществления комбинацию связанного продукта слияния и наногеля вводят в рамках дополнительной комбинации с терапией, например раковой терапией (например одним или несколькими противораковыми агентами, иммунотерапией, фотодинамической терапией (PDT), хирургией и/или облучением). Термины "химиотерапевтическое средство", "химиотерапевтический агент" и "противораковый агент" используются здесь взаимозаменяемым образом. Введение комбинации связанного продукта слияния и наногеля и терапии, например раковой терапии, может являться последовательным (с/без наложения) или одновременным.

Введение комбинации связанного продукта слияния и наногеля и дополнительного агента может являться непрерывным или прерывающимся в рамках курса терапии (например раковой терапии). Определенные описанные здесь виды терапии могут применяться для лечения рака и нераковых заболеваний. Например, эффективность PDT может быть повышена при раковых и нераковых условиях (например туберкулезе) с использованием описанных здесь способов и композиции (описаны, например, в Agostinis, P. *et al.* (2011) *CA Cancer J. Clin.* 61:250-281).

Виды противоракового лечения

В других вариантах осуществления комбинацию связанного продукта слияния и наногеля вводят в комбинации с химиотерапевтическим агентом с низкой или малой молекулярной массой. Примеры химиотерапевтических агентов с низкой или малой молекулярной массой включают, но без ограничения, 13-цис-ретиноевую кислоту (изотретиноин, ACCUTANE®), 2-CdA (2-хлордезоксиаденозин, кладрибин, LEUSTATIN™), 5-азацитидин (азацитидин, VIDAZA®), 5-фторурацил (5-FU, фторурацил, ADRUCIL®), 6-меркаптопурин (6-MP, меркаптопурин, PURINETHOL®), 6-TG (6-тиогуанин, тиогуанин, THIOGUANINE TABLOID®), абраксан (связанный с белком паклитаксел), актиномицин-D (дактиномицин, COSMEGEN®), алитретиноин (PANRETIN®), полностью трансретиновую кислоту (ATRA, третиноин, VESANOID®), альтретамин (гексаметилмеламин, HMM, HEXALEN®), аметоптерин (метотрексат, метотрексат натрия, MTX, TREXALL™, RHEUMATREX®), амифостин (ETHYOL®), арабинозилцитозин (Ara-C, цитарабин, CYTOSAR-U®), триоксид мышьяка (TRISENOX®), аспарагиназу (L-аспарагиназа Erwinia, L- аспарагиназа, ELSPAR®, KIDROLASE®), BCNU (кармустин, BiCNU®), бендамустин (TREANDA®), бексаротен (TARGRETIN®), блеомицин (BLENOXANE®), бусульфан (BUSULFEX®, MYLERAN®), лейковорин кальция (цитроворум фактор, фолиевая кислота, лейковорин), камптотецин-11 (CPT-11, иринотекан, CAMPTOSAR®), капецитабин (XELODA®), карбоплатин (PARAPLATIN®), кармустин вафер (пролифепроспан 20 с кармустиновым имплантом, GLIADEL® вафер), CCI-779 (темсиролимус, TORISEL®), CCNU (ломустин, CeeNU), CDDP (цисплатин, PLATINOL®, PLATINOL-AQ®), хлорамбуцил (лейкеран), циклофосфамид (CYTOXAN®, NEOSAR®), дакарбазин (DIC, DTIC, имидазолкарбоксамид, DTIC-DOME®), дауномицин (даунорубицин, гидрохлорид даунорубицина, гидрохлорид рубидомицина, CERUBIDINE®), децитабин (DACOGEN®), дексразоксан (ZINECARD®), DHAD (митоксантрон, NOVANTRONE®), доцетаксел (TAXOTERE®), доксорубицин (ADRIAMYCIN®, RUBEX®), эпирубицин (ELLENCE™), эстрамустин (EMCYT®), этопозид (VP-16, этопозидфосфат, TOPOSAR®, VEPESID®, ETOPOPHOS®), флоксуридин (FUDR®), флударабин (FLUDARA®), фторурацил (крем) (CARAC™, EFUDEX®, FLUOROPLEX®), гемцитабин (GEMZAR®), гидроксимочевину (HYDREA®, DROXIA™, MYLOCEL™), идарубицин (IDAMYCIN®), ифосфамид (IFEX®), иксабепилон (IXEMPRA™), LCR (лейрокристин, винкристин, VCR, ONCOVIN®, VINCASAR PFS®), L-PAM (L-сарколзин, мелфалан, фенилаланиновый иприт, ALKERAN®), мехлорэтамин (гидрохлорид мехлорэтамина, мустин,

азотистый иприт, MUSTARGEN®), месна (MESNEX™), митомицин (митомицин-С, MTC, MUTAMYCIN®), неларабин (ARRANON®), оксалиплатин (ELOXATIN™), паклитаксел (TAXOL®, ONXAL™), пегаспаргазу (PEG-L-аспарагиназа, ONCOSPAR®), PEMETREXED (ALIMTA®), пентостатин (NIPENT®), прокарбазин (MATULANE®), стрептозоцин (ZANOSAR®), темозоломид (TEMODAR®), тенипозид (VM-26, VUMON®), TESPA (тиофосфамид, тиотепа, TSPA, THIOPLEX®), топотекан (HYCAMTIN®), винбластин (сульфат винбластина, винкалейкобластин, VLB, ALKABAN-AQ®, VELBAN®), винорелбин (тартрат винорелбина, NAVELBINE®), и вориностат (ZOLINZA®).

В другом варианте осуществления комбинацию связанного продукта слияния и наногеля вводят совместно с биологическим препаратом. Примеры биологических препаратов включают, например, HERCEPTIN® (трастузумаб); FASLODEX® (фулвестрант); ARIMIDEX® (анастрозол); Aromasin® (экземестан); FEMARA® (летрозол); NOLVADEX® (тамоксифен),AVASTIN® (бевацизумаб); и ZEVALIN® (ибритумомаб тиуксетан).

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение Т-клеток для ACT

Т-клетки выделяли из здоровых доноров. Клетки Leucopak возрастом один день (Biospecialties Inc.) разбавляли 1:1 об. DPBS и наносили на подушку высокой плотности (Lymphoprep, Stemcell Tech.) в 50 мл пробирке (35 мл разбавленных Leucopak на 15 мл Lymphoprep). После 30 минут центрифугирования при 800 г мононуклеарные клетки собирали в области контакта между Lymphoprep и DPBS. Клетки промывали в 50 мл DPBS 3 раза для удаления остаточного Lymphoprep и клеточных включений. Т-клетки выделяли с помощью последовательного сортинга с использованием магнитных шариков с помощью конъюгированных с антителами против CD3 (или CD8) и CD56 шариков (Miltenyi), соответственно, согласно инструкциям производителя. Кратко, колонки LS уравновешивали 3 мл ледяного DPBS одновременно с инкубированием конъюгированных с антителами шариков с мононуклеарными клетками (30 минут при +4°C). После внесения клеток в колонку осуществляли 3 промывания 3 мл ледяного DPBS и вымывали клетки из колонки с помощью 5 мл ледяного DPBS.

После выделения Т-клетки оставляли в полной среде (CM-T): IMDM (Lonza), Glutamaxx (Life Tech), 20% FBS (Life Tech), 2,5 мкг/мл альбумина человека (Octapharma), 0,5 мкг/мл инозитола (Sigma) с добавлением 20 нг/мл интерлейкина-2 (IL-2) в течение, по меньшей мере, 2 часов.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки праймируют для повышения или оптимизации Т-клеточной активации. Как показано на **Фиг.14B**, предварительная обработка IL-21 демонстрировала наиболее высокое повышение эффективности ACT и далее IL-2/IL-7 и IL-7.

Получение APC In Vitro

Антиген-презентирующие клетки (APC), например дендритные клетки (DC) могут быть

получены in vitro с помощью описанных здесь способов, а также описанных в PCT публикации WO2020/055931, полностью приведенной здесь в качестве примера. Во-первых, moDC могут быть получены in vitro из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Высевание PBMC в емкость для тканевой культуры обеспечивает устойчивость моноцитов. Обработка данных моноцитов интерлейкином-4 (IL-4) и колониестимулирующим фактором гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF) приводит к дифференцированию в iDC. Последующая обработка фактором некроза опухоли (TNF), IL6, IL1B, и PGE2 далее обеспечивает дифференцирование iDC в mDC.

Моноциты, iDC и клетки до превращения в зрелые DC могут быть приведены в контакт с предварительно выбранными антигенами для презентирование на их поверхности. Это может быть осуществлено in vitro с помощью, в некоторых вариантах осуществления, описанного здесь процесса предварительной загрузки. В соответствии с используемым здесь значением термин "предварительная загрузка" обозначает процесс, в рамках которого моноциты и/или незрелые DC индуцируются для интернализации и протеолитического процессирования пептида в более короткие фрагменты перед загрузкой на главный комплекс гистосовместимости (MHC) I и MHC II. Без связи с теорией, считается, что большинство пептидов, загруженных с помощью процесса предварительной загрузки, являются 8-11-мерными (по сравнению со стандартными исходными 15-мерными пептидами). С другой стороны, стандартный процесс включает загрузку TAA пептидов на ранее подвергнутую созреванию DC и представляет собой внеклеточный способ, который предусматривает кратковременную (обычно в течение 1-3 часов) обработку DC пептидом с целью загрузки пептидов непосредственно на MHC I and MHC II с их исходной длиной без внутриклеточного процессирования. Это различие в плане размера между пептидами, загруженными с помощью предварительной загрузки и стандартного процесса, является значимым, поскольку пептиды, которые присутствуют в опухолевом MHC I в основном являются короче 15-мерных (обычно 8-10-мерными). Таким образом, CD8+ CTL, которые подвергаются тренировке с помощью стандартного (то есть предусматривающего внеклеточную загрузку) способа с использованием 15-мерных пептидов, как ожидается, не могут связываться с опухолевым пептидом:MHC вследствие свойственных биофизических различий между загрузкой коротких (8-10-мерных) и длинных (15-мерных) пептидов. В рамках предварительной загрузки используется внутриклеточное процессирование пептидов для презентирования пептидов, которые являются специфическими в отношении аллеля MHC I и, таким образом, могут приводить к более устойчивому стимулированию физиологически релевантного репертуара CTL, которые могут связываться с опухолевым пептидом:MHC лучшим образом и с более высокой эффективностью. Более того, при использовании предварительной загрузки клетки могут "кастомизировать" пептид за счет протеолиза (что может являться различным у различных пациентов), так что наиболее биологически предпочтительные пептиды загружаются независимо от аллеля MHC. В рамках различных вариантов осуществления здесь предусмотрена комбинированная композиция (смесь стандартно загруженных и предварительно загруженных DC) и способы ее получения и применения.

В некоторых вариантах осуществления способ получения APC по настоящему изобретению может включать следующие этапы (Фиг.24):

получение множества моноцитов;

культивирование первой аликвоты моноцитов в первой культуральной среде, включающей цитокины (например IL-4 и GMCSF), тем самым индуцируя дифференцирование, по меньшей мере, части первой аликвоты моноцитов в зрелые дендритные клетки (DC);

доставку в моноциты и/или незрелые DC множества пептидов (например 15-мерных), полученных на основе одного или нескольких опухоль-ассоциированных антигенов (TAA) ("TAA пептидов"), например путем инкубирования с TAA пептидами, цельным TAA белком, или с помощью доставки на основе конъюгированных с пептидами липосом;

продолжение культивирование моноцитов и/или незрелых DC в первом множестве зрелых DC, которые презентируют на своей поверхности 6-15-мерные пептидные антигены, предпочтительно 8-11-мерные пептидные антигены;

культивирование второй аликвоты моноцитов и/или множества незрелых DC во второй культуральной среде, тем самым индуцируя дифференцирование в зрелые DC;

загрузку на зрелые DC множества TAA пептидов, тем самым обеспечивая получение второго множества зрелых DC, которые презентируют на своей поверхности TAA пептиды (например 15-мерные пептиды); и

комбинирование первого множества зрелых DC и второго множества зрелых DC при соотношении приблизительно от 10:1 до 1:10 (например приблизительно от 5:1 до 1:5, или приблизительно 1:1), тем самым обеспечивая получение APC, подходящих для последующего использования (например тренировки Т-клеток).

В некоторых вариантах осуществления моноциты могут быть получены путем вымывания PBMC с получением, по меньшей мере, богатой лимфоцитами фракции и богатой моноцитами фракции, при этом PBMC предпочтительно получены от пациента с раком, нуждающегося в клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления пептиды могут включать полноразмерные TAA и/или фрагменты TAA. Пептиды могут представлять собой библиотеку пептидов, полученных или относящихся к различным TAA. Они могут иметь длину 8-15 аминокислот (являться 8-15-мерными). TAA могут быть, например, выбраны из PRAME, SSX2, NY-ESO-1, сурвивина и WT-1. В определенных вариантах осуществления TAA получены от пациента с раком, нуждающегося в лечении. В определенных вариантах осуществления TAA могут включать вирусные опухолевые антигены для ВПЧ$^{+}$ рака головы и шеи и/или рака шейки матки.

Полученные APC могут демонстрировать на своей клеточной поверхности 8-10-мерные антигены, презентируемые главным комплексом гистосовместимости (MHC) I, при этом 8-10-мерные антигены создаются из антигенов и/или пептидов, которые протеолитически процессируются моноцитами и/или iDC из пептидов.

Получение MTC In Vitro

В различных вариантах осуществления APC, полученные в соответствии с описанными здесь способами, могут применяться для экспансии Т-клеток с несколькими мишенями (MTC) in vitro. Это может быть осуществлено путем, например, совместного культивирования богатой лимфоцитами фракции PBMC с APC (например при соотношении от приблизительно 40:1 до приблизительно 1:1) для экспансии MTC, которые являются реактивными в отношении TAA пептидов. Подобное совместное культивирование может осуществляться в присутствии одного или нескольких из IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15 и IL-21. В некоторых вариантах осуществления совместное культивирование может осуществляться в присутствии IL-15, IL-12 и необязательно одного или нескольких из IL-2, IL-21, IL-7 и IL-6. Является преимуществом то, что при применении описанных здесь способов и композиции общее время процессирования из PBMC в MTC может быть сокращено до 10-20 дней, в то время как стандартные способы обычно требуют, по меньшей мере, 20 дней (см., например, Putz et al., Methods Mol Med. 2005;109:71-82, который полностью приведен здесь в качестве ссылки). Полученные MTC могут использоваться в рамках различных видов терапии на основе Т-клеток, как далее описано здесь.

Молекулы цитокинов

Подвергнуты экспансии MTC могут быть нагружены кластерами поперечно связанных терапевтических белковых мономеров (например наногелями) для обеспечения дополнительных терапевтических преимуществ. Примеры терапевтических белковых мономеров включают, без ограничения, антитела (например IgG, Fab, смешанные Fc и Fab), одноцепочечные антитела, фрагменты антител, модифицированные белки, такие как продукты слияния Fc, ферменты, кофакторы, рецепторы, лиганды, факторы транскрипции и другие регуляторные факторы, цитокины, хемокины, альбумин сыворотки человека и им подобные. Данные белки могут являться или не являться встречающимися в природе. Другие белки также охватываются и могут применяться в рамках изобретения. Любой из данных белков может быть обратимо модифицирован с помощью поперечного связывания с образованием кластера или структуры в виде наногеля, как описано, например, в публикации заявки на патент США 2017/0080104, патенте США 9603944, публикации заявки на патент США 2014/0081012, и PCT заявке PCT/US17/37249, поданной 13 июня 2017, и предварительной заявки на патент США 62/657218, поданной 13 апреля 2018 г., все из которых приведены здесь в качестве ссылки. Нагруженные клетки могут иметь множество вариантов терапевтического применения. Например, нагруженные MTC могут использоваться в рамках терапии на основе Т-клеток, включая адоптивную клеточную терапию.

Терапевтические белковые мономеры могут включать одну или несколько цитокиновых молекул. В рамках вариантов осуществления цитокиновая молекула представляет собой полноразмерную молекулу, фрагмент или вариант цитокина, например цитокина, включающего одну или несколько мутаций. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула

включает цитокин, выбранный из интерлейкина-1 альфа (IL-1 альфа), интерлейкина-1 бета (IL-1 бета), интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-5 (IL-5), интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-7 (IL-7), интерлейкина-12 (IL-12), интерлейкина-15 (IL-15), интерлейкина-17 (IL-17), интерлейкина-18 (IL-18), интерлейкина-21 (IL-21), интерлейкина-23 (IL-23), интерферона (IFN) альфа, IFN бета, IFN гамма, некроза опухоли альфа, GM-CSF, GCSF, или их фрагмента или варианта, или комбинацию из любых вышеуказанных цитокинов. В других вариантах осуществления цитокиновая молекула выбрана из интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-7 (IL-7), интерлейкина-12 (IL-12), интерлейкина-15 (IL-15), интерлейкина-18 (IL-18), интерлейкина-21 (IL-21), интерлейкина-23 (IL-23) или интерферона гамма, или их фрагмента или варианта, или комбинации из любых вышеуказанных цитокинов. Цитокиновая молекула может представлять собой мономер или димер.

В рамках вариантов осуществления цитокиновая молекула также включает рецепторный домен, например цитокиновый рецепторный домен. В одном варианте осуществления цитокиновая молекула включает рецептор IL-15 или его фрагмент (например внеклеточный IL-15 домен связывания IL-15 рецептора альфа), как описано здесь. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула представляет собой молекулу IL-15, например IL-15 или суперагонист IL-15, как описано здесь. В соответствии с используемым здесь значением, форма в виде "суперагониста" молекулы цитокина демонстрирует повышенную активность, например, по меньшей мере, на 10%, 20%, 30% более высокую по сравнению со встречающимся в природе цитокином. Примером суперагониста является IL-15 SA. В некоторых вариантах осуществления IL-15 SA включает комплекс IL-15 и связывающего фрагмента IL-15 рецептора IL-15, например рецептор альфа IL-15 или его связывающий IL-15 фрагмент.

В других вариантах осуществления цитокиновая молекула также включает молекулу антитела, например Fab и scFv фрагмент иммуноглобулина, Fab фрагмент, FAB2 фрагмент, или фрагмент или производное антитела, например фрагмент sdAb (нанотело), фрагмент антитела с тяжелой цепью, например Fc-участок, однодоменное антитело, биспецифичное антитело или мультиспецифичное антитело). В одном варианте осуществления цитокиновая молекула также включает Fc или Fab иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления цитокиновая молекула представляет собой молекулу IL-2, например IL-2 или IL-2-Fc. В других вариантах осуществления в рамках описанных здесь способов и композиций может применяться агонист цитокина. В рамках вариантов осуществления агонист цитокина представляет собой агонист цитокинового рецептора, например молекулу антитела (например агонистное антитело) для цитокинового рецептора, которая обеспечивает, по меньшей мере, один вид активности встречающегося в природе цитокина. В рамках вариантов осуществления агонист цитокина представляет собой цитокиновый рецептор, например молекулу антитела (например агонистное антитело) для цитокинового рецептора, выбранную из IL-15Ra или IL-21R.

Для идентификации МТС, являющихся реактивными в отношении более мелких

процессированных пептидов в рамках продукта, собранные МТС инкубировали с полученными из коммерческого источника HLA-A*02:01, конъюгированными с флуорофором тетрамерами, загруженными 9-мерными и 10-мерными пептидами на основе PRAME. МТС, несущие TCR, являющийся реактивным в отношении загруженных 9-мерными и 10-мерными пептидами тетрамеров идентифицируют с помощью проточной цитометрии на основе окрашивания тетрамеров (Фиг.25). Тетрамер $MART1_{26-35(27L)}$ используется в качестве отрицательного контроля для неспецифического связывания с тетрамером. Исследование показывает, что клоны, являющиеся реактивными в отношении иммунологически значимого 9-мерного и 10-мерного пептида, могут быть выделены с помощью стандартных имеющих высокое разнообразие пулов пептидов.

Пример 2: Примеры иммуностимулирующих слитых белков, включающих IL-12

Для анализа потенциала слитых молекул IL-12 и нацеленного на иммунную клетку антитела в плане повышения биологической активности IL-12, конструировали IFM, включающую IL-12 и моноклональные антитела, которая нацелена на присутствующий в большом количестве на поверхности иммунных клеток рецептор CD45 человека (Cyster et al., EMBO Journal, Vol 10, no4, 893-902, 1991). Примеры связанных продуктов слияния IL-12 (IL12-TF) изображены на Фиг.2A-2D. IL12-TF для применения в рамках как клеток человека, так и клеток мыши, были сконструированы с помощью IL-12 человека или мыши и фрагментов антител, специфических в отношении CD45 человека или мыши. IL12-TF chM1Fab-sc-IL12p70 включает Fab против CD45 мыши, слитый с одноцепочечным IL-12p70 мыши (Фиг.2A). Одноцепочечный IL-12p70 мыши включает генетический продукт слияния между IL-12A и IL-12B мыши. Другой IL12-TF для применения в рамках клеток мыши, chM1Fab-M1scFv-scIL-12p70, включает продукт слияния фрагментов антител в виде Fab-scFv Fab против CD45 мыши и scFv и одноцепочечного IL-12p70 мыши (Фиг.2B). Также были сконструированы соответствующие IL12-TF для применения с клетками человека: h9.4Fab-scIL-12p70 (Фиг.2C) и h9.4Fab-h9.4scFv-scIL-12p70 (Фиг.2D) включают Fab или продукт слияния Fab-scFv, являющийся специфичным в отношении CD45 человека и одноцепочечного IL-12p70 человека. Соответствующие субъединицы IL-12p70 IL-12A и IL-12B для всех четырех конструктов экспрессируются в виде одноцепочечной молекулы с ориентаций IL-12B-IL-12A, однако также возможна обратная ориентация экспрессии (например IL-12A-IL-12B). Являются возможными множественные различные гибкие линкеры, соединяющие субъединицы IL-12A и IL-12B. IL-12p70 также может быть экспрессирован в виде гетеродимера IL-12A и IL-12B, который представляет собой природную форму белка. Различные описанные здесь линкеры могут применяться для функционального связывания антитела против CD45 и IL-12 для добавления пространства между ними.

Пример 3: Опосредованное антителом связывание IL-12 с CD45 обеспечивает клеточную

загрузку IL-12 и пролонгированную поверхностную устойчивость

Была проанализирована способность IL12-TF обеспечивать загрузку IL-12 на Т-клетки. Кратко, общие CD3 Т-клетки человека были активированы с использованием CD3/CD28 Dynabeads® в течение трех дней. Шарики удаляли и клетки инкубировали с IL-2 в течение 1 дня перед инкубированием с пульсацией с h9.4Fab-scIL-12p70, разбавленным в полной среде (RPMI 1640 с 10% FBS). Клетки инкубировали в биологическом дубликате с полной средой (контрольное условие) или h9.4Fab-scIL-12p70 в течение 1ч при 37 °C и затем промывали три раза полной средой (RPMI 1640 с 10% FBS) для удаления несвязанного IL12-TF. Затем клетки высевали в полную среду при плотности клеток приблизительно 200000 клеток/мл и инкубировали при 37 °C, 5% CO_2. Связанный на поверхности IL-12 детектировали с помощью проточной цитометрии путем иммуноокрашивания с использованием поликлонального антитела против IgG человека. Клетки подсчитывали с помощью шариков для подсчета клеток CountBright Absolute с использованием проточной цитометрии. В каждом случае клетки анализировали на FACSCelesta с использованием программного обеспечения Diva; данные анализировали с помощью Cytobank.

Как показано на Фиг.3, инкубирование с пульсацией IL-12, слитого с антителом против CD45, обеспечивает не только значительную загрузку и пролонгированную устойчивость IL-12 на поверхности Т-клеток, но также значительную экспансию Т-клеток.

Пример 4: Активация фосфорилирования STAT4 в ненагруженных клетках-мишенях с помощью связанного продукта слияния IL-12

Связанный продукт слияния может активировать как нагруженные клетки, так и ненагруженные клетки-мишени (Фиг.4А). Таким образом, затем связанный продукт слияния IL-12 анализировали на предмет его способности обеспечивать активность в Т-клетках человека cis/аутокринным, trans, и паракринным образом. Кратко, фосфорилирование STAT4 измеряли в рамках трех отдельных анализов через один день после инкубирования с пульсацией с использованием связанного продукта слияния IL-12 (h9.4Fab-scIL-12p70) для определения cis, trans, и паракринной активности. Все CD3 Т-клетки были активированы, как описано здесь. Активированные Т-клетки человека инкубировали с IL12-TF (h9.4Fab-scIL-12p70) в течение 1 ч при 37 °C, несвязанный связанный продукт слияния удаляли путем промывания и высевали клетки с плотностью 4E5 клеток/мл и инкубировали в течение ночи при 37 °C и 5% CO_2. Незагруженные клетки размножали в полной среде в течение дополнительного дня при отсутствии цитокина и использовали на следующий день в качестве клеток-мишеней для trans и паракринных анализов. Для cis-презентирования/аутокринной активности клетки фиксировали, пермеабилизировали и подвергали иммунному окрашиваю на предмет фосфорилирования STAT4, как описано здесь. Для оценки trans-презентирования не нагруженные IL12-TF клетки-мишени метили с помощью красителя CellTrace Far Red (ThermoFisher) для обеспечения дифференцирования от нагруженных IL12-TF клеток с помощью проточной цитометрии. Нагруженные IL12-TF клетки смешивали с флуоресцентно помеченными ненагруженными

клетками, образовывали сгусток и инкубировали вместе в течение 30 минут. Затем клетки фиксировали, пермеабилизировали и подвергали иммунному окрашиваю на предмет фосфорилирования STAT4. Для анализа паракринного переноса кондиционированную среду от нагруженных IL12-TF клеток выделяли на следующий день после инкубирования с пульсацией и переносили в ненагруженные клетки, инкубировали в течение 30 минут и затем фиксировали, пермеабилизировали и подвергали иммунному окрашиваю на предмет фосфорилирования STAT4. Во всех анализах клетки анализировали на FACSCelesta проточном цитометре с использованием программного обеспечения Diva; данные анализировали с помощью Cytobank. В рамках всех анализов IL12-TF индуцировал фосфорилирование STAT4, превышающее фон "контрольных" подвергаемых пульсации клеток, которые подвергались пульсации с использованием среды, которая не содержала связанного продукта слияния (Фиг.4B). Было отмечено, что IL-15 повышает активность IL-12, и, как показано выше, комбинации связанных продуктов слияния IL-15 и IL-12 могут повышать фосфорилирование STAT4; таким образом, также было проанализировано фосфорилирование STAT4 для комбинированного инкубирования с пульсацией со связанными продуктами слияния IL-12 (h9.4Fab-scIL-12p70) и IL-15 (h9.4Fab-IL-15/sushi) в рамках трех описанных здесь анализов. В то время как связанный продукт слияния IL-15 не индуцировал сильного фосфорилирования STAT4 самостоятельно, фосфорилирование STAT4 было повышено за счет комбинации связанных продуктов слияния IL-12 и IL-15 в рамках анализов cis и переноса, как показано на Фиг.4B.

Клетки Pmell, несущие IL12-TF мыши, демонстрируют признаки активность в отношении эндогенной иммунной системы. Они индуцируют транзиентную лимфопению перенесенных и эндогенных иммунных клеток, включая CD8 Т-клетки и NK-клетки (Фиг.5B). За этим следует пролиферация (определенная на основе положительной реакции в плане Ki67) и дифференциация эндогенных CD8 Т-клеток (Фиг.5C). Дальнейшее разделение эндогенных CD8 Т-клеток выявило, что подвергаемые пролиферации клетки практически исключительно относятся к популяции подвергнутых действию антигена эндогенным CD8 Т-клеткам (на основе проточной цитометрии популяции являются отрицательными как в отношении конгенного маркера CD90.1 Т-клеток Pmel, так и двойными положительными в отношении CD8 и CD44), что свидетельствует о том, что присутствие IL12-TF активирует определенный компартмент эндогенной иммунной системы (Фиг.5D). Транзиентная лимфопения эндогенных NK-клеток, показанная на Фиг.5B, сменяется их повышенной пролиферацией (на основе положительной реакции в плане Ki67) и активацией (на основе положительной реакции в плане CD69), как показано на Фиг.5E. В качестве заключения следует отметить, что опухоль-специфические Т-клетки, несущие IL12-TF, имеют потенциал как в плане совершенствования ACT для лечения рака, так и праймирования эндогенной иммунной системы.

Пример 5: IL12-TF обеспечивает совершенствование терапии на основе опухоль-специфических Т-клеток при предварительной загрузке на адоптивно перенесенные Т-

клетки или при совместном введении в виде раствора

Связанный с поверхностью IL-12 анализировали на способность обеспечивать совершенствование адоптивной клеточной терапии (ACT) для лечения рака. Кратко, C57BL/6J мышам внутрикожно инокулировали 400000 клеток меланомы B16-F10. За один день до проведения адоптивной клеточной терапии с использованием опухоль-специфических Т-клеток (9 дней перед инокулированием B16-F10 клеток) имеющих опухоли мышей подвергали лечению 4 мг циклофосфамида. Отдельным образом CD8 Т-клетки выделяли из Pmel-1 мышей, которые экспрессируют Т-клеточный рецептор, являющийся специфичным для антигена gp100 в клетках меланомы B16-F10, и активировали и подвергали экспансии, как описано здесь для Т-клеток. Затем клетки собирали для ACT и инкубировали со связанным продуктом слияния IL-12 (chM1Fab-scIL-12p70) при концентрации 125 нМ. Несвязанный связанный продукт слияния удаляли с помощью промывания, клетки ресуспендировали в HBSS и затем адоптивно переносили Т-клетки Pmel CD8 (3E6 клеток/мышь) с помощью внутривенной (в/в) инъекции в имеющих B16-F10 опухоль мышей. В качестве контролей, мышей также подвергали лечению HBSS, Т-клетками Pmel CD8 самостоятельно, или Т-клетками Pmel CD8 и далее одной дозой растворимого IL-12p70 (при уровнях дозировки 10, 50, или 250 нг, которые соответствуют 0,143, 0,715, и 3,575 пмоль IL-12p70) или связанным продуктом слияния растворимого IL-12 (0,143, 0,715, или 3,575 пмоль связанного продукта слияния), который вводили внутривенно при всех условиях. Без связи с теорией, на основе приведенных здесь предварительных вычислений наиболее высокая протестированная дозировка соответствует более чем 100-кратной дозировке связанного с поверхностью IL-12.

Как показано на Фиг.6, как предварительно загруженные, так и одновременно вводимые в виде раствора связанные продукты слияния IL-12 значительно ингибировали рост опухолей и обеспечивали пролонгированную выживаемость. В каждом случае связанные продукты слияния более сильным образом ингибировали рост опухолей и пролонгированную выживаемость, чем одновременное введение свободного IL-12. Наблюдалась минимальная явная токсичность в форме потери массы тела. Для ясности данные приведены на двух отдельных фигурах; во втором наборе фигур HBSS, только Pmel, и несущие IL12-TF Pmel группы повторно показаны для сравнения. Кинетические показатели роста опухолей показаны для первых 35 дней после ACT и до смерти двух мышей в группе.

Пример 6: IL12-TF кандидат обеспечивает дополнительный улучшенный контроль опухоли при использовании нескольких доз клеток

Большинство видов клеточной терапии требуют курсов предварительного кондиционирования, включающих миелоаблативную химиотерапию перед ACT для устойчивых противоопухолевых ответов. Однако данный подход имеет ограничения, включая невозможность вводить несколько дозировок клеток вследствие рисков истощения активности ранее введенных клеток за счет последующих раундов химиотерапии для предварительного кондиционирования.

Как было показано ранее, IL12-TF имеет потенциал в плане усовершенствования терапии на основе опухоль-специфических Т-клеток при отсутствии предварительного кондиционирования в рамках модели солидной опухоли. Далее оценивали способность IL12-TF обеспечивать дальнейшее усовершенствование противоопухолевого контроля за счет применения нескольких доз клеток. Кратко, C57BL/6J мышам внутрикожно инокулировали 400000 клеток меланомы B16-F10. Отдельным образом CD8 Т-клетки от Pmel мышей выделяли, активировали, подвергали экспансии и нагружали IL12-TF (chM1Fab-scIL-12p70), как описано здесь. Спустя девять дней после инокулирования опухоли мышей подвергали лечению Т-клетками Pmel CD8 с помощью в/в инъекции. Лимфодеплецию циклофосфамидом использовали за один день до первой дозы клеток; вторую дозу клеток давали спустя14 дней после первой дозы при отсутствии дополнительной лимфодеплеции. Дополнительно оценивали способность альтернативной конфигурации IL12-TF (chM1Fab-M1scFv-scIL-12p70) обеспечивать повышение эффективности одной дозы терапии на основе опухоль-специфических клеток. Оба вида IL12-TF (chM1Fab-scIL-12p70 и chM1Fab-M1scFv-scIL-12p70) обеспечивали повышение ингибирование роста опухолей и выживаемости при одной дозе клеток, нагруженных *ex vivo* связанными продуктами слияния (Фиг.7A). Несколько доз опухоль-специфических Т-клеток, нагруженных *ex vivo* chM1Fab-scIL-12p70, но не несколько доз опухоль-специфических Т-клеток самостоятельно, обеспечивали дополнительное повышение противоопухолевой выживаемости (Фиг.7B).

IL12-TF повышали как пиковую экспансию Pmel Т-клеток в крови, так и их долговременную устойчивость (Фиг.7C). Какие-либо признаки явной токсичности в форме потери массы тела не наблюдались (Фиг.7D). Любая наблюдаемая потеря массы тела была в основном связана с лимфодеплецией циклофосфамидом: мыши теряли приблизительно 10% массы тела в каждой подвергаемой лечению группе (Фиг.7D), в то время как в предыдущем примере, который выполняли при отсутствии лимфодеплеции, наблюдали потерю менее чем 5% массы тела во всех подвергаемых лечению группах (Фиг.5A). Кроме того, наблюдались умеренные уровни системного IFN-γ (Фиг.8) и CXCL10 (Фиг.9) в плазме спустя один день после ACT с использованием Pmel, несущих IL12-TF; уровни в крови вернулись к базовому показателю в течение четырех дней после адоптивного переноса клеток (Фиг.8-9).

В целом, здесь показано несколько конфигураций опосредованного антителами связывания цитокинов, которое обеспечивает высокую загрузку и устойчивость IL-12 на поверхности Т-клеток. Более того, связанный на поверхности IL-12 по существу повышает эффективность адоптивно перенесенных опухоль-специфических Т-клеток в рамках модели на основе агрессивной солидной опухоли, включая повышенный контроль опухоли и выживаемость, чем >100-кратный молярный уровень системно вводимого IL-12. Эффективность опухоль-специфических Т-клеток, нагруженных IL12-TF при отсутствии лимфодеплеции, обеспечивал дальнейшее повышение эффективности при введении нескольких доз клеток.

Связанный с поверхностью IL-12 также обеспечивает активацию эндогенной иммунной системы, включая повышенную пролиферацию знакомых с антигеном CD8Т-клеток, при

отсутствии явной токсичности в виде потери массы тела и устойчивого системного высвобождения цитокинов.

В качестве заключения, связанные с клеточной поверхностью иммуностимулирующие цитокины представляют собой мощный подход для повышения эффективности клеточной терапии рака, включая солидные опухоли. Данный подход не требует генетического модифицирования и может быть легко встроен в виды клеточной терапии, которые являются предметом клинических исследований в настоящее время, например основанные на CAR-T, TCR-T, опухоль-ассоциированных антиген-специфичных Т-клетках, и NK-клетках.

Пример 7: Платформа на основе связанного продукта слияния обеспечивает нацеливание на специфические клетки *in vivo*

После определения способности в плане *in vitro* селективной загрузки CD8 Т-клеток с использованием нацеленных на CD8 связанных продуктов слияния IL-7 или IL-15 (см. Примеры выше), тестировали селективное нацеливание на CD8 Т-клетки in vivo с использованием нацеленной на CD8 IL-15 IFM. На основе предыдущих наблюдений в плане Т-клеток человека, демонстрирующих повышенную аффинность в отношении CD8 с использованием двухвалентного конструкта Fab-scFv (Фиг.17D-Фиг.17F), получали вариант IL-15, нацеленный на CD8 мыши, включающий аналогичную конфигурацию антитела Fab-scFv (chY169Fab-M1scFv-IL15/sushi). Нацеленный на CD8 Fab сконструирован для обеспечения специфичности, в то время как нацеленный на CD45 scFv повышает устойчивость на клетке-мишени.

В первом эксперименте, описанном в данном примере, было протестировано, может ли внутривенно введенный связанный продукт слияния специфично нацеливаться на CD8 Т-клетки мыши *in vivo*. Двум C57BL/6J мышам в каждой группе инъецировали chY169Fab-M1scFv-IL15/sushi (2 мкг/мышь), chM1Fab-IL15/sushi (нацеленная на CD45 IFM, 2 мкг/мышь), или индифферентный контроль в виде PBS. Спустя один час после инъекции собирали кровь и анализировали связывание на поверхности клетки связанного продукта слияния с помощью проточной цитометрии. Красные кровяные клетки лизировали, а оставшиеся клетки окрашивали флуоресцентно конъюгированными антителами против каппа и IL-15 для детектирования связанного продукта слияния. Дополнительно включали антитела, являющиеся специфическими в отношении CD4, CD8, NK1.1, и CD45 мыши, для обеспечения возможности проведения анализа подмножеств иммунных клеток. Связывание с поверхностью связанного продукта слияния было определено на основе положительной реакции в отношении как каппа, так и IL-15. Как подвергнутые действию индифферентного контроля, так и подвергнутые действию chM1Fab-IL15/sushi животные имели минимальное количество положительно окрашенных клеток (3,5-3,9/мкл), в то время как подвергнутые действию chY169Fab-M1scFv-IL15/sushi животные имели более чем в 10 раз более высокую концентрацию положительных в отношении связанного продукта слияния клеток в крови (Фиг.10A). Гистограмма на Фиг.10A показывает значительный сдвиг в плане флуоресценции у подвергнутых действию chM1Fab-IL15/sushi животных; однако

явная TF-положительная популяция отсутствовала. Поскольку CD45 встречается на всех иммунных клетках, является вероятным, что присутствовало специфическое связывание, но сигнал связанного продукта слияния был распределен по гораздо большему количеству клеток. Для мышей, подвергнутых действию нацеленного на CD8 IL-15 (chY169Fab-M1scFv-IL15/sushi), в то время как только малая процентная доля всех клеток была положительной в отношении связанного продукта слияния (1,73%), большинство CD8 Т-клеток было положительными (Фиг.10B). Более того, ни одно из других проанализированных подмножеств (CD4 Т-клетки, NK-клетки) не демонстрировало TF-окрашивания. Совместно эти данные демонстрируют специфическое имеющее высокий окрашивание CD8 клеток связанным продуктом слияния chY169Fab-M1scFv-IL15/sushi и неспецифическое имеющее низкий уровень нацеливание на основе специфического в отношении CD45 связанного продукта слияния chM1Fab-IL15/sushi.

В рамках второго эксперимента оценивали влияние одной дозы (от 2 до 10 мкг) нацеленных на CD45 или CD8 IL-15 IFM на уровень иммунных клеток в крови. Был включен не являющийся мишенью конструкт IL-15/sushi-Fc и нацеленный на CD8 вариант IL-15, включающий мутации D61H и E64H (chY169Fab-M1scFv-IL15-DHEH/sushi; см. подробное описание данных мутаций в Примерах выше). Кровь собирали в День 3 после инъекции, красные кровяные клетки лизировали, а оставшиеся клетки окрашивали флуоресцентно конъюгированными антителами, направленными против CD45, CD4, CD8 и NK1.1. К Дню 3 после инъекции присутствовали минимальные изменения в плане количества CD4 Т-клеток для любого из форматов связанного продукта слияния или концентраций (Фиг.10C). С другой стороны, количества CD8 повышены в рамках всех форматов связанного продукта слияния и концентраций в от 3,4- до 13,6-кратном диапазоне. Эффекты нацеленных на CD45 и CD8 связанных продуктов слияния были аналогичны клеткам CD8 и были повышены по сравнению с ненацеленным IL15/sushi-Fc. В соответствии с его сниженной биологической активностью, DHEH мутант обеспечивал меньшую экспансию CD8, чем IFM с IL-15 дикого типа. В то время как повышение экспансии Т клеток CD8 для нацеленного на CD8 связанного продукта слияния отсутствовало по сравнению с CD45, присутствовали пониженные нецелевые эффекты в плане NK-клеток (при измерении с помощью количественного анализа NK1.1+ клеток в крови). NK-клетки также являлись высокочувствительными к IL-15, при этом их количество сильно повышалось за счет IL-15/sushi-Fc и пан-CD45-нацеленного связанного продукта слияния chM1Fab-IL15/sushi (6-13-кратная экспансия по сравнению с подвергнутой действию HBSS группой). С другой стороны, нацеленный на CD8 chY169Fab-M1scFv-IL15/sushi приводит лишь к умеренному повышению (3-5-кратному) в плане количества NK-клеток. Нецелевые эффекты DHEH мутанта на NK-клетки являлись еще более слабо выраженными в виде лишь 1,5-3-кратной экспансии по сравнению с индифферентным контролем. Данные эффекты могут быть наиболее явно отмечены на основе сравнения соотношения CD8 Т-клеток и NK-клеток (Фиг.10D). Ненацеленный IL15/sushi по существу снижает соотношение CD8 Т-клеток и NK-клеток, что свидетельствует о том, что без нацеливания NK-специфическая активность является более предпочтительной. В то время как

пан-CD45-нацеленный связанный продукт слияния значительно повышает количество CD8 Т-клеток, он имел сопоставимые эффекты в плане количества NK-клеток, при этом соотношение CD8:NK не меняется по сравнению с мышами, подвергнутыми действию индифферентного контроля. Нацеленный на CD8 дикого типа связанный продукт слияния вызывал значительное повышение соотношения CD8:NK с 9.2- и 4,4-кратными повышениями для 2 мкг и 10 мкг дозировок, соответственно. DHEH мутант не имел столь же сильных эффектов в плане CD8 Т-клеток, но он также снижал нецелевые эффекты в плане NK-клеток, при этом мыши, подвергнутые действию данного конструкта, имели аналогичные соотношения CD8:NK, что и нацеленный на CD8 дикого типа связанный продукт слияния. В качестве заключения, нацеливание IFM может модулировать степень и избирательность влияния IL-15 на CD8- и NK-клетки; в частности, активность IL-15 может быть сдвинута в сторону CD8-клеток за счет контролирования нацеливания (CD8 против CD45 против отсутствия нацеливания), дозировки, и активности IL-15 (за счет снижения количества мутаций IL-15).

Данные эксперименты совместно показывают, что системное введение нацеленных на CD8 вариантов IL-15 может обеспечивать загрузку IL-15 в CD8 Т-клетки *in vivo*, может сдвигать активность IL-15 в сторону данных клеток, и может дополнительно повышать уровни CD8 Т-клеток в крови сверх достижимых при лечении с использованием описанных в данной области конструктов IL-15, таких как IL15/sushi-Fc.

Пример 8: Системное введение нацеленного на CD8 IL-15 демонстрирует пониженную токсичность

Оценивали влияние перенацеливания IL-15 на CD8 Т-клетки в плане системной токсичности. Кратко, C57BL/6J мышам давали две дозы, вводимые один раз в неделю с помощью внутривенной инъекции, в виде 10, 30 или 90 мкг конструкта IL15/sushi-Fc, который представляет собой форму IL-15 с увеличенным временем полужизни, или двух различных нацеленных на CD8 вариантов IL-15, содержащих D61H (DH) или D61H и E64H (DHEH) мутации (chY169Fab-M1scFv-IL15-DH/sushi и chY169Fab-M1scFv-IL15-DHEH/sushi); n=5 мышей в группе. Кроме того, оценивали нацеленную на CD8 IFM, содержащую IL-15 дикого типа, chY169Fab-M1scFv-IL15/sushi, при уровне дозы 90 мкг. В рамках приведенного выше Примера было показано, что нацеленные на CD8 конструкты склоняются в сторону загрузки и активности IL-15 в отношении CD8 Т-клеток по сравнению с IL15/sushi-Fc или нацеленным на CD45 конструктом, при этом при 10 мкг дозе нацеленные на CD8 конструкты индуцируют экспансию CD8 Т-клеток в крови так же или лучше, чем 10 мкг IL15/sushi-Fc, в то же время индуцируя меньшую экспансию NK-клеток в крови. Также оценивали повышение количество доз в неделю при фиксированном уровне дозировки, в частности две или три дозы в неделю в виде 10 мкг IL15/sushi-Fc или нацеленных на CD8 IL-15 IFM в течение двух недель (n=3 мыши в группе). На Фиг.11A показано отсутствие явной токсичности в форме потери массы тела с течение времени при повышении дозировки нацеленных на CD8 вариантов IL-15. Однако конструкт IL15/sushi-Fc имел максимальную

переносимую дозировку 10 мкг в неделю для IL15/sushi-Fc: 30 и 90 мкг дозировки индуцировали значительную токсичность и приводили к смерти через четыре дня после инъекции (Фиг.11A, числа в скобках на легендах фигур обозначают долю выживших мышей в конце эксперимента). Селезенки мертвых мышей собирали и обнаруживали увеличение селезенки у мышей, подвергнутых действию 30 и 90 мкг IL15/sushi-Fc (Фиг.11B). С другой стороны, каждый из нацеленных на CD8 вариантов IL-15 был способен достигнуть окончания полного двухнедельного исследования, приводил к минимальной потере массы тела (Фиг.11A), отсутствию заболевших животных, и меньшему увеличению селезенки по сравнению с 10 мкг IL15/sushi-Fc после полного двухнедельного курса введения, который был проанализирован здесь (Фиг.11B). Более того, в то время как IL15/sushi-Fc переносится при дозировке 10 мкг один раз в неделю, повышение данной дозировки до двух или трех доз в неделю приводило к значительной токсичности и смерти после второй инъекции (Фиг.11C, числа в скобках на легендах фигур обозначают долю выживших мышей в конце эксперимента). Заболевшие мыши также демонстрировали увеличение селезенки (Фиг.11B). С другой стороны, введение нацеленных на CD8 вариантов IL-15 два или три раза в неделю при дозировке 10 мкг не приводило к значительной потере массы тела, появлению заболевших животных (Фиг.11C) или значительному увеличению селезенки (Фиг.11B) в течение полного двухнедельного курса введения. В качестве заключения, перенацеливание IL-15 на CD8 Т-клетки обеспечивает более низкую токсичность и более высокое дозирование IL-15 *in vivo*. Было показано, что экспансия NK-клеток за счет IL-15 сильно влияет на токсичность IL-15 *in vivo* (Guo et al., J Immunol. 2015 Sep 1;195(5):2353-64). Без связи с теорией, считают, что сдвиг активность IL-15 по направлению от NK-клеток *in vivo* может снижать токсичность и обеспечивает большее дозирование по сравнению с CD8 Т-клетками. Это составляет терапевтическое преимущество и является значимым с учетом того, что противоопухолевая эффективность IL-15 может быть опосредована CD8 Т-клетками (Xu et al., Cancer Res. 2013 May 15;73(10):3075-86; Cheng et al., J Hepatol. 2014 Dec;61(6):1297-303).

Пример 9: Противораковая эффективность на основе системного введения нацеленного на CD8 IL-12

IL-12 представляет собой эффективный цитокин, который индуцирует сильную противоопухолевую активность в рамках моделей на основе опухолей мышей, но страдает от высокой токсичности в рамках клинических испытаний на людях. IL-12 обеспечивает дифференцирование CD4 Т-клеток в фенотип Th1, повышает цитотоксичность CD8 Т-клеток и активирует NK-клетки. Однако в рамках клинических испытаний IL-12 для терапии рака было обнаружено, что эффекты IL-12 у представляющих собой человека пациентов являлись наиболее заметными в плане NK-клеток (Robertson et al., Clin Cancer Res. 1999 Jan;5(1):9-16; Bekaii-Saab et al., Mol Cancer Ther. 2009 Nov; 8(11): 2983–2991). Является возможным, что доминантная активность IL-12 в плане NK-клеток наряду с токсичностью, ассоциированной с активацией NK-клеток, ограничивает способность эффективно доставлять биологические эффекты IL-12 в CD4 и

CD8 Т-клетки. Для тестировании данной гипотезы конструировали IL-12 IFM мыши, нацеленную на CD8 Т-клетки мыши (chY169Fab-M1scFv-scIL-12p70) и оценивали ее безопасность и противоопухолевую эффективность в рамках модели опухоли в виде меланомы мышей.

Кратко, B6D2F1/J мышам внутрикожно инокулировали 400000 клеток меланомы B16-F10. Спустя 10 дней мышей с опухолями разделяли случайным образом и подвергали воздействию двух доз (при однократном еженедельном введении) в виде 0,05, 0,25, 1, или 5 мкг рекомбинантного IL-12 (R&D Systems), нацеленного на CD45 IL-12 (chM1Fab-M1scFv-scIL12p70 и chM1Fab-scIL12p70), или нацеленного на CD8 IL-12 с помощью внутривенной инъекции (n=5 мышей в группе). На Фиг.12A показано, что еженедельное инъецирование нацеленных на CD45 IL-12 IFM или нацеленных на CD8 IL-12 IFM обеспечивало более высокую противоопухолевую эффективность, чем еженедельное инъецирование IL-12. Нацеленные на CD8 IL-12 дополнительно обеспечивал аналогичное ингибирование роста опухолей, что и нацеленный на CD45 IL-12 (Фиг.12A). Следует отметить, что мыши, подвергнутые действию конструкта Fab-scFv нацеленного на CD45 IL-12 страдали вследствие токсичности в форме потери массы тела при уровнях дозировки 1 и 5 мкг, в то время как мыши, подвергнутые действию Fab-scFv нацеленного на CD8 IL-12 не демонстрировали подобную токсичность (Фиг.12B). В качестве заключения, IFM, включающие IL-12, могут обеспечивать повышенную противоопухолевую эффективность по сравнению с IL-12 самостоятельно, при этом нацеленный на специфические клетки IL-12 может обеспечивать снижение системной токсичности.

Пример 10: Связанные продукты слияния IL-12

В одном аспекте связанный слитый белок, используемый в рамках изобретения, включает одноцепочечный IL-12p70 человека, связанный с Fab против CD45, и необязательно дополнительно включает scFv против CD45. Fab и scFV участки функционируют для нацеливания связанного продукта слияния IL-12 на Т-клетки, в частности обычные или функциональные Т-клетки. IL-12 TF могут быть загружены на Т-клетки *ex vivo* для применения в рамках адоптивной клеточной терапии или введены системно для связывания с Т-клетками (и другими иммунными клетками) *in vivo*. При любом способе введения IL-12 TF демонстрируют как аутокринную, так и паракринную активность, при это было показано. что они стимулируют иммунный ответ.

Два варианта осуществления описанных здесь IL-12 TF изображены на Фиг.2C-2D.

Описание связанного продукта слияния IL-12

Название белка: h9.4Fab-scIL-12p70

Данный белок был получен путем совместной экспрессии двух субъединиц: HC-h9.4Fab (SEQ ID NO: 79) и LC- h9.4Fab-scIL-12p70 (SEQ ID NO: 82). Полученный белок включает продукт слияния одноцепочечного IL-12p70 человека с С-концом легкой цепи Fab-фрагмента h9.4 с помощью Линкера-1 (SEQ ID NO: 36). Fab h9.4 представляет собой Fab-фрагмент антитела против CD45R человека, включающий вариабельные домены тяжелой и легкой цепей (VH и VL) из h9.4 и

константные домены человека (константный каппа домен человека и CH1 домен IgG1 человека).

Название белка: h9.4Fab-h9.4scFv-scIL-12p70

Данный белок был получен путем совместной экспрессии двух субъединиц: HC-h9.4Fab-h9.4scFv (SEQ ID NO: 80) и LC-h9.4Fab-scIL-12p70 (SEQ ID NO: 82). Полученный белок включает продукт слияния одноцепочечного IL-12p70 человека с С-концом легкой цепи Fab-фрагмента h9.4 с помощью Линкера-1 (SEQ ID NO: 36) и продукт слияния scFv h9.4 с тяжелой цепью Fab-фрагмента h9.4 с помощью Линкера-1.

Последовательности связанного продукта слияния IL-12

A. SEQ ID NO: 36: Линкер-1 (L1) $(G_4S)_3$ линкер

GGGGSGGGGSGGGGS

B. SEQ ID NO: 50: scIL-12p70-BA

Синтетическая последовательность; IL-12B и IL-12A, соединенные гибким линкером.

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLT
IQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLR
CEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDN
KEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN
LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT
SATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGSGGGSGGGSGGGSRNLP
VATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTST
VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQV
EFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYK
TKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

C. SEQ ID NO: 70: Линкер-5 (L5) $(G_3S)_4$ линкер

GGGSGGGSGGGSGGGS

D. SEQ ID NO: 79: HC-h9.4Fab

Тяжелая цепь гуманизированного антитела против CD45; содержит гуманизированный вариабельный домен тяжелой цепи 9.4 (h9.4) и домен CH1 IgG1 человека.

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYSIQWVRQAPGQRLEWIGYINPS
SGYIKYNQHFRGRATLTADRSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNSGSFDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSC

E. SEQ ID NO: 80: HC-h9.4Fab-h9.4scFv

Тяжелая цепь гуманизированного антитела против CD45, соединенная с scFv гуманизированного антитела против CD45; содержит вариабельный домен тяжелой цепи h9.4 и домен CH1 IgG1 человека. scFv h9.4 является генетически слитым с С-концом тяжелой цепи Fab с помощью гибкого линкера (Линкер-1, SEQ ID NO: 36).

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYSIQWVRQAPGQRLEWIGYINPS
SGYIKYNQHFRGRATLTADRSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNSGSFDYW

GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYSIQ
WVRQAPGQRLEWIGYINPSSGYIKYNQHFRGRATLTADRSASTAYMELSSLRSE
DTAVYYCARGNSGSFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVM
TQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSSGITYLYWFLQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGQGTKLEIK

F. SEQ ID NO: 82: LC-h9.4Fab-scIL-12p70

Легкая цепь гуманизированного антитела против CD45; содержит вариабельный домен легкой цепи h9.4 и константный каппа домен человека, одноцепочечный IL-12p70 дикого типа человека (SEQ ID NO: 50), генетически слитый с С-концом легкой цепи антитела с помощью гибкого линкера (Линкер-1, SEQ ID NO: 36); одноцепочечный IL-12p70 человека включает генетический продукт слияния IL-12A человека и IL-12B с помощью гибкого линкера (Линкер-5; SEQ ID NO: 80).

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSSGITYLYWFLQKPGQSPQLLIYRMS
NLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGQGTKLEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECG
GGGSGGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWT
LDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDI
LKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTC
GAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYT
SSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGK
SKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGSGG
GSGGGSGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTS
EEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMAL
CLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

Пример 11: Наногели на основе IL-15

В одном варианте осуществления наногель на основе IL-15 включает мономеры IL-15-Fc, расщепляемый химический поперечный линкер, и катионный блок-сополимер. Наногели на основе IL-15 имеют минимальную биологическую активность в виде наногелей, но являются активными при высвобождении IL-15-Fc мономеров вследствие расщепления поперечного линкера *in vivo*.

Более конкретно, наногели на основе IL-15 включают поперечно связанные IL-15-Fc мономеры, покрытые катионным блок-сополимером из PEG-полилизина (PK30) для промотирования клеточной адгезии. Ключевые элементы наногелей на основе IL-15 включают (1)

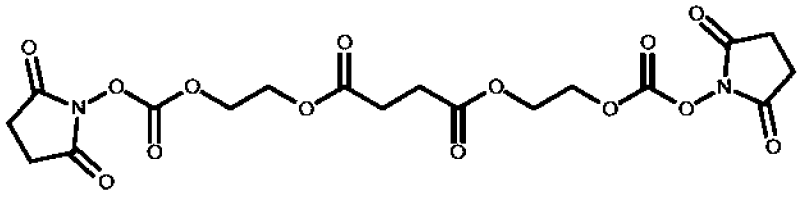
IL-15-Fc мономеры, (2) расщепляемый химический поперечный линкер, и (3) катионный блок-сополимер, состоящий из PEG-полилизина (обозначаемый как PK30).

IL-15-Fc мономер

В соответствии с одним вариантом осуществления IL-15-Fc мономер представляет собой слитый гомодимерный белок sushi-Fc с двумя связанными белками IL-15. Первичная последовательность белка IL-15R представляет собой IL-15 человека дикого типа. Sushi-Fc белок представляет собой продукт слияния домена sushi субъединицы рецептора альфа IL-15 дикого типа (IL-15R□) с N-концом модифицированного IgG2 Fc белка. Первичная последовательность Fc-участка состоит из шарнирных участков CH2 и CH3 IgG2 человека с IgG4 мутациями (PAPIEK-IgG2, мутированный в PSSIEK-IgG4) для минимизации опосредованной Fc гамма рецептором и комплементом эффекторной функции. Два домена sushi слиты с каждым Fc белком. Один IL-15 нековалентно связывается с каждым доменом sushi вследствие высокоаффинных ионных и гидрофобных взаимодействий. IL-15-Fc мономеры получают из клеток CHO, при этом каждый из IL-15 и sushi-Fc белков кодируются на плазмиде под отдельным промотором.

Поперечный линкер

В одном варианте осуществления поперечный линкер CL17 [бис(2-((((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)карбонил)окси)этил)сукцинат] представляет собой бифункциональный поперечно связывающий реагент (показан ниже). Поперечный линкер имеет множество реактивных участков, которые служат для двух отдельных целей. N-сукцинимидные карбонатные группы на каждом конце поперечного линкера реагируют с аминами для присоединения IL-15-Fc мономеров, в то время как эфирная группа в центре молекулы может расщепляться с помощью гидролиза. Более конкретно, при синтезе наногеля активированные карбонатные группы на поперечном линкере реагируют со свободными лизинами на IL-15-Fc для образования карбаматных связей, что приводит к поперечному связыванию мономеров с мультимерами. Наногели на основе IL-15 являются стабильными в растворе при физиологическом pH. Однако *in vivo* сложноэфирная группа будет подвергаться гидролизу, что будет приводить к высвобождению модифицированного тиолом IL-15-Fc мономера. Все еще присоединенный к лизину тиол на IL-15-Fc будет подвергаться быстрой внутримолекулярной циклизации, высвобождающей интактный нативный белок с сопутствующим образованием 1-3,оксатиолон-2-она. Таким образом, поперечный линкер и остаточные группы являются самоустраняющими, при этом поперечный линкер полностью диссоциируется, оставляя IL-15-Fc мономер в том же состоянии, в котором он был до образования наногеля.

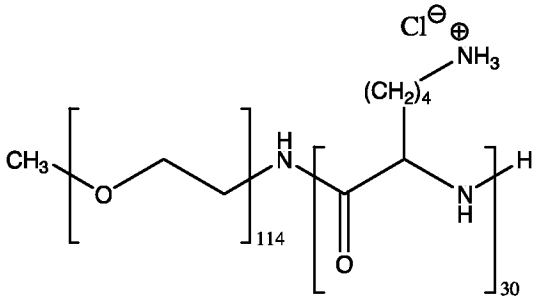


CL17
BP на основе сложного эфира
бис(2-{{{(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси}карбонил}окси}этил)сукцинат

Блок-сополимер PK30

Вследствие реакции катионных лизиновых остатков поперечное связывание IL-15-Fc с поперечным линкером CL17 приводит к общему отрицательному заряду полученных наногелей на основе IL-15, который ингибирует присоединение к клетке. На первом этапе наногели образуют комплексы с PK30 (метокси-поли(этиленгликоль)n-блок-поли(гидрохлорид L-лизина), PEG-полилизин, как показано ниже) за счет электростатических взаимодействий для обеспечения присоединения к клетке. PK30 представляет собой линейный амфифильный блок-сополимер, который имеет блок поли(гидрохлорид L-лизина) и нереактивный PEG блок. Блок-сополимер содержит приблизительно 114 единиц PEG (молекулярная масса приблизительно 5000 Да) и 30 единиц лизина (молекулярная масса приблизительно 4900 Да). Поли-L-лизиновый блок обеспечивает общий катионный заряд при физиологическом уровне pH и придает наногелю общий положительный заряд после ассоциации.

PK30



Пример 12: Образование белкового наногеля с поликатионным полимером на поверхности

Белковые наногели, включающие белковый наногель с поверхностью в виде катионного полимера, образуются следующим образом. IL-15^{WT}/sushi-Fc при концентрации 15 мг/мл поперечно связываются с наночастицами белка с использованием 25-молярного избытка расщепляемого поперечного линкера, указанного в Формуле IV. После инкубирования в течение 30 минут при комнатной температуре реакцию разбавляли 10-кратно с помощью DPBS до конечной концентрации цитокинов 1,5 мг/мл. Белковые наногели затем очищают от оставляющих линкер групп (которые включают молекулярные фрагменты линкера, которые удаляются в

качестве части реакции поперечного связывания) и непрореагировавшего линкера с помощью буферного обмена в DPBS с помощью колонки Zeba (пороговое значение молекулярной массы 7000 или 40000, доступна от Thermo-Fisher). Колонки Zeba использовали в соответствии с инструкциями производителя, включая уравнивание колонки в DPBS с помощью трех последовательных промываний в DPBS для обеспечения буферного обмена с последующим нанесением реакционных продуктов. Подвергнутые буферному обмену белковые наногели при концентрации цитокинов приблизительно 1-1,5 мг/мл затем конъюгировали с блок-сополимером в виде полиэтиленгликоля-полилизина (PEG-polyK): PEG5k-polyK30 (Alamanda Polymers, кат. # 050-KC030), который представляет собой блок-сополимер, включающий 5 кДА полиэтиленгликоль (PEG5k) и состоящий из 30 аминокислот полилизиновый полимер (polylysine30 или polyK30), или PEG5k-polyK200 (Alamanda Polymers, кат. # 050-KC200). PEG5k-polyK30 или PEG5k-polyK200 восстанавливаются до 10 мг/мл в DPBS и добавляются в белковые наногели при конечной концентрации блок-сополимера 50 мкг/мл и инкубируются при комнатной температуре в течение 30 минут. Размер и полидисперсию поверхностных фунционализированных наночастиц анализировали на основе динамического рассеяния света (DLS) при угле 90 градусов на анализаторе размера частиц NanoBrook Omni (NanoBrook Instruments Corp.), относительную конверсию в наночастицы определяли с помощью эксклюзионной хроматографии с использованием колонки BioSepTM SEC-s4000 (Phenomenex Inc.) на ВЭЖХ системе Prominence с PBS (pH 7,2) в качестве элюента (скорость потока 0,5 мл/мин), снабженной фотодиодной матрицей (Shimadzu Corp.), см. Фиг.26.

Конечные наногели на основе IL-15 разбавляли равным объемом сбалансированного солевого раствора Хэнка (HBSS) до конечной концентрации приблизительно 0,5 – 0,75 мг/мл для применения в рамках последующих анализов, таких как ассоциирование с активированными первичными Т-клетками.

Пример 13: Ассоциирование белкового наногеля с Т-клеткой и криоконсервирование

Белковые наногели связывал с активированными Т-клетками человека. Кратко, белковые наногели IL-15^{WT}/sushi-Fc с поверхностью, функционализированной с помощью поликатионного полимера (PEG5k-polyK30), получали как описано в Примере 12. Для обеспечения возможности последующего анализа на основе проточной цитометрии наногели получали с помощью 3 мас.% Alexa-647-меченного IL-15 ^{WT} /sushi-Fc и 97 мас.% немеченного IL-15 ^{WT} /sushi-Fc. IL-15 ^{WT} /sushi-Fc флуоресцентно метили с помощью набора для мечения Alexa-Fluor-647 в соответствии с инструкциями производителя (ThermoFisher, кат. # A20186, 100 мкг набор; или кат. # A20173, 1 мг набор). Все другие этапы синтеза белкового наногеля осуществляли как описано в Примере 12.

Активированные Т-клетки промывали DPBS и инкубировали в течение 1 часа при 37 °C до конечной плотности клеток приблизительно 10^8 клеток/мл с наногелями на основе IL-15 при равной концентрации цитокинов приблизительно 0,5-0,75 мг/мл. Раствор размешивали каждые 10-15 минут путем переворачивания или легкого завихрения. Затем клетки ресуспендировали в среде

для заморозки клеток, содержащей FBS с 5% диметилсульфоксида (DMSO), или среде для заморозки без сыворотки, как указано, при плотности 10^7 клеток/мл, и переносили в криогенные флаконы для заморозки в контейнере для заморозки Mr. Frosty™ (Nalgene), как описано производителем. Затем клетки культивировали в CM-T с 20 нг/мл IL-2 при 37 °C и 5% CO_2. Связывание иммунных агонистов, образованных в виде связанных продуктов слияния и/или наногелей, с Т-клетками отслеживали с помощью проточной цитометрии с использованием проточного цитометра FACSCelesta™ с программным обеспечением FACSDiva™ (BD Biosciences) и определяли устойчивое связывание подобных иммунных агонистов с Т-клетками после замораживания и размораживания (**Фиг.27**).

Пример 14: Наногель на основе IL-15 обеспечивает аутокринное стимулирование и экспансию Т-клеток после адоптивного переноса, обеспеченную контролируемым концентрированным высвобождением IL-15

Интерлейкин-15, представляющий собой сильный стимулятор экспансии CD8- и NK-клеток, способен обеспечивать противоопухолевую активность адоптивно перенесенных Т-клеток. Однако системная доставка не обеспечивает безопасным образом достаточные дозы для обеспечения экспансии Т-клеток, приживления, и противоопухолевой активности.

Высокие уровни IL-15 в крови пациентов с раком ассоциированы с успешными клиническими ответами (Kochenderfer et al., *Lymphoma remissions caused by anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells are associated with high serum interleukin-15 levels.* J. Clinical Oncology (2017) 35(16):1803-1813). Описанные здесь нагруженные наногелем на основе IL-15 Т-клетки представляют собой аутологичные Т-клетки, которые несут тщательно контролируемые дозы IL-15, который медленно высвобождается в течение 7-14-дневного периода для направленной аутокринной активации поступающих Т-клеток без влияния на эндогенные Т-клетки. Один пример представляет собой нагруженные наногелем на основе IL-15 цитотоксические Т-клетки (CTL), которые праймированы опухолевым антигеном с помощью новой праймирующей последовательности дендритных клеток.

В качестве заключения, загрузка клеток наногелем на основе IL-15 обеспечивает стабильное и гибкое поступление контролируемой дозы IL-15 в расчете на одну клетку. Схема технологии в виде наногеля на основе IL-15 обеспечивает медленное и контролируемое высвобождение IL-15, приводящее к аутокринной стимуляции и устойчивой клеточной экспансии в рамках терапии на основе адоптивных Т-клеток. В отличие от системно поступающего IL-15, праймирование с помощью наногеля на основе IL-15 индуцирует на порядки более низкие системные уровни IFNg, экспансии эндогенных CD8- и NK-клеток вследствие низкого системного действия. Полностью закрытый полуавтоматизированный клеточный процесс предсказуемо обеспечивает продуцирование нескольких миллиардов антиген-направленных CTL человека с ~20% реактивностью и 95% чистотой Т-клеток от здоровых доноров, несмотря на прекурсоры с крайне

низкой частотой (< 1%). CTL человека сильно зависят от технологии праймирования с использованием наногеля на основе IL-15 для выживаемости и экспансии клеток *in vivo*.

Пример 15: Фармакологическая активность нагруженных наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клеток

В одном варианте осуществления наногель на основе IL-15 представляет собой мультимер рецептора α IL-15 человека-sushi домена-гомодимеров продукта слияния Fc с двумя ассоциированными молекулами IL-15 (IL15-Fc), присоединенными с помощью расщепляемого поперечного линкера (Линкера-2), и нековалентно покрытые блок-сополимером в виде полиэтиленгликоля (PEG)-полилизина$_{30}$ (PK30). В частности, наногель на основе IL15 представляет собой мультимер мономеров IL15-Fc человека, соединенных биорасщепляемым поперечным линкером и нековалентно покрытых блок-сополимером в виде полиэтиленгликоля (PEG)-полилизина$_{30}$ (PK30). IL15-Fc мономеры состоят из двух субъединиц, каждая из которых состоит из эффекторно ослабленного IgG2 Fc варианта, слитого с рецептором α IL-15-доменом sushi, нековалентно связанным с молекулой IL-15. Т-клетки, нагруженные наногелем на основе IL-15, получают с помощью процесса загрузки, при котором клетки-мишени совместно инкубируются с наногелем на основе IL-15 при высоких концентрациях. За счет данного процесса наногели на основе IL-15 становятся ассоциированными с клеткой за счет электростатических взаимодействий и интернализуются для создания внутриклеточных резервуаров наногеля на основе IL-15. Из данных резервуаров наногель на основе IL-15 медленно высвобождает биоактивный IL15-Fc за счет гидролиза поперечного линкера. Данное замедленное высвобождение IL15-Fc промотирует пролиферацию и выживаемость нагруженных наногелем на основе IL-15 Т-клеток, что обеспечивает нацеленный, контролируемый и зависимый от времени иммунный стимул.

Задачей данного исследования было протестировать фармакологическую активность нагруженных наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клеток у C57BL/6J мышей с/без ортотопически размещенных опухолей в виде B16-F10 меланомы. Контрольные группы включали индифферентный контроль, PMEL клетки самостоятельно и PMEL клетки + IL15-Fc, вводимые в виде отдельной инъекции (10 мкг, максимальная переносимая доза, MTD).

Внесение B16-F10 опухолей и измерения опухолей

B16-F10 клетки меланомы (0,2 x 10^6) инъецировали подкожно в побритый правый бок самок мышей C57BL/6 (Jackson Labs) в День -12 исследования. Записывали показатели массы тела и размеры опухолей (длина [Д] и ширина [Ш], определенные в перечне аббревиатур) измеряли с помощью циркулей от 2 до 3 раз в неделю. Объем опухолей подсчитывали с помощью формулы: $Ш^2$ x Д x π/6.

Выделение и экспансия PMEL клеток

PMEL клетки выделяли из селезенок и лимфатических узлов (паховых, подмышечных и шейных) 14 самок трансгенных PMEL мышей (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Селезенки и лимфатические узлы обрабатывали с помощью диссоциатора gentleMACS Octo (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) и пропускали через 40 мкм фильтр. Клетки промывали с помощью центрифугирования и очищали CD8a+ клетки с помощью набора для выделения IMACS для наивных $CD8a^+$ клеток (Miltenyi Biotech) и блока MultiMACS Cell24 (Miltenyi Biotech) и сепаратора (Miltenyi Biotech) с 18 колонками в соответствии с протоколом производителя. Отличные от $CD8a^+$ клетки удаляли с помощью аффинной колонки и собирали $CD8a^+$ Т-клетки в элюате колонки. Чистоту CD8a+ клеток подтверждали с помощью проточной цитометрии.

При выделении (День 0) очищенные $CD8a^+$ клетки от PMEL мышей наносили на десять 6-луночных планшетов для тканевой культуры с антителами против CD3 и CD28 при плотности 5 x 10^6 клеток/лунка и инкубировали в течение 24 ч при 37°C и 5% CO_2. IL-2 мыши (20 нг/мл) и IL-7 мыши (0,5 нг/мл) добавляли спустя 24 часа после нанесения на планшеты (День 1). В День 2 и День 3 клетки подсчитывали и разбавляли до концентрации $0,2\times10^6$ клеток/мл с помощью свежей среды, содержащей IL-21 мыши (10 нг/мл). Клетки собирали в День 4 для получения всего 100 x10^6 PMEL клеток/мл в 28 мл индифферентного контроля.

Получение нагруженных наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клеток

5 мл PMEL клеток (100 x 10^6 клеток/мл) смешивали с 5,5 мл наногеля на основе IL-15 (1,36 мг/мл) и инкубировали при вращении в течение 1 часа при 37°C для создания нагруженных наногелем на основе IL-15 PMEL клеток. Нагруженные наногелем на основе IL-15 PMEL клетки промывали (3 раза, сначала средой и затем дважды HBSS) с помощью центрифугирования (500 г) и подсчитывали. Нагруженные наногелем на основе IL-15 PMEL клетки ресуспендировали при концентрации 50 x10^6 клеток/мл. Мышам в Группах 5A и 5B инъецировали 200 мкл данного препарата при общем количестве 10 x 10^6 нагруженных наногелем на основе IL-15 PMEL клеток в расчете на одну мышь. PMEL клетки (15 мл при 100 x10^6 клеток/мл) смешивали с 15 мл HBSS, инкубировали при вращении в течение 1 часа при 37°C, промывали (3 раза, сначала средой и затем дважды HBSS) с помощью центрифугирования (500 г) и подсчитывали. PMEL клетки ресуспендировали при концентрации 50 x10^6 клеток/мл. Мышам в Группах 2A и 2B в/в инъецировали 200 мкл данного препарата при общем количестве 10 x 10^6 PMEL клеток в расчете на одну мышь. Мыши в Группах 3A и 3B получали в/в инъекцию 200 мкл данного препарата при общем количестве 10 x 10^6 PMEL клеток в расчете на одну мышь и получали ретро-орбитальную инъекцию IL15-Fc (10 мкг/мышь в 50 мкл HBSS; лот # TS0). На основе средней эффективности загрузки на уровне 39% общее количество IL15-Fc, ассоциированного с 10 x 10^6 PMEL клетками составляло 58,5 мкг, что в 5,85 раза превышает количество, доставленное системно с помощью инъекции IL15-Fc (10 мкг) в Группах 3A и 3B.

ELISA Fc-IL-15

Иммуноферментный анализ (ELISA) Fc-IL15 использовали для определения концентрации IL15 Fc в образцах, содранных через 2 часа, 1, 2, 4 и 10 дней после введения. Планшеты для ELISA были покрыты в течение ночи при 4°C антителом козы для захвата против Fc IgG человека. Планшеты промывали и блокировали с помощью реагентного разбавителя в течение, по меньшей мере, 2 часов при 30°C. Планшеты промывали, в лунки добавляли образцы (разбавленные в реагентном разбавителе) и стандарты IL15-Fc (попарно, 31-2000 пг/мл, в реагентном разбавителе) и инкубировали планшеты в течение 1 часа при 37 °C. Планшеты промывали и далее добавлял антитело для детектирования против IL-15 с биотином и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Планшеты промывали и инкубировали стрептавидином-HRP в течение 20 минут при 37°C. Планшеты промывали и далее добавляли субстратный раствор на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB) и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте до остановки реакции. Затем планшеты сканировали на сканере для планшетов (450 нм).

Анализ осуществляли дважды. Для первого запуска образцы оценивали при следующих разбавлениях: 1: 20000 для периода в виде 2 часов, 1:5000 для периода в виде 1 дня, и 1:250 для периодов в виде 2 дней, 4 дней, и 10 дней. Для второго запуска образцы из групп 3A и 3B разбавляли 1:5000 для периода в виде 1 дня, и 1:250 для периода в виде 2 дней, и 1:25 для периодов в виде 4 дней и 10 дней. Образцы из групп 1A и 1B, 2A и 2B и 5A и 5B разбавляли 1:25 для всех проанализированных периодов времени. Данные приведены для второго запуска. Однако поскольку образцы для периода в виде 2 часов были истощены для второго запуска и с учетом того, что концентрации IL15-Fc спустя 24 часа были аналогичными в группах 3A и 3B в рамках обоих запусков, соответствующие 2 ч значения первого запуска были включены в другие периоды времени в рамках второго запуска для целей вычисления фармакокинетических (PK) параметров.

Нижний предел количественного определения (LLOQ) в крови составлял 310 нг/мл для 1:20000 разбавления, 77,5 нг/мл для 1:5000 разбавления, 3,875 нг/мл для 1:250 разбавления и 0,3875 нг/мл для 1:25 разбавления.

Уровни цитокинов в сыворотке мышей

Использовали наборы ThermoFisher ProcartaPlex Mouse High Sensitivity Panel 5-Plex кат. # EPXS0S0-22199-901 в соответствии с протоколом производителя и анализировали образцы на системе Bio-Plex 200. Сыворотку размораживали на льду и тестировали 20 мкл сыворотки на уровни IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 и IL-6. В нескольких образцах 20 мкл сыворотки были недоступны, поэтому использовали меньший объем. Значения разбавления корректировали для вычисления концентраций в соответствии со стандартными кривыми. Статистический анализ осуществляли с помощью GraphPad Prism.

Клинические химические показатели

Клинические химические параметры измеряли с использованием образцов сыворотки. На Фиг.9 показаны клинические химические параметры, в рамках которых наблюдались

статистически значимые изменения у наивных мышей в День 1 и День 4 после введения. В День 1 после введения наблюдали значительное снижение ($p<0,05$) уровней альбумина у PMEL + IL15-Fc группы по сравнению с группой с нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL, а также уровней азота мочевины в крови (BUN) по сравнению как с индифферентным контролем, так и нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL ($p<0,05$ для обоих). В День 4 после введения PMEL + IL15-Fc группа демонстрировала значительно сниженный альбумин ($p<0,05$ по сравнению со всеми другими подвергаемыми лечению группами), общий белок ($p<0,05$ по сравнению с индифферентным контролем), глюкозу ($p<0,05$ по сравнению с нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL), соотношение альбумин/глобулин (ALB/GLOB) ($p<0,05$ по сравнению с индифферентным контролем, и $p<0,01$ по сравнению с PMEL и нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL).

Кроме того, PMEL + IL15-Fc группа демонстрировала значительное повышение уровней холестерина ($p<0,05$ по сравнению с индифферентным контролем и нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL). Все подвергаемые лечению группы демонстрировали склонность к снижению уровней кальция по сравнению с индифферентным контролем, которое являлось статистически значимым в случае группы PMEL ($p<0,05$). Группа с нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL демонстрировала значительные изменения общего билирубина ($p<0,05$ по сравнению с индифферентным контролем и PMEL) и фосфора ($p<0,05$ по сравнению с PMEL).

На Фиг.10 показаны клинические химические параметры, в рамках которых наблюдались статистически значимые изменения у имеющих опухоли мышей в День 1 и День 4 после введения. В День 1 после введение единственным статистически значимым изменением клинических химических параметров являлось снижение билирубина, наблюдаемое как у PMEL + IL15-Fc группы, так и у группы с нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL. В День 4 после введения статистически значимые повышения альбумина ($p<0,05$ по сравнению с индифферентным контролем), общего белка ($p<0,01$ по сравнению с индифферентным контролем) и бикарбоната TCO2 ($p<0,05$ по сравнению с индифферентным контролем) наблюдались у PMEL группы. Кроме того, статистически значимое повышение глобулина наблюдалось у PMEL группы ($p<0,001$ по сравнению с индифферентным контролем; и $p<0,05$ по сравнению с DP-15 PMEL) и у PMEL + IL15-Fc группы ($p<0,05$ по сравнению с индифферентным контролем).

Системное высвобождение цитокинов

С помощью набора Luminex 5-plex были измерены уровни цитокинов в сыворотке (IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-6, и TNFα) через 2 часа, 24 часа и 96 часов после введения. У наивных не имеющих опухолей мышей уровни IFN-γ в PMEL + IL15-Fc группе составляли 12,8±3,7 пг/мл, в то время как IFN-γ был ниже предела количественного определения (LLOQ=0,06 пг/мл) в группе с нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL (Фиг.11). У имеющих опухоли мышей присутствовала в среднем в 41 раз более высокая концентрация IFN-γ в PMEL + IL15-Fc группе (20,5±0,5 пг/мл) по сравнению с группой с нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL

(0,5±0,1 пг/мл). Более высокие уровни IL-2, IL-6, и TNFα также наблюдались в PMEL + IL15-Fc группе по сравнению с другими группами.

Фармакокинетические показатели IL15-Fc в крови

Использовали сэндвич-ELISA (антитело для захвата против Fc и далее антитело для детектирования против IL-15) для измерения IL15-Fc в крови мышей, которым были инъецированы PMEL + IL15-Fc (10 мкг) и нагруженные наногелем на основе IL-15 PMEL (несущие 58,5 мкг IL15-Fc).

Фармакокинетические показатели (PK) одного введения нагруженных наногелем на основе IL-15 PMEL и PMEL + IL15-Fc определяли для обобщенного животного среди наивных и имеющих опухоли мышей. Для PMEL + IL15-Fc группы максимальная концентрация (Cmax) снижалась спустя 2 часа после введения как у наивных, так и имеющих опухоли мышей. В группе с нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL первую концентрацию измеряли через 24 часа (соответствующие 2 часам образцы первоначально измеряли при неоптимальном разбавлении, при этом IL15-Fc не был детектирован, при этом отсутствовало достаточное количество образца для повторения измерения с идеальным разбавлением). У имеющих опухоли мышей была достигнута немного более низкая концентрация, чем у наивных мышей. Вычисленное среднее t1/2 для IL15-Fc в PMEL + IL15-Fc группе составляло 28,9 часов и 7,12 часов у имеющих опухоли мышей и не имеющих опухоли мышей, соответственно.

Концентрацию IL15-Fc спустя 24 часа сравнивали у PMEL + IL15-Fc группы и группы с нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL. Общая концентрация IL15-Fc была более высокой в PMEL + IL15-Fc группе (10 мкг), чем в группе с нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL (58,5 мкг IL15-Fc), приблизительно в 3488 раз выше у наивных мышей и в 3299 раз выше у имеющих опухоли мышей. Композитные PK параметры IL15-Fc обобщены в Таблице 1, а средние (SD) PK профили IL15-Fc изображены на Фиг.12.

Таблица 1: Композитные PK параметры IL15-Fc PK для PMEL + IL15-Fc группы у наивных и имеющих опухоли мышей (10 мкг доза IL15-Fc)

Животное	Соединение	Группа	$T_{1/2}$ (ч)	C_{max} (нг/мл)	T_{max} (ч)	$C_{послед.}$ (нг/мл)	$T_{послед.}$ (ч)	$AUC_{послед.}$ (ч*нг/мл)	AUCINF (ч*нг/мл)
Обобщенное	IL15-Fc	Без опухолей	7,12	6931	2	3,64	96	202387	202424
		С опухолями	28,9	7300	2	0,448	240	156335	156353

Ингибирование роста опухоли

В День 0 (день введения) опухоли достигали среднее объема приблизительно 140 мм3. статистически значимое ингибирование роста опухоли наблюдали в День 4 после введения по

всех подвергаемых лечению группах по сравнению с индифферентным контролем ($p<0,0001$), при этом данное различие становилось более выраженным с течением времени (Фиг.13, слева). В День 16 исследования оставалось только 2/5 животных в группе с индифферентным контролем (другие были умерщвлены вследствие слишком большого объема опухоли), но в каждой из подвергаемых лечению групп осталось 4/5 животных. Объемы опухолей в группе с индифферентным контролем значительно ($p<0,0001$) отличались от всех других групп. Объемы опухолей в PMEL группе были значительно ($p<0,05$) более крупными, чем объемы в группе с нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL и PMEL+IL15-Fc группе. Ингибирование роста опухоли в PMEL + IL15-Fc группе и группе с нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL не отличалось в День 16 (Фиг.13, слева и справа). Опухоли взвешивали после умерщвления ($n=2-5$, каждая группа, каждый момент времени) в День 1, 4, 10 и 16 после введения. Значения массы опухолей показаны на Фиг.14.

Некоторые животные были обнаружены умирающими или мертвыми перед указанными в исследовании моментами времени. Они включали мышей в группе с индифферентным контролем (всего 4: 1 в День 9, 1 в День 10 и 2 в День 14), в PMEL группе (всего 2: 1 в День 2, и 1 в День 6), в PMEL + IL15-Fc группе (всего 2: 1 в День 9 и 1 в День 11) и в группе с нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL (всего 2: 1 в День 9 и 1 в День 16). Они не считались связанными с лечением, поскольку они были распределены среди групп с наибольшим количеством ($n=4$) получавших индифферентный контроль. Наконец, отсутствовало различие среди животных, найденных умирающими или мертвыми, связанных с группой с нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL по сравнению с PMEL группой.

Крупные открытия исследования приведены ниже.

1. Нагруженные наногелем на основе IL-15 PMEL клетки хорошо переносились при введении дозировки в виде 10×10^6 клеток.
2. Все из PMEL, PMEL + IL15-Fc и нагруженных наногелем на основе IL-15 PMEL клеток приводили к ингибированию роста опухоли по сравнению с индифферентным контролем. Ингибирование было более высоким при использовании PMEL + IL15-Fc и нагруженных наногелем на основе IL-15 PMEL клеток по сравнению с PMEL.
3. Токсикологически релевантные изменения клинических химических параметров не наблюдались в случае PMEL или нагруженных наногелем на основе IL-15 PMEL клеток. Некоторые изменения наблюдались в случае PMEL + IL-15 Fc.
4. Не было зафиксировано изменений уровней IFN-γ, TNF-α или IL-6 в сыворотке в случае PMEL или нагруженных наногелем на основе IL-15 PMEL клеток в любой момент времени. Значительные изменения уровней IFN-γ и TNF-α в сыворотке наблюдались в случае PMEL + IL15-Fc спустя 24 часа. IL-6 был повышен в случае PMEL + IL15-Fc спустя 2 часа (только у не имеющих опухолей (наивных) мышей) и спустя 24 часа.
5. Уровни IL15-Fc в сыворотке у группы с нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL были более чем в 3000 раз ниже по сравнению с уровнями, определенными у PMEL + IL15-Fc группы, что соответствует отсутствию потери массы тела, отсутствию

значительных изменений в CBS и эндогенных иммунных клетках ($CD8^+$, $NK1.1^+$ и $CD4^+$ клетках), сниженным уровням IFN-γ в сыворотке и ассоциированным фармакологическим изменениям по сравнению с PMEL + IL15-Fc группой.

Пример 16: Комбинирование нагруженных связанным продуктом слияния IL-12 и нагруженных наногелем на основе IL-15 Т-клеток задействует различные механизмы для повышения противоопухолевой активности

Предпосылки: Интерлейкин-15 (IL-15) и Интерлейкин-12 (IL-12) играют различную роль в качестве иммуномодуляторов. IL-15 индуцирует Т-клеточную память и обеспечивает выживаемость, активацию и пролиферацию $CD8^+$ Т- и NK-клеток. IL-12 промотирует Т-клеточную цитотоксичность и врожденные иммунные ответы в микросреде опухоли. Оба цитокина были исследованы в качестве иммунотерапевтических средств для лечения рака, однако клинический успех был ограничен вследствие тяжелых побочных эффектов. Для ограничения системной токсичности была разработана Т-клеточная терапия, включающая загружаемые на поверхность иммунные агонисты, как описано здесь. Т-клетки с несколькими мишенями (MTC), являющиеся специфичными в отношении нескольких опухолевых антигенов, получают из афереза пациентов. Цитокины связываются с MTC для обеспечения устойчивости и активности MTC после адоптивного переноса пациентам, в то же время ограничивая системное действие цитокинов. В данном исследовании оценивали комбинацию цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) с поверхностью, нагруженной наногелем на основе IL-15, и связанного продукта слияния IL-12 для задействования их комплементарных биологических свойств для достижения еще более высокой эффективности.

Способы: CTL, являющиеся реактивными против антигена MART-1, получали от здоровых доноров (MART-1 CTL). Далее анализировали экспансию и цитотоксичность MART-1 CTL, нагруженных связанным продуктом слияния IL-12, наногелем на основе IL-15, или ими обоими против клеток SKMEL-5 меланомы. Кроме того, нагружали PMEL $CD8^+$ Т-клетки мыши, являющиеся реактивными против B16-F10 антигена меланомы gp100, связанным продуктом слияния IL-12, наногелем на основе IL-15, или ими обоими и анализировали на предмет *in vitro* экспансии, активации и цитотоксичности против клеток B16-F10 меланомы, а также на противоопухолевую активность у несущих B16-F10 опухоли мышей.

Результаты: Загрузка наногелем на основе IL-15 промотировала пролиферацию MART-1 CTL и поддерживала реактивность в отношении антигена с течением времени. Нагруженные связанным продуктом слияния IL-12 MART-1 CTL демонстрировали повышенное секретирование IFN-γ и цитотоксичность, особенно при низких соотношениях эффектор:мишень. Комбинация MART-1 CTL, нагруженных связанным продуктом слияния IL-12 и наногелем на основе IL-15, дополнительно повышала экспансию Т-клеток, секретирование IFN-γ и цитотоксичность.

Аналогичным образом, комбинация PMEL Т-клеток мыши, нагруженных связанным продуктом слияния IL-12 и наногелем на основе IL-15, приводила к устойчивой активации Т-клеток, улучшенной памяти, и повышенной цитотоксичности по сравнению с индивидуально нагруженными Т-клетками. Совместное введение нагруженных связанным продуктом слияния IL-12 и наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клеток имеющим B16-F10 меланому мышам хорошо переносилось и сопровождалось минимальной и обратимой потерей массы тела и обеспечивало более высокую противоопухолевую активность.

Выводы: Модулярное связывание связанного продукта слияния IL-12 и наногеля на основе IL-15 с Т-клетками запускает различные механизмы их действия в качестве иммуномодуляторов, что неожиданно приводит к синергичному эффекту с повышенной противоопухолевой активностью без заметной токсичности в рамках доклинических моделей.

1. Комбинация нагруженных наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клеток с нагруженными связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клетками приводит к неожиданным синергичным эффектам

Итерлейкин-15 (IL-15) активирует и обеспечивает экспансию как $CD8^+$ Т-клеток, так и NK-клеток, но не иммуносупрессорных T_{reg} клеток. Таким образом, IL-15 представляет собой привлекательный вариант в плане иммунотерапии рака, однако его систематическое введение ограничено вследствие иммунной активации и токсичности. Для ограничения системного влияния IL-15 был разработан наногель на основе IL-15, представляющий собой описанный здесь мультимер химически поперечно связанных IL-15/IL-15 Rα/Fc гетеродимеров (IL15-Fc). Наногель на основе IL-15 загружается на опухоль-реактивные Т-клетки перед адоптивным переносом клеток (ACT). Данный новый терапевтический подход обеспечивает загрузку наногеля на основе IL-15 в клетки при концентрациях, которые являются недостижимыми в случае системного IL15-Fc, вызывает активацию и экспансию аутокринных Т-клеток, но в то же время ограничивает системное действие и связанную с ним токсичность. Противоопухолевая активность терапии на основе Т-клеток была ограничена вследствие недостаточной экспансии и активации Т-клеток. Здесь описана комбинированная терапия, включающая наногель на основе IL-15, скомбинированный со связанным продуктом слияния IL-12 для преодоления данных ограничений.

В частности, как показано на Фиг.13A, наногель на основе IL-15 (может обозначаться как DP-15 или Deep IL-15) обозначает мультимер рецептора α IL-15 человека-sushi домена-гомодимеров продукта слияния Fc с двумя ассоциированными молекулами IL-15 (IL15-Fc), присоединенными с помощью расщепляемого поперечного линкера (см., например PCT заявку PCT/US2018/049594, приведенную здесь в качестве ссылки) и нековалентно покрытыми блок-сополимером полиэтиленгликоль (PEG)-полилизин$_{30}$ (PK30). Более конкретно, наногель на основе IL-15 представляет собой мультимер мономеров IL15-Fc человека, соединенных гидролизуемым поперечным линкером (CL17) и нековалентно покрытых блок-сополимером полиэтиленгликоль (PEG)-полилизин$_{30}$ (PK30). Мономеры IL15-Fc состоят из двух субъединиц,

каждая из которых состоит из эффекторного ослабленного Fc варианта IgG2, слитого с рецептором α IL15-sushi доменом, нековалентно связанным с молекулой IL-15. Т-клетки, нагруженные наногелем на основе IL-15, получают с помощью процесса загрузки, при котором клетки-мишени совместно инкубируются с наногелем на основе IL-15 при высоких концентрациях. За счет данного процесса наногель на основе IL-15 становится ассоциированным с клеткой за счет электростатических взаимодействий и интернализуется для создания внутриклеточных резервуаров наногеля на основе IL-15. Из данных резервуаров наногель на основе IL-15 медленно высвобождает биоактивный IL15-Fc за счет гидролиза поперечного линкера. Данное замедленное высвобождение IL15-Fc промотирует пролиферацию и выживаемость нагруженных наногелем на основе IL-15 Т-клеток, что обеспечивает нацеленный, контролируемый и зависимый от времени иммунный стимул.

Как показано на Фиг.13B, связанный продукт слияния IL-12 (может быть обозначен как DP-12 или Deep IL-12) состоит из молекулы IL-12 p70, слитой с антигенсвязывающим фрагментом (Fab) антитела против CD45. С помощью данного Fab связанный продукт слияния IL-12 связан с молекулами CD45 на поверхности МТС. Т-клетки, несущие связанный на поверхности связанный продукт слияния IL-12 (нагруженные связанным продуктом слияния IL-12 Т-клетки) задействуют способность цитокина IL-12 обеспечивать иммунные ответы несколькими различными и комплементарными способами. Они включают дифференцирование или экспансию продуцирующих интерферон-γ (IFN-γ) хелперных Т-клеток 1 (T_H1), цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) и природных киллерных клеток (NK); индуцирование презентирования антигена CTL молекулами главного комплекса гистосовместимости 1 (MHCI); репрограммирование иммуносупрессивных миелоидных клеток; и анти-ангиогенные эффекты. Нагруженные связанным продуктом слияния IL-12 клетки транспортируют связанный продукт слияния IL-12 в опухоли, где он может действовать паракринным образом.

Целью данного исследования являлось (1) оценить *in vitro* цитотоксичность Т-клеток человека и мыши, нагруженных связанным продуктом слияния IL-12, наногелем на основе IL-15 или их комбинацией (в виде смешанных популяций клеток, Т-клеток, нагруженных связанным продуктом слияния IL-12 или наногелем на основе IL-15; или при условии, в рамках которого оба цитокина загружаются на одни и те же клетки с совместной загрузкой); (2) оценить *in vivo* противоопухолевую активность комбинации нагруженных наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клеток ("DP-15 PMEL") и нагруженных связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клеток ("DP-12 PMEL").

Для *in vivo* анализа комбинации были проанализированы следующие группы, как указано в Таблице 2 ниже: индифферентный контроль (G1), повышение дозировки при одном введении нагруженных связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клеток (1, 2,5 и 5×10^6) (G2-4), группы с тремя комбинациями, где DP-12 PMEL Т-клетки (1, 2,5 или 5×10^6) были добавлены к неизменному количеству нагруженных наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клеток (10×10^6) (G5-7). Кроме того, группы с тремя комбинациями, где PMEL Т-клетки (1, 2,5 или 5×10^6) были добавлены

к неизменному количеству нагруженных наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клеток (10×10^6) (G8-10), служили в качестве контроля для групп 5-7.

Таблица 2: Подвергаемые лечению группы

Группа	N	Лечение	Способ введения	Уровень дозировки	Частота
1	20	Индифферентный контроль (HBSS)	в/в	200 мкл HBSS	Один раз, День 0
2	15	Нагруженные связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клетки	в/в	1×10^6 Т-клеток в 100 мкл HBSS	Один раз, День 0
3	15	Нагруженные связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клетки	в/в	$2,5\times10^6$ Т-клеток в 100 мкл HBSS	Один раз, День 0
4	20	Нагруженные связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клетки	в/в	5×10^6 Т-клеток в 100 мкл HBSS	Один раз, День 0
5	20	Нагруженные наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клетки	в/в	10×10^6 Т-клеток в 100 мкл HBSS	Один раз, День 0
		Нагруженные связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клетки	в/в	1×10^6 Т-клеток в 100 мкл HBSS	Один раз, День 0
6	20	Нагруженные наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клетки	в/в	10×10^6 Т-клеток в 100 мкл HBSS	Один раз, День 0
		Нагруженные связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клетки	в/в	$2,5\times10^6$ Т-клеток в 100 мкл HBSS	Один раз, День 0
7	20	Нагруженные наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клетки	в/в	10×10^6 Т-клеток в 100 мкл HBSS	Один раз, День 0
		Нагруженные связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клетки	в/в	5×10^6 Т-клеток в 100 мкл HBSS	Один раз, День 0
8	20	Нагруженные наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клетки	в/в	10×10^6 Т-клеток в 100 мкл HBSS	Один раз, День 0
		PMEL Т-клетки	в/в	1×10^6 Т-клеток в 100 мкл HBSS	Один раз, День 0
9	19	Нагруженные наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клетки	в/в	10×10^6 Т-клеток в 100 мкл HBSS	Один раз, День 0
		PMEL Т-клетки	в/в	$2,5\times10^6$ Т-клеток в 100 мкл HBSS	Один раз, День 0
10	19	Нагруженные наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клетки	в/в	10×10^6 Т-клеток в 100 мкл HBSS	Один раз, День 0
		PMEL Т-клетки	в/в	5×10^6 Т-клеток в 100 мкл HBSS	Один раз, День 0

Определяемые показатели включали противоопухолевую активность, изменение массы тела, проточную цитометрию крови для оценки изменений уровней эндогенных иммунных клеток

(CD4, CD8, NK and Treg) и перенесенных PMEL Т-клеток (количество, фенотип, активация, пролиферация), химические показатели сыворотки крови (в День 4 и День 11 после введения), общее количество клеток (CBC, в День 1 и День 4 после введения) и системное высвобождение цитокинов (Luminex, в День 1 и День 4 после введения). Кроме того, оценивали общие патологические показатели на основе 4-5 мышей/группе (за исключением групп 2 и 3) в День 4 после введения и при завершении исследования (День 39, 6 мышей/группа из подвергаемых лечению групп, все еще принимавших участие в исследовании). Ход исследования показан на Фиг.14.

Как показано на Фиг.15, противоопухолевая активность групп с комбинацией, где нагруженные наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клетки (10 ×106) вводили совместно с нагруженными связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клетками, которые вводили в количестве 1, 2,5 и 5 $\times 10^6$, демонстрировали значительно более высокую противоопухолевую активность по сравнению с нагруженными наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клетками, которые вводили совместно с PMEL Т-клетками при соответствующих дозировках в виде 1, 2,5 и 5 x 10^6 Т клеток (Фиг.15). Однако в случае группы с комбинацией при наиболее высокой дозировке нагруженных связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клеток (5 $\times 10^6$) комбинация была столь же эффективна, что и один агент в виде нагруженных связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клеток. (Фиг.15, правый график).

Комбинация хорошо переносилась и сопровождалась минимальной потерей массы тела, наблюдаемой в День 3 после введения, которая полностью возвращалась в к базовым уровням ко Дню 7 после введения (Фиг.16).

Оценка общих патологических показателей в День 4 после введения и при завершении исследования (День 39) демонстрировала отсутствие повреждений во всех подвергаемых лечению группах. Показатели массы легких и мозга во всех подвергаемых лечению группах сравнивали с подвергаемыми действию индифферентного контроля мышами. Присутствовало повышение массы селезенки в группах с комбинацией в отличие от группы с индифферентным контролем (Фиг.17, слева). Показатели массы селезенки в подвергаемых лечению группах были схожими среди групп при завершении исследования и аналогичными показателям подвергаемых действию индифферентного контроля мышей такого же возраста (Фиг.17, справа).

Как показано на Фиг.18А, статистически значимые изменения клинических химических параметров между группами с комбинацией (5-7) и контрольными группами при одинаковых дозировках клеток (8-10) не наблюдались ни в День 4, ни в День 11 после введения. Анализ на основе проточной цитометрии показал отсутствие значимых различий между группами с комбинацией (5-7) и контрольными группами при одинаковых дозировках клеток (8-10) в плане общего приживления PMEL Т-клеток или эндогенных Т-клеток (CD4, CD8, NK и Treg). Анализ фенотипа PMEL Т-клеток с течением времени показал относительное повышение уровня эффекторных Т-клеток памяти (Tem) в группах с комбинацией (5-7) по сравнению с контрольными группами (8-10) при одинаковых дозировках клеток.

В присутствии антигена совместная нагрузка связанного продукта слияния IL-12 и наногеля на основе IL-15 на PMEL Т-клетки приводила с устойчивой активации Т-клеток и улучшенному фенотипу памяти и повышала цитотоксичность in vitro (Фиг.18B).

Материалы и способы

Получение связанного продукта слияния IL-12 и наногеля на основе IL-15

Связанный продукт слияния IL-12 конструировали и использовали для праймирования PMEL Т-клеток в соответствии с предыдущими Примерами. Наногель на основе IL-15 синтезировали путем инкубирования IL15-Fc с обеспечивающим поперечное сшивание реагентом.

Внесение B16-F10 опухолей и измерения опухолей

B16-F10 клетки меланомы (0,8 x 10^6) инъецировали подкожно в побритый правый бок самок мышей C57BL/6 (Jackson Labs) в День -10 исследования. Имеющих B16-F10 опухоли мышей подвергали действию циклофосфамида (4 мг/мышь) за день до введения. Записывали показатели массы тела и размеры опухолей (длина [Д] и ширина [Ш], определенные в перечне аббревиатур) измеряли с помощью циркулей от 2 до 3 раз в неделю. Объем опухолей подсчитывали с помощью формулы: $Ш^2$ x Д x $\pi/6$.

Выделение и экспансия PMEL клеток

PMEL клетки выделяли из селезенок и лимфатических узлов (паховых, подмышечных и шейных) 12 (7 самок и 5 самцов) трансгенных PMEL мышей (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Селезенки и лимфатические узлы обрабатывали с помощью диссоциатора gentleMACS Octo (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) и пропускали через 40 мкм фильтр. Клетки промывали с помощью центрифугирования и очищали $CD8a^+$ клетки с помощью набора для выделения IMACS для наивных $CD8a^+$ клеток (Miltenyi Biotech) и блока MultiMACS Cell24 (Miltenyi Biotech) и сепаратора (Miltenyi Biotech) в соответствии с протоколом производителя. Чистоту $CD8a^+$ клеток подтверждали с помощью проточной цитометрии.

При выделении (День 0), 250 x 10^6 очищенных PMEL Т-клеток ресуспендировали в 1,0 x 10^6/мл в среде 1640 Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) с 10% фетальной коровьей сыворотки (FBS), пенициллином/стрептомицином (Pen/Strep) (1%), L-глутамином (1%), инсулином/трансферрином/селеном (ITS; 1%) и β-меркаптоэтанолом (BME, 50 μM), и наносили на шесть 6-луночных планшетов для тканевой культуры (5 x 10^6/лунка), покрытых антителом против CD3 и антителом против CD28. Клетки инкубировали в течение 24 часов при 37°C и 5% CO_2. IL-2 мыши (20 нг/мл) и IL-7 мыши (0,5 нг/мл) добавляли спустя 24 часа после нанесения на планшеты (День 1). В День 2 и День 3 клетки подсчитывали и разбавляли до концентрации 0,2×10^6 клеток/мл с помощью свежей среды, содержащей IL-21 мыши (25 нг/мл). Клетки собирали в День 4 и ресуспендировали при 100 x 10^6 или 20 x10^6 PMEL Т-клеток/мл в среде для PMEL Т-клеток.

Получение нагруженных наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клеток

PMEL клетки (100 x 10^6 клеток/мл) смешивали с равным объемом наногеля на основе IL-15 (1,36 мг/мл) и инкубировали при вращении в течение 1 часа при 37°C для создания нагруженных наногелем на основе IL-15 PMEL клеток. Нагруженные наногелем на основе IL-15 PMEL клетки промывали (3 раза, сначала средой и затем дважды HBSS) с помощью центрифугирования (500 г) и подсчитывали. Нагруженные наногелем на основе IL-15 PMEL клетки ресуспендировали до конечной концентрации 100 x10^6 клеток/мл для инъецирования в группах 5-10 (100 мкл/мышь, соответствует 10 x 10^6 нагруженным наногелем на основе IL-15 PMEL Т-клеткам).

Получение нагруженных связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клеток

PMEL клетки (20,0 x 10^6 клеток/мл) смешивали с равным объемом связанного продукта слияния IL-12 (250 нМ) и инкубировали при вращении в течение 30 минут при 37°C для создания нагруженных связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клеток. Нагруженные связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клетки промывали (3 раза, два раза средой и один раз HBSS) с помощью центрифугирования (500 г) и подсчитывали. Нагруженные связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клетки ресуспендировали при 10, 25 и 50 x 10^6 нагруженных связанным продуктом слияния IL-12 PMEL Т-клеток для инъецирования в группах 2-7, как указано в таблице выше; 100 мкл/мышь).

Сбор крови

Прижизненные образцы крови (~80 мкл) собирали с помощью подчелюстных проколов. Терминальный забор крови (День 4) осуществляли с помощью сердечных пункций после усыпления с помощью CO_2.

Образцы цельной крови

Для проведения проточной цитометрии и CBC анализа собирали цельную крови в покрытые ЭДТА пробирки (Greiner Bio-One, Monroe, NC). Для CBC анализа образцы крови отправляли в лаборатории IDEXX (Grafton, MA).

Подготовка сыворотки (для Luminex и анализа химических показателей крови)

Для получения образцов сыворотки кровь собирали в пробирки, содержащие активатор свертывания (Greiner Bio-One, Monroe, NC). Пробирки центрифугировали при 10000 g, сывороточный супернатант переносили в предварительно помеченные криопробирки (Greiner Bio-One, Monroe, NC) и хранили при -80°C для будущего анализа. Для анализа химических показателей крови образцы отправляли в лаборатории IDEXX (Grafton, MA).

Окрашивание на основе проточной цитометрии

50 мкл крови от каждого животного переносили в одну лунку планшета с 96 глубокими лунками. Красные кровяные клетки лизировали с помощью гипотонического буфера и промывали дважды. На этапе лизиса красных кровяных клеток в кровь добавляли шарики для подсчета. Оставшиеся клетки промывали трижды в окрашивающем буфере (0.5% BSA, 2 мМ ЭДТА в PBS). Клетки ресуспендировали в мастер-миксе, содержащем антитела для окрашивания (1:100 разбавление в окрашивающем буфере). Реагенты, использованные в рамках протокола проточной

цитометрии, перечислены ниже в Таблице 3. Клетки инкубировали со смесью антител в течение 10 минут при комнатной температуре и защищали от света.

Для внутриклеточного окрашивания на основе антигена клетки промывали трижды буфером для окрашивания, ресуспендировали в растворе для фиксации/повышения проницаемости (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) и инкубировали в течение ночи (4°C). На следующий день образцы центрифугировали и трижды промывали в буфере для повышения проницаемости. Антитела для внутриклеточных маркеров Ki67 и FoxP3 инкубировали с подвергнутыми повышению проницаемости клетками в течение 30 минут при комнатной температуре, защищали от света и дважды промывали в окрашивающем буфере.

Данные в рамках проточной цитометрии собирали на FACSCelesta (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) и анализировали в FlowJo.

Таблица 3: Реагенты для проточной цитометрии

Реактивность (вид)	**Клеточный маркер**	**Флуорофор**	**Производитель**
Мышь	CD45	BV510	Biolegend
Мышь	CD4	AF488	Biolegend
Мышь	CD8a	APC-Cy7	Biolegend
Мышь	CD90.1	AF700	Biolegend
Мышь	NK1.1	BV711	Biolegend
Мышь	CD44	BV605	Biolegend
Мышь	CD62L	BV786	Biolegend
Мышь	CD25	APC	Biolegend
Мышь	CD69	PerCP-Cy5.5	Biolegend
Мышь	Ki67	PE-Cy7	ThermoFisher
Мышь	FoxP3	PE	ThermoFisher
Мышь	Fc-блок	—	Biolegend
—	Мертвые клетки-Zombie Violet	BV421	Biolegend

2. Нагруженные наногелем на основе IL-15 MART-1 Т-клетки обеспечивают синергию с нагруженными связанным продуктом слияния IL-12 MART-1 Т-клетками

Т-клетки человека подвергали тренировки с помощью дендритных клеток (DC), презентирующих иммунодоминантный пептид из MART-1 для получения нацеленных на MART-1 Т-клеток. Подвергнутые тренировке Т-клетки нагружали связанным продуктом слияния IL-12 человека и наногелем на основе IL-15 для получения нагруженных связанным продуктом слияния IL-12 и наногелем на основе IL-15 нацеленных на MART-1 Т-клеток и затем тестировали на

предмет цитотоксичности против SKMEL5, экспрессирующей MART-1 линии раковых клеток человека, либо самостоятельно, или в виде 1:1 комбинации связанного продукта слияния IL-12 : наногеля на основе IL-15. Также тестировали нацеленные на MART-1 Т-клетки, совместно нагруженные как связанным продуктом слияния IL-12, так и наногелем на основе IL-15. Цитотоксичность при различных соотношениях эффектор:мишент измеряли с помощью колориметрического количественного анализа живых клеток и определяли показатели Т-клеток с помощью проточной цитометрии для отслеживания количества и реактивности в отношении антигена Т-клеток в рамках совместной культуры с SKMEL-5 клетками по сравнению с монокультурой.

В День 0 MART-1 имели 82,6% специфичность. Большинство клеток имели фенотипы эффекторной памяти (CD45RO+ CCR7-). Антиген-специфичные MART-1 МТС имели высокий уровень активации (CD25+ CD69+) в День 0 по сравнению с неспецифическими МТС (данные не показаны).

С течением времени (0-6 дней) моно-, комбинированная, и связанная с совместной загрузкой терапия обеспечивает промотирование пролиферации MART-1 клеток при воздействии антигена. Лечение на основе наногеля на основе IL-15, комбинации (смеси), и совместной загрузки обеспечивало сохранение специфичности в отношении антигена при экспансии клеток, в то время как связанный продукт слияния IL-12 обеспечивал сохранение специфичности в отношении антигена на более низком уровне (Фиг.19). Группы со связанным продуктом слияния IL-12, комбинацией (смесью) и совместной нагрузкой демонстрировали намного более повышенную SKMEL-5 цитотоксичность, особенно при низком соотношении E:T и в более поздние моменты времени (Фиг.20).

Клеточная пролиферация, обеспеченная лечением на основе наногеля на основе IL-15, комбинации (смеси) и совместной загрузки, приводила к получению схожих фенотипов Т-клеток и состояний активации. Группы с наногелем на основе IL-15, комбинацией (смесью) и совместной загрузкой имели схожий профиль клеточной экспансии, состояние активации и фенотипы (Фиг.21). Для понимания намного более высокой цитотоксичности в группах со связанным продуктом слияния IL-12/совместной загрузкой/смесью проводили количественный анализ интерферона-гамма (IFN-гамма), секретируемого в супернатантах клеточной культуры (Фиг.22). Группы с наногелем на основе IL-15, комбинацией (смесью) и совместной загрузкой имели повышенное продуцирование IFN-гамма, в то время как нагруженные наногелем на основе IL-15 MART-1 клетки продуцировали низкий уровень IFN-гамма. MART-1 клетки с комбинацией (смесью) и совместной загрузкой продолжали обеспечивать продуцирование IFM-гамма между Днем 1 и Днем 6 даже при соотношении E:T 10:1, при этом все опухолевые клетки были уничтожены в День 1.

При различных соотношениях E:T и в рамках всех подвергаемых лечению групп практически полное уничтожение SKMEL-5 наблюдали в раннее время, ко Дню 1 или Дню 3. Клеточная пролиферация достигала пика в День 3 (Фиг.23A), при этом популяция реактивных

MART-1 клеток сохранялась при экспансии (Фиг.21). В День 3 имеющие нагруженную поверхность MART-1 Т-клетки имеют >80% фенотипы эффекторной памяти и имеют >80% CD25+CD69+ состояние активации. В День 3 совместного культивирования Т-клетки удаляли из планшета для совместного культивирования и переносили в свежую культуру SKMEL-5 для их повторной обработки для количественного анализа цитотоксичности. Спустя три дня после повторной обработки, особенно при низком соотношении E:T, комбинированные (смешанные) и подвергнутые совместной нагрузке MART-1 клетки демонстрировали повышенную цитотоксичность в отношении SKMEL-5 по сравнению с нагруженными связанным продуктом слияния IL-12 или наногелем на основе IL-15 Т-клетками самостоятельно.

Фиг.23B: связанный продукт слияния IL-12 повышает цитотоксичность Pmel клеток. Лечение с использованием совместной загрузки повышает цитотоксичность Pmel клеток, нагруженных наногелем на основе IL15. Как показано на **Фиг.23B**, полное уничтожение опухоли было достигнуто в группах, получавших связанный продукт слияния IL-12, и группах с совместной загрузкой ко Дню 2. Связанный продукт слияния IL-12 повышает продуцирование IFNg и цитотоксическую активность. Рост опухоли наблюдался у контрольной и получавшей наногель на основе IL-15 группе ко Дню 5.

Фиг.23C: Опосредованная совместной загрузкой цитотоксичность клеток-мишеней при низком соотношении E:T. Как показано на **Фиг.23C**, *наногель на основе IL-15* теряет преимущество в виде долговременной цитотоксичности при снижении соотношения E:T. Условие в виде *совместной загрузки наногеля на основе IL15 + IL12 TF* демонстрирует преимущество в виде индуцированной устойчивой цитотоксичности по сравнению с монотерапией.

Фиг.23D: Комбинирование наногеля на основе IL-15 + IL-12 TF: повышенная активность по сравнению с отдельными агентами. Как показано на **Фиг.23D**, наногель на основе IL-15, IL-12 TF, и презентирование антигена демонстрировало неожиданное повышение долговременной устойчивости PMEL Т-клеток в крови. Группы с совместной загрузкой (15M) и комбинацией (наногель на основе IL-15 10M + IL-12TF 5M) демонстрируют схожую противоопухолевую активность. Группы с комбинацией демонстрируют повышенную активность по сравнению с отдельными агентами.

Фиг.23E: Комбинированное лечение обеспечивает устойчивую клеточную экспансию антиген-специфических клеток и повышает цитотоксичность. Как показано на **Фиг.23E**, наногель на основе IL-15 повышает антиген-специфичную клеточную экспансию МТС, нагруженных IL-12 TF. IL-12 TF повышает продуцирование IFNg и повышает цитотоксичность в клетках, нагруженных наногелем на основе IL-15.

Фиг. 23F: Полезный синергичный эффект наблюдался у клеток с совместной загрузкой при низком уровне наногеля на основе IL-15 и IL-12 TF. Как показано на **Фиг.23F**, при определении оптимальных нагрузочных дозировок наногеля на основе IL-15 и IL-12 TF для образцов с совместной нагрузкой более низких доз каждой монотерапии может быть достаточно для достижения того же синергичного эффекта.

Фиг.23G: Комбинирование и совместная загрузка демонстрируют повышенную активность по сравнению с IL-12 TF и наногелем на основе IL-15 при том же общем количестве клеток (15 M). * IIL-12 TF 15M группа: вариабельность вызвана 1 мышью с более ранним ускользанием опухоли, чем у других.

Материалы и способы

Получение нацеленных на MART-1 Т-клеток

Аферез здоровых доноров собирали и отправляли с помощью HemaCare, при этом данные клетки впоследствии обозначали как CTL075. Аферез разделяли на основе размера и плотности на шесть фракций с помощью устройства Elutra (Terumo BCT). Фракцию с высоким содержанием Т-клеток (фракцию 3) подвергали снижению объема с помощью устройства Sepax C-Pro в HBSS, замораживали в 20% HBSS и 80% CryoStor10 (CS10, BioLife Solutions) в устройстве с контролируемой скоростью замораживания (CRF) и затем переносили в жидкий азот.

Фракцию с высоким содержанием моноцитов идентифицировали с помощью устройства для подсчета клеток в виде фракции (фракций) Elutra с наиболее высоким процентным содержанием $CD14^+$ клеток при определении с помощью проточной цитометрии. После идентификации и подсчета с помощью AO/PI окрашивания и устройства для подсчета клеток живые клетки промывали в среде для дифференцирования моноцитов (RPMI-1640 с 2% сывороточного АВ человека и 1% GlutaMAX). Богатые моноцитами клетки подсчитывали и переносили в количестве $1{,}16\times10^8$ клеток/пакет в пакеты для дифференцирования клеток (Miltenyi). Объем доводили до 20 мкл с помощью среды для дифференцирования моноцитов в IL-4 (750 МЕ/мл) и GM-CSF (500 МЕ/мл) Далее все клетки размещали в инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 в течение ночи.

Спустя 24 часа клетки с высоким содержанием моноцитов созревали в зрелые дендритные клетки (mDC) за счет добавления 80 мкл среды для дифференцирования моноцитов, содержащей смесь для созревания из IL-1B (1400 МЕ/мл), IL-6 (1100 МЕ/мл), TNF-α (1000 МЕ/мл), и PGE-2 (0,352 мкг/мл). Затем клетки инкубировали при 37°C/5% CO_2 в течение 48 часов.

Зрелые DC собирали с помощью центрифугирования при 500 г в течение 5 минут и промывали в среду для Т-клеток (CTS AIM-V SFM [Thermo Fisher, South San Francisco, CA] с 5% сывороточного АВ человека и 1% GlutaMAX). Затем клетки разбавляли до $5{,}0\times10^6$ клеток/мл и добавляли восстановленный MART-1 пептид (ELAGIGILTV; New England Peptide, Gardner, MA) в культуру при 0,1 мкМ. Клетки помещали в инкубатор на 1 час. Оставшиеся mDC осаждали с помощью центрифугирования, промывали, повторно осаждали, и замораживали в 20% HBSS и 80% CS10.

В это время клетки из фракции с высоким содержанием Т-клеток размораживали вручную в среду для Т-клеток, центрифугировали для удаления DMSO и переносили в пакет PL07 (Origen Biomedical, Austin, TX). Затем клетки разбавляли средой для Т-клеток до $1{,}0\times10^6$ клеток/мл и

добавляли праймирующие цитокины. Далее в Т-клетки добавляли mDC при соотношении 1:10 mDC к Т-клеткам и инкубировали клетки при 37°C/5% CO_2 в течение 4 дней.

После инкубирования в течение четырех дней клетки подсчитывали, образовывали сгусток и ресуспендировали в свежей среде для Т-клеток. Затем клетки разбавляли до $1,0\times10^6$ клеток/мл в среде для Т-клеток с помощью праймирующих цитокинов, помещали в пакет PL07 и инкубировали при 37°C/5% CO_2 в течение 3 дней. В День 7 культивирования Т-клеток клетки подвергали образованию сгустка, ресуспендировали в свежей среде для Т-клеток, разбавляли до $1,0\times10^6$ клеток, высевали в пакет PL07, и добавляли цитокины для экспансии. Ранее замороженные mDC вручную размораживали в среду для Т-клеток, загружали MART-1 пептидом, как описано выше, и помещали непосредственно в культуру Т-клеток при соотношении 1:10 mDC к Т-клеткам. Затем культуру инкубировали при 37°C/5% CO_2 до Дня 11.

В День 11 клетки подсчитывали и доводили культуры до $1,0\times10^6$ клеток/мл в среде для Т-клеток с помощью цитокинов для экспансии перед непрерывным инкубированием при 37°C/5% CO_2. В День 14 клетки собирали, подсчитывали и промывали в среду в для Т-клеток для загрузки связанного продукта слияния IL-12 и анализов совместного культивирования.

Загрузка наногеля на основе IL-15 и связанного продукта слияния IL-12 человека на нацеленные на MART-1 клетки

Загрузку связанного продукта слияния IL-12 и наногеля на основе IL-15 человека на нацеленные на MART-1 Т-клетки осуществляли при 20-40 $x10^6$ клеток в 1,5 мл пробирках Eppendorf. Нацеленные на MART-1 Т-клетки собирали с помощью центрифугирования при 500 g в течение 5 минут, ресуспендировали при 1×10^8 клеток/мл в HBSS и смешивали 1:1 со связанным продуктом слияния IL-12 или наногелем на основе IL-15 до 2x конечной концентрации загрузки. Наногель на основе IL-15 загружали в HBSS раствор до конечной концентрации 50 $x10^6$/мл клеток, 0,375 мг/мл наногеля на основе IL-15 и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Нацеленные на MART-1 Т-клетки нагружали связанным продуктом слияния IL-12 в растворе HBSS+10%HSA до конечной концентрации 25 $x10^6$/мл клеток, связанным продуктом слияния IL-12 при 125 нМ, и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. На нагруженные наногелем на основе IL-15 нацеленные на MART-1 Т-клетки загружали связанный продукт слияния IL-12 в растворе HBSS+10%HSA до конечной концентрации 25 $x10^6$/мл клеток, связанный продукт слияния IL-12 при 125 нМ, и инкубировали при 37°C в течение 30 минут для создания Т-клеток, совместно нагруженных связанным продуктом слияния IL-12/наногелем на основе IL-15. Далее клетки промывали путем начального обеспечивающего разбавление промывания, центрифугировали при 500 g в течение 5 минут и промывали второй раз средой AIM5 для Т-клеток. Совместно нагруженные Т-клетки разбавляли 1:4 в среде для Т-клеток, подсчитывали, и доводили до 5×10^4 клеток/мл в среде для Т-клеток перед последовательными разбавлениями и высеванием в рамках анализа на основе совместного культивирования.

Анализ специфичности в отношении MART-1, загрузки поверхности связанным продуктом слияния IL-12 и наногелем на основе IL-15, и количества Т-клеток с помощью проточной цитометрии

Связанный продукт слияния IL-12 или наногель на основе IL-15 загружали на нацеленные на MART-1 Т-клетки в день, как описано выше. После загрузки три образца в виде 1×10^4 Т-клеток на одну загрузку переносили в 96-луночные планшеты. Были подготовлены два подобных планшета.

Один планшет подвергался окрашиванию с помощью:

BV421 CD25 (0,5 мкл/образец)

BV711 CD69 (0,5 мкл/образец)

PE/Cy7 CD62L (0,5 мкл/образец)

FITC CD4 (0,5 мкл/образец)

BV605 CD45RO (0,5 мкл/образец)

BV785 CD8 (0,5 мкл/образец)

HLA-A*02:01 MART-1 тетрамер (1:100 разбавление) (MBL, Woburn, MA)

PercpCy5.5 IL137 (1:100 разбавление)

AF647 анти-IL12 (1:100 разбавление)

AF700 CD3 (0,5 мкл/образец)

APC-Cy7 CCR7 (1 мкл/образец)

Zombie Aqua (1:500 разбавление)

Реагенты были получены от Biolegend (Biolegend, San Diego, CA), если не указано иное. Для CD25,CD69, CD62L, CD137, CCR7 и CD45RO были реализованы контроли типа Флуоресценция минус один (Fluorescence Minus One; FMO; окрашивание клеток всеми флуорохромами, использованными в эксперименте, кроме одного).

Другой планшет подвергался окрашиванию с помощью:

FITC CD4 (0,5 мкл/образец)

BV711 CD8 (0,5 мкл/образец)

BV785 CD8 (0,5 мкл/образец)

PE IL15 (1:100 разбавление)

AF647 anti-IL12 (1:100 разбавление)

AF700 CD3 (0,5 мкл/образец)

Zombie Aqua (1:500 разбавление)

В моменты времени в виде Дня 1, 3, или 4 и 6 совместного культивирования или параллельного монокультивирования в 96-луночных планшетах с плоским дном все Т-клетки в культуральном супернатанте переносили в новые 96-луночные планшеты с U-образным дном как из планшета с монокультурой Т-клеток, так и планшета с совместной культурой с клетками-мишенями. Планшеты с плоским дном использовали для MTT анализа (см. ниже). Планшеты с U-

образным дном подвергали центрифугированию при 500 g в течение 5 минут. Культуральные супернатанты собирали для ELISA IFNγ (см. ниже):

BV421 CD25 (0,5 мкл/образец)

PE/Cy7 CD62L (0,5 мкл/образец)

FITC CD4 (0,5 мкл/образец)

BV711 CD8 (0,5 мкл/образец)

BV605 CD45RO (0,5 мкл/образец)

BV785 CD8 (0,5 мкл/образец)

PE tetramer (1:100 разбавление)

PercpCy5.5 IL137 (1:100 разбавление)

AF647 anti-IL12 (1:100 разбавление)

AF700 CD3 (0,5 мкл/образец)

Zombie Aqua (1:500 разбавление)

5 мкл шариков для подсчета клеток CountBright (LifeTechnologies) в расчете на одну лунку в окрашивающем буфере (PBS с 2 мМ ЭДТА и 2% FBS) добавляли после смывания окрашенного антитела.

Образцы анализировали на проточном цитометре FACSCelesta (BectonDickinson) с помощью программного обеспечения FACSDiva (BectonDickinson).

Анализ лизиса опухолевых клеток

MART-1-положительную линию раковых клеток SKMEL-5 человека хранили в соответствии с рекомендациями ATCC. Для прямого анализа цитотоксичности антиген-специфических Т-клеток клетки SKMEL-5 вносили в среду культуры клеток-мишеней (DMEM с 10% FBS, Pen/Strep) в количестве 1×10^4 клеток/лунка в 96-луночных планшетах. После инкубирования в течение ночи при 37°C с покрытием микропористой пленкой среду клеток-мишеней удаляли и добавляли 200 мкл/лунка суспензии Т-клеток в среде для Т-клеток в виде последовательных разбавлений, обеспечивающих соотношения эффектор:мишень 1:1, 1:2, 1:5, и 1:10 в одном эксперименте и 10:1, 1:1, и 1:10 в повторном эксперименте. Было включено условие в виде только клеток-мишеней, служащих в качестве отрицательного контроля. Условиями эффекторных клеток были: (1) MART-1-специфические Т-клетки самостоятельно, (2) нагруженные связанным продуктом слияния IL-12 MART-1-специфические Т-клетки, (3) нагруженные наногелем на основе IL-15 MART-1-специфические Т-клетки, (4) 1:1 комбинация нагруженных связанным продуктом слияния IL-12 MART-1-специфических Т-клеток и нагруженных наногелем на основе IL-15 MART-1-специфических Т-клеток, и (5) MART-1-специфические Т-клетки, совместно нагруженные связанным продуктом слияния IL-12/наногелем на основе IL-15. Только клетки-мишени с 10% DMSO в среде служили в качестве отрицательного контроля без Т-клеточной цитотоксичности. Планшет с монокультурой нацеленных на MART-1 Т-клеток также был покрыт 200 мкл/лунка тех же суспензий Т-клеток. После добавления Т-клеток

планшет центрифугировали при 100 g в течение 1 минуты и инкубировали при 37°C с покрытием микропористой пленкой. Технические тройные образцы использовали для колориметрического исследования цитотоксичности.

Спустя 1, 3 или 5, и 6 дней содержащие Т-клетки культуральные супернатанты переносили в новый 96-луночный планшет и использовали для анализа с использованием проточной цитометрии (как описано выше). Клетки-мишени осторожно промывали один раз PBS. Добавляли раствор 0,5 мг/мл MTT (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолилбромид, Sigma) в среду клеток-мишеней (100 мкл/лунка), при этом планшеты инкубировали при 37°C в течение 1,5 часа в то время как в живых клетках образовывались кристаллы формазана фиолетового цвета. Спустя 1,5 часа среду с MTT удаляли и осторожно промывали клетки PBS. Добавляли DMSO (100 мкл/лунка) для растворения кристаллов формазана. Абсорбцию при 570 нм считывали на сканере для планшетов Tecan. Для анализа количества клеток-мишеней вычитали фоновый сигнал (из 0% живых значений DMSO в лунках с культуральной средой) и подвергали значения нормализации относительно 100% живых значений только из лунок, содержащих клетки-мишени SKMEL-5 (но не Т-клетки).

Для условия в виде повторного анализа спустя 4 дня содержащие Т-клетки супернатанты среды переносили в новый планшет с плоским дном с SKMEL-5 для повторной обработки Т-клеток новыми опухолевыми мишенями в рамках совместной культуры. В тот день все еще присутствовали повторные планшеты для продолжения исходного курса до дня 6.

Анализ секретирования IFNγ

В моменты времени, соответствующие Дню 1, 4 и 6, супернатант клеточной среды, удаленный из клеток, подвергнутых образованию сгустка для проточной цитометрии (см. выше), сохраняли для количественного анализа IFNγ с помощью ELISA с использованием набора для ELISA IFNγ человека (R&D Systems, Minneapolis, MN) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы разбавляли 1:4 и 1:10 в поступающем разбавителе до концентраций в рамках линейного диапазона анализа. Абсорбцию измеряли на сканере для планшетов Tecan Infinite M200.

Связанные с проточной цитометрией данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo v10 (BD Biosciences, San Jose, CA) и подготавливали графики с помощью GraphPad Prism v7.0. Анализ ELISA осуществляли с помощью GraphPad Prism v7.0.

МОДИФИКАЦИИ

Модификации и вариации описанных способов и композиций согласно настоящему изобретению будут очевидны специалистам в данной области без выхода за рамки объема и духа изобретения. Несмотря на то, что изобретение было описано в плане конкретных вариантов осуществления, следует понимать, что изобретение в рамках формулы изобретения не должно неоправданным образом ограничиваться подобными конкретными вариантами осуществления.

Действительно, различные модификации описанных вариантов реализации изобретения являются намеренными и очевидными специалистам в области, к которой относится изобретение, и находятся в рамках объема изобретения, как следует из нижеследующей формулы изобретения.

ВКЛЮЧЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ССЫЛКИ

Все патенты и публикации, упомянутые в данном описании, приведены здесь в качестве ссылки в том же контексте, как если бы отдельный патент и публикация была бы конкретно и отдельным образом указана в виде включенной в качестве ссылки. Международные PCT заявки PCT/US2018/040777, PCT/US2018/040783, PCT/US2018/040786, PCT/US2018/049594, PCT/US2018/049596 и PCT/US2019/050492 полностью приведены здесь для ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Терапевтическая (например предназначенная для иммунотерапии рака) композиция, включающая: первую иммунную клетку, имеющую поверхность, нагруженную множеством белковых наногелей, и вторую иммунную клетку, имеющую поверхность, нагруженную множеством иммуностимулирующих слитых молекул (IFM).

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что каждый белковый наногель включает множество терапевтических мономеров белка, обратимо поперечному связанных друг с другом с помощью множества биорасщепляемых поперечных линкеров, при этом белковый наногель имеет размер от 30 нм до 1000 нм в диаметре при измерении на основе динамического рассеяния света, при этом поперечный линкер расщепляется после введения нуждающемуся в этом субъекту при физиологических условиях с высвобождением терапевтических мономеров белка из белкового наногеля, при этом необязательно белковый наногель дополнительно включает модификацию поверхности, такую как поликатион, для обеспечения связывания белкового наногеля с первой иммунной клеткой.

3. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что каждая IFM сконструирована для включения иммуностимулирующей цитокиновой молекулы и фрагмента для нацеливания (например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента), имеющего аффинность к антигену на поверхности второй иммунной клетки, при этом иммуностимулирующая цитокиновая молекула является функционально связанной с фрагментом для нацеливания.

4. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что первая иммунная клетка и вторая иммунная клетка представляют собой одну и ту же клетку.

5. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что первая иммунная клетка и вторая иммунная клетка представляют собой разные клетки и поступают и вводятся по отдельности (например последовательно) пациенту, нуждающемуся, например, в раковой иммунотерапии.

6. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что терапевтические мономеры белка включают одну или несколько цитокиновых молекул и/или одну или несколько костимулирующих молекул, при этом:

(i) указанная одна или несколько цитокиновых молекул выбраны из IL-15, IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, IL-4, IL-1альфа, IL-1бета, IL-5, IFNгамма, TNFa, IFNальфа, IFNбета, GM-CSF, или GCSF; и

(ii) указанная одна или несколько костимулирующих молекул выбраны из CD137, OX40, CD28, GITR, VISTA, антитела против CD40, или CD3.

7. Композиция по п.3, отличающаяся тем, что в IFM иммуностимулирующая цитокиновая молекула выбрана из одной или нескольких из IL-15, IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, или IL-27 или их вариантных форм, и отличающаяся тем, что антиген выбран из одного или нескольких из CD45, CD4, CD8, CD3, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD25, CD127, CD19, CD20, CD22, HLA-DR, CD197, CD38, CD27, CD196, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CD84, CD229, CCR1, CCR5, CCR4, CCR6, CCR8, CCR10, CD16, CD56, CD137, OX40, или GITR.

8. Способ осуществления иммунотерапии рака, включающий:

введение нуждающемуся в этом пациенту множества иммунных клеток, каждая из которых нагружена первым множеством белковых наногелей и вторым множеством иммуностимулирующих слитых молекул (IFM).

9. Способ осуществления иммунотерапии рака, включающий:

введение нуждающемуся в этом пациенту первого множества иммунных клеток, каждая из которых нагружена множеством белковых наногелей; и

введение пациенту второго множества иммунных клеток, каждая из которых нагружена множеством иммуностимулирующих слитых молекул (IFM).

10. Способ по п.8 или 9, отличающийся тем, что иммунотерапия рака предназначена для лечения рака, выбранного из рака груди, простаты, легкого, яичника, шейки, кожи, меланомы, рака толстой кишки, желудка, печени, пищевода, почки, горла, щитовидной железы, поджелудочной железы, яичка, рака костей, лейкемии, хронического лимфолейкоза, базально-клеточной карциномы, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, рака головного мозга и центральной нервной системы (ЦНС), хориокарциномы, колоректального рака, рака соединительной ткани, рака эндометрия, рака глаза, рака головы и шеи, рака желудка, интраэпителиального новообразования, рака гортани, лимфомы, нейробластомы, рака губы, языка, рта и глотки, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, рака прямой кишки, саркомы, рака кожи, рака щитовидной железы, и рака матки.

11. Способ индуцирования синергичной экспансии $CD8^+$ Т-клеток человека в рамках иммунотерапевтического курса лечения человека, при этом указанный курс лечения состоит из совместного введения, по меньшей мере, двух иммунных агонистов, при этом первый иммунный агонист включает Т-клетку, нагруженную связанным продуктом слияния IL-12, а второй иммунный агонист включает Т-клетку, нагруженную наногелем на основе IL-15, при этом совместное введение подобных иммунных агонистов приводит к синергичной экспансии указанных $CD8^+$ Т-клеток человека.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что Т-клетка, нагруженная связанным продуктом слияния IL-12, Т-клетка, нагруженная наногелем на основе IL-15, или обе Т-клетки являются специфичными в отношении одного или нескольких опухоль-ассоциированных антигенов.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что опухоль-ассоциированный антиген представляет собой антиген, экспрессируемый при раке, выбранном из рака груди, простаты, легкого, яичника, шейки, кожи, меланомы, рака толстой кишки, желудка, печени, пищевода, почки, горла, щитовидной железы, поджелудочной железы, яичка, головного мозга, и рака костей, лейкемии, хронического лимфолейкоза, базально-клеточной карциномы, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, рака головного мозга и центральной нервной системы (ЦНС), хориокарциномы, колоректального рака, рака соединительной ткани, рака эндометрия, рака глаза, рака головы и шеи, рака желудка, интраэпителиального новообразования, рака гортани, лимфомы, нейробластомы, рака губы, языка, рта и глотки, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, рака прямой кишки, саркомы, рака кожи, рака щитовидной железы, и рака матки.

14. Способ по п.11, отличающийся тем, что связанный продукт слияния IL-12 включает гуманизированное антитело против CD45 или фрагмент антитела, выбранный из Fab, F(ab′)2, Fd, и Fv.

15. Способ по п.11, отличающийся тем, что наногель на основе IL-15 включает множество поперечно связанных мономеров IL-15-Fc-слитого белка.

16. Способ лечения рака, включающий одновременное введение нуждающемуся в этом млекопитающему синергичного терапевтически эффективного количества двух иммунных агонистов, при этом первый иммунный агонист включает Т-клетку, нагруженную связанным продуктом слияния IL-12, а второй иммунный агонист включает Т-клетку, нагруженную наногелем на основе IL-15.

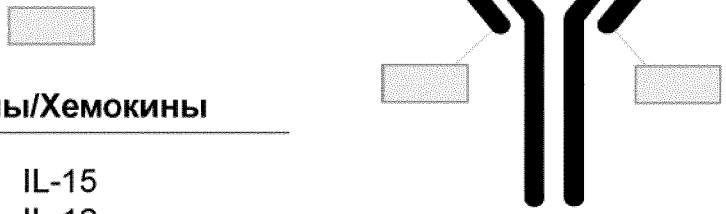
17. Способ по п.16, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой солидную опухоль.

18. Способ по п.16, отличающийся тем, что указанное лечение рака дополнительно предусматривает использование противопролиферативного цитотоксического агента либо самостоятельно, или в комбинации с радиотерапией.

19. Способ по п.16, отличающийся тем, что первый и второй иммунный агонист вводят при соотношении одного иммунного агониста и другого иммунного агониста 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70; 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100, 1:120, 1:130, 1:140, 1:150, 1:160, 1:170, 1:180, 1;190, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10,000, 1:100,000, 2:3, 3:4,

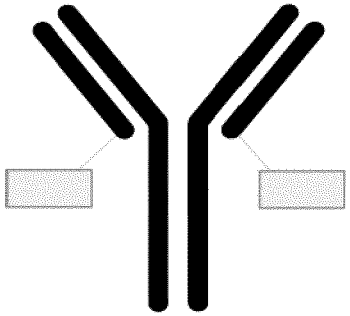
2:5, 3:5, 3:10, 7:10, 9:10, 2:15, 4:15, 6:15, 7:15, 8:15, 11:15, 13:15, 14:15, 3:20, 7:20, 9:20, 11:20, 13:20, 17:20, 19:20, 1:25, 2:25, 4:25, 6:25, 7:25, 8:25, 10:25, 11:25, 12:25, 13:25, 14:25, 16:25, 17:25, 18:25, 19:25, 21:25, 22:25, 23:25, или 24:25.

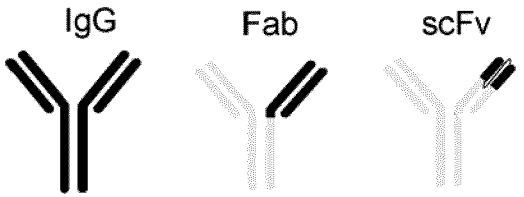
20. Способ по п.16, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один из первого и второго иммунного агониста вводят при дозировке приблизительно 20 миллионов клеток/м^2, 40 миллионов клеток/м^2, 100 миллионов клеток/м^2, 120 миллионов клеток/м^2, 200 миллионов клеток/м^2, 360 миллионов клеток/м^2, 600 миллионов клеток/м^2, 1 миллиард клеток/м^2, 1,5 миллиарда клеток/м^2, 10^6 клеток/м^2, приблизительно 5 x 10^6 клеток/м^2, приблизительно 10^7 клеток/м^2, приблизительно 5 x 10^7 клеток/м^2, приблизительно 10^8 клеток/м^2, приблизительно 5 x 10^8 клеток/м^2, приблизительно 10^9 клеток/м^2, приблизительно 5 x 10^9 клеток/м^2, приблизительно 10^{10} клеток/м^2, приблизительно 5 x 10^{10} клеток/м^2, или приблизительно 10^{11} клеток/м^2.



Цитокины/Хемокины

IL-15
IL-12
IL-21
IL-7
IL-27
IL-2
IL-6
IL-18
IL-23
анти-CD137
анти-CD28



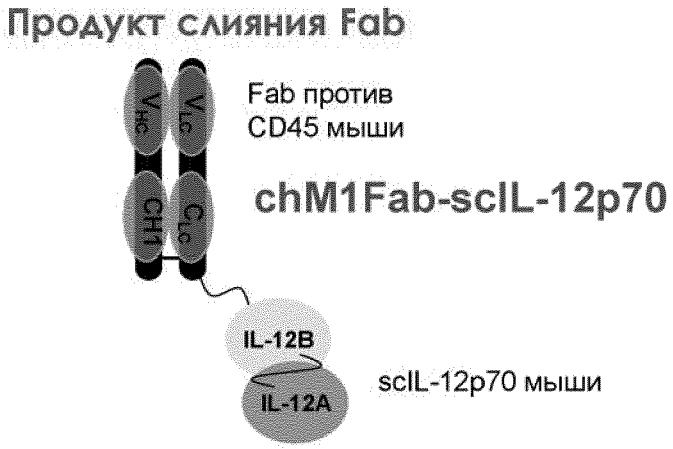


Мишени на клеточной поверхности

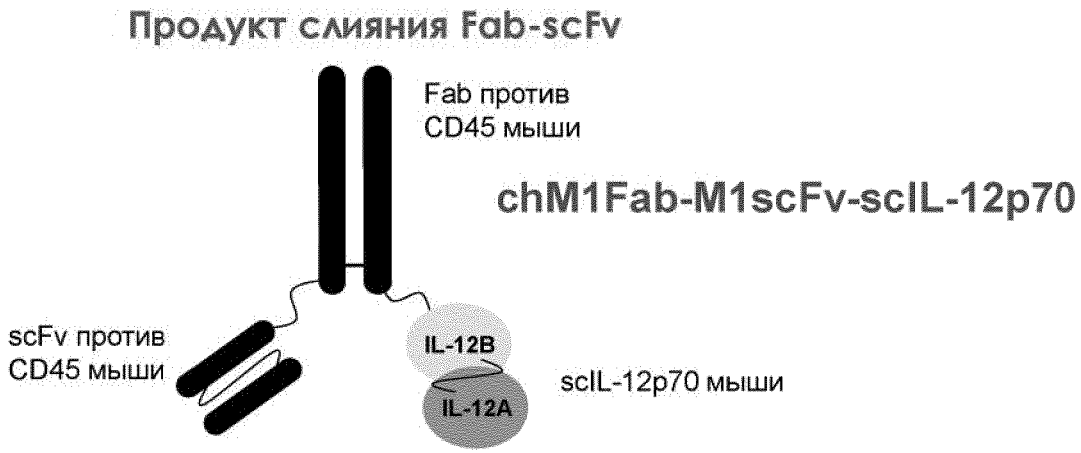
CD2
CD4
CD8
CD11a
CD18
CD20
CD45
CD19
CD56

Фиг. 1

Мышь:

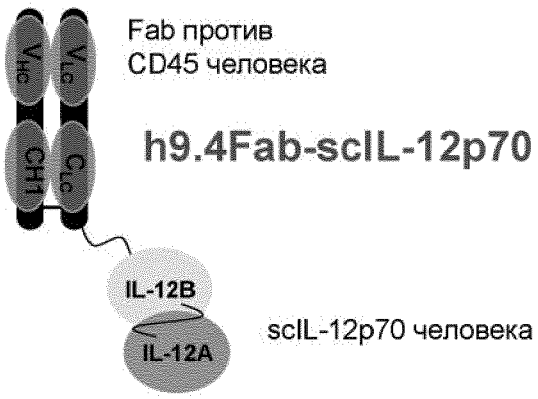


Фиг. 2A

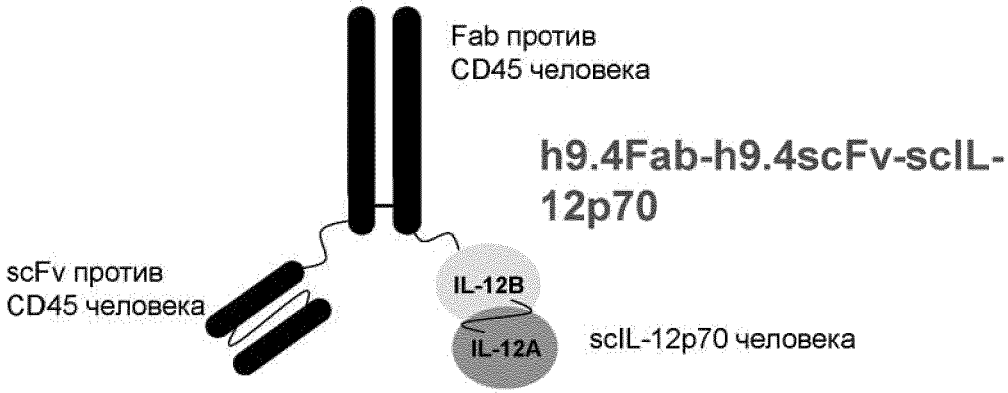


Фиг. 2B

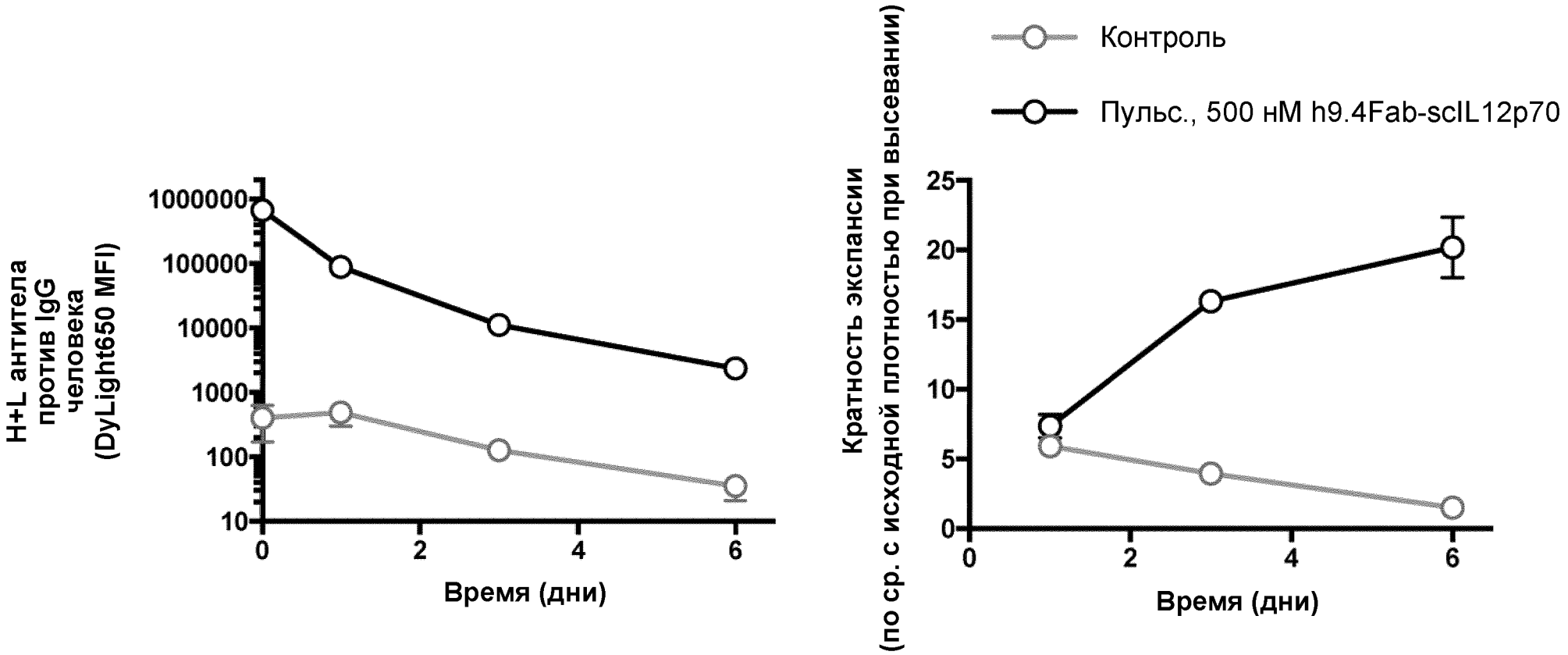
Человек:



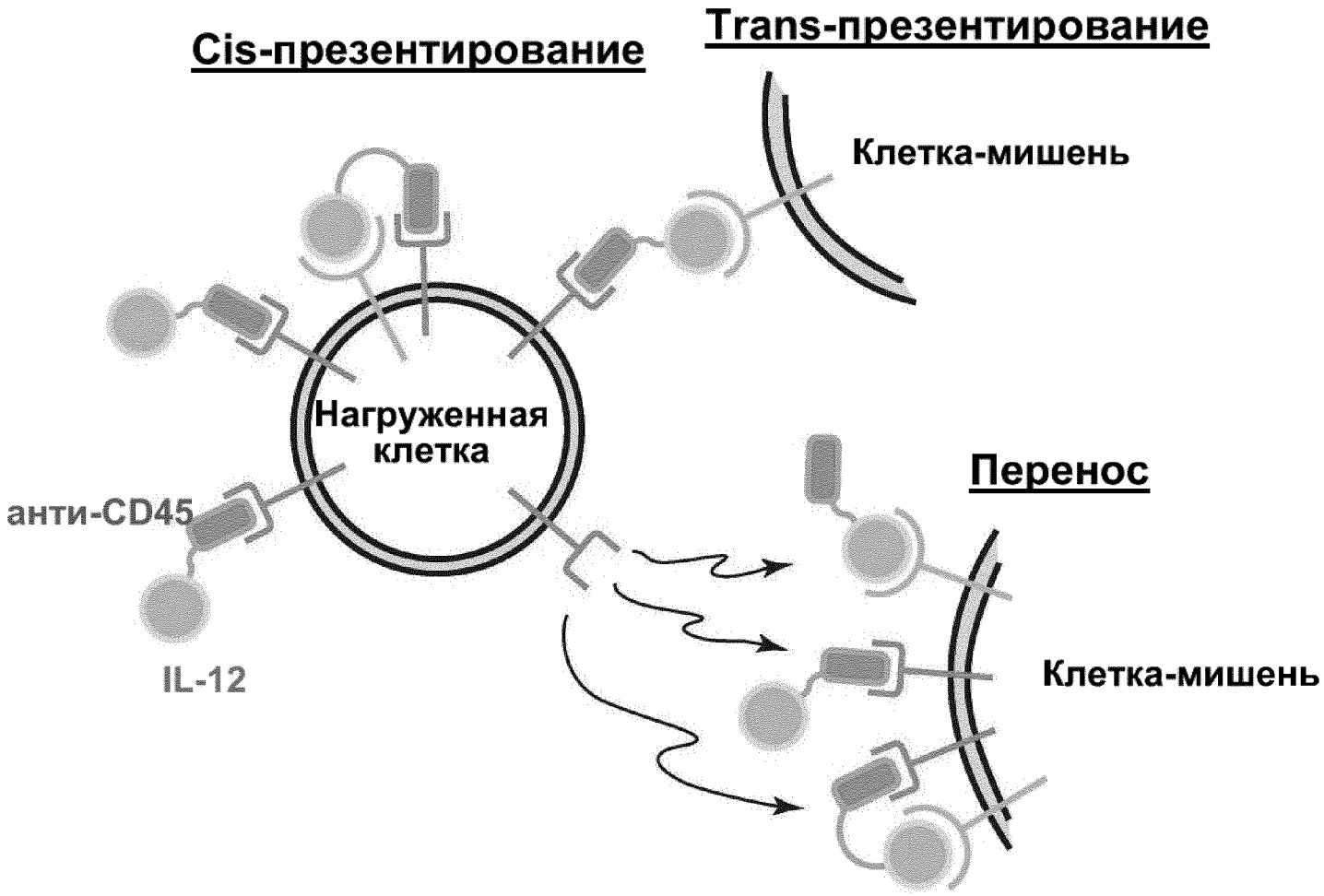
Фиг. 2C



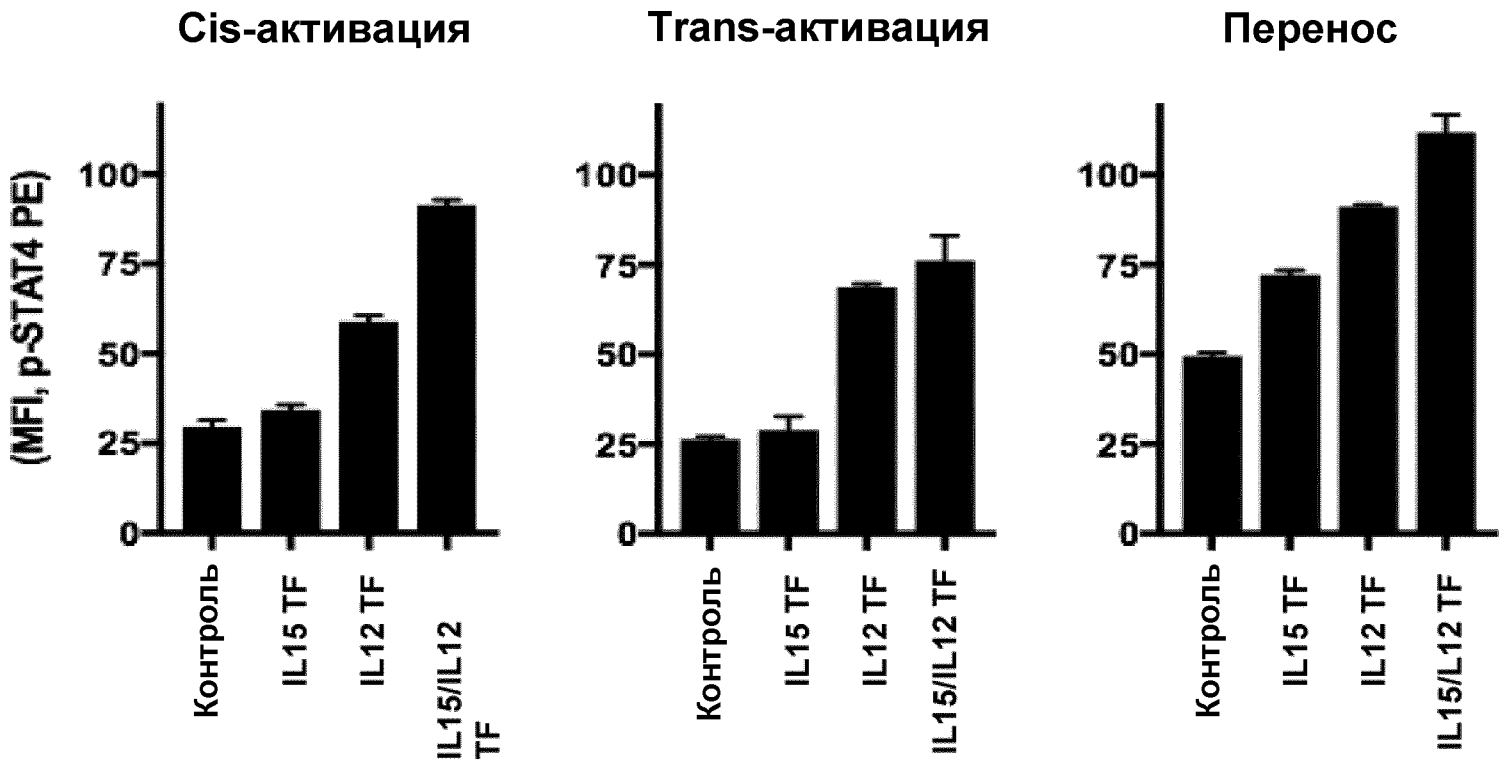
Фиг. 2D


H+L антитела против IgG человека (DyLight650 MFI)
1000000
100000
10000
1000
100
10
0
2
4
6
Время (дни)
Кратность экспансии (по ср. с исходной плотностью при высевании)
Контроль
Пульс., 500 нМ h9.4Fab-scIL12p70
25
20
15
10
5
0
0
2
4
6
Время (дни)

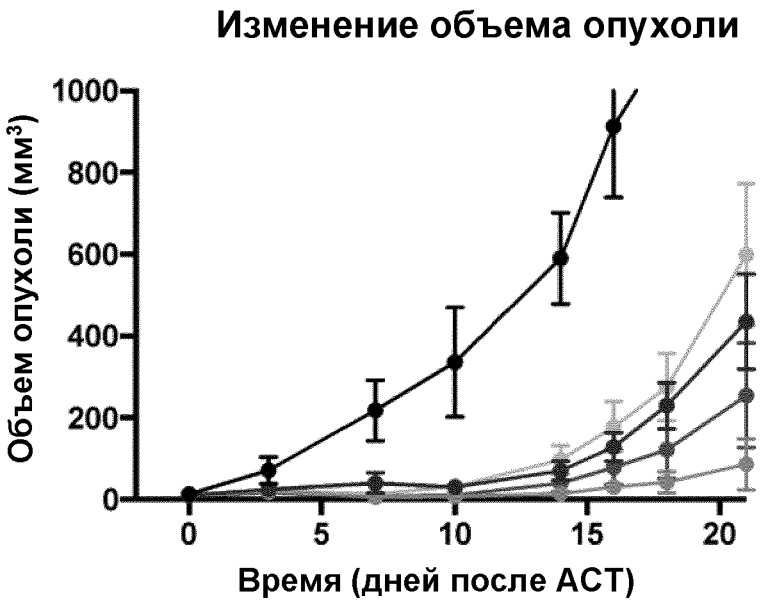
Фиг. 3

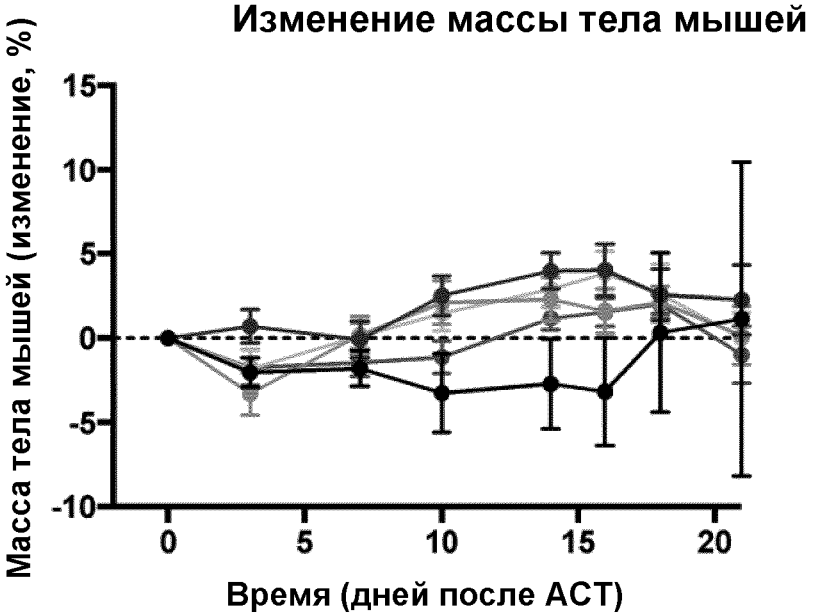

Cis-презентирование
Trans-презентирование
Клетка-мишень
Нагруженная клетка
анти-CD45
IL-12
Перенос
Клетка-мишень

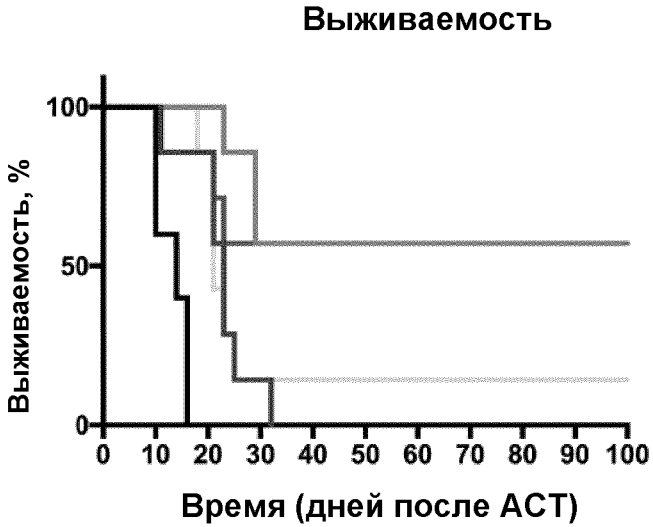
Фиг. 4A


Cis-активация
Trans-активация
Перенос
(MFI, p-STAT4 PE)
100
75
50
25
0
Контроль
IL15 TF
IL12 TF
IL15/IL12 TF

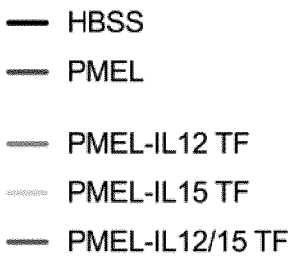
Фиг. 4B



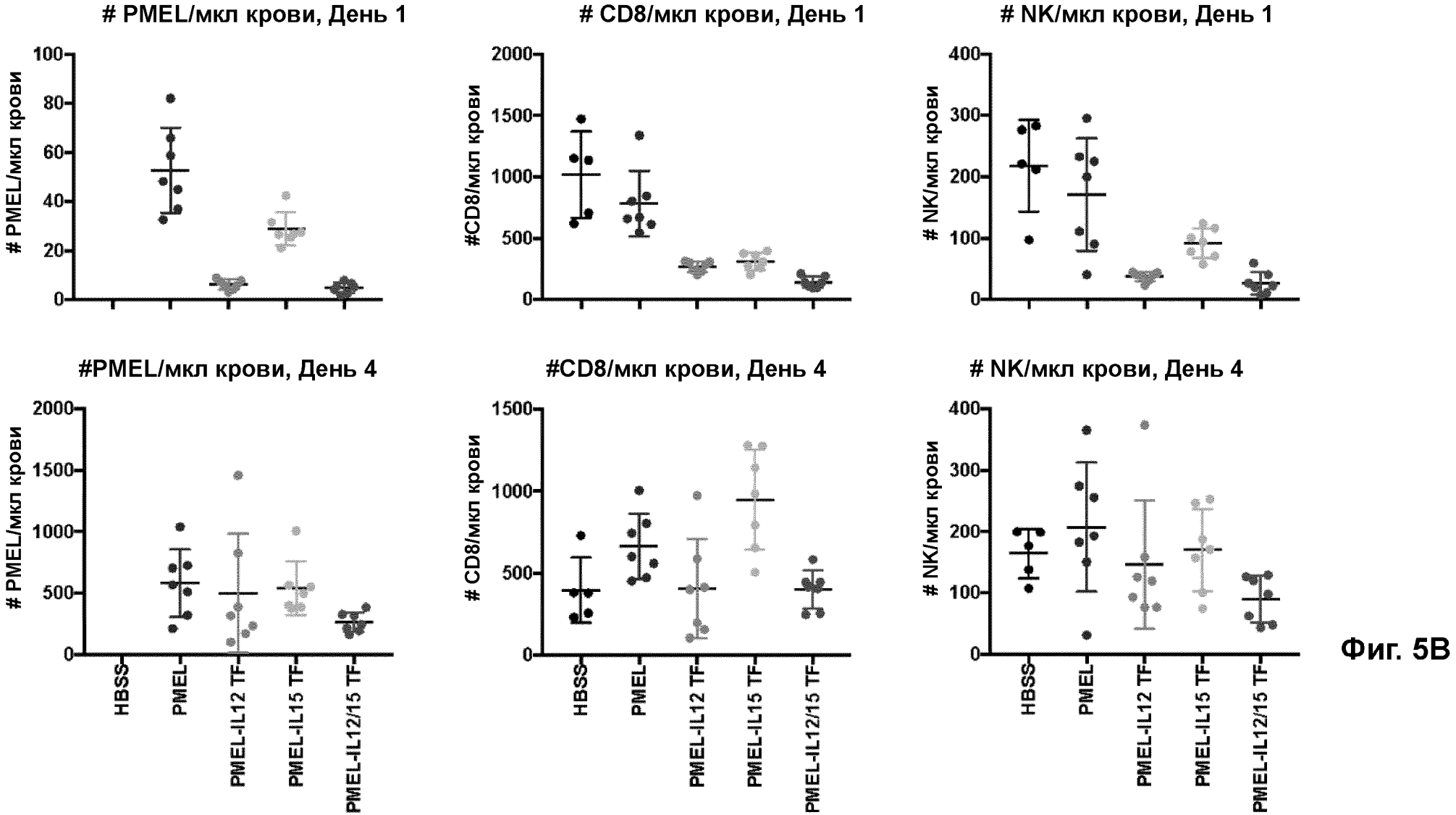




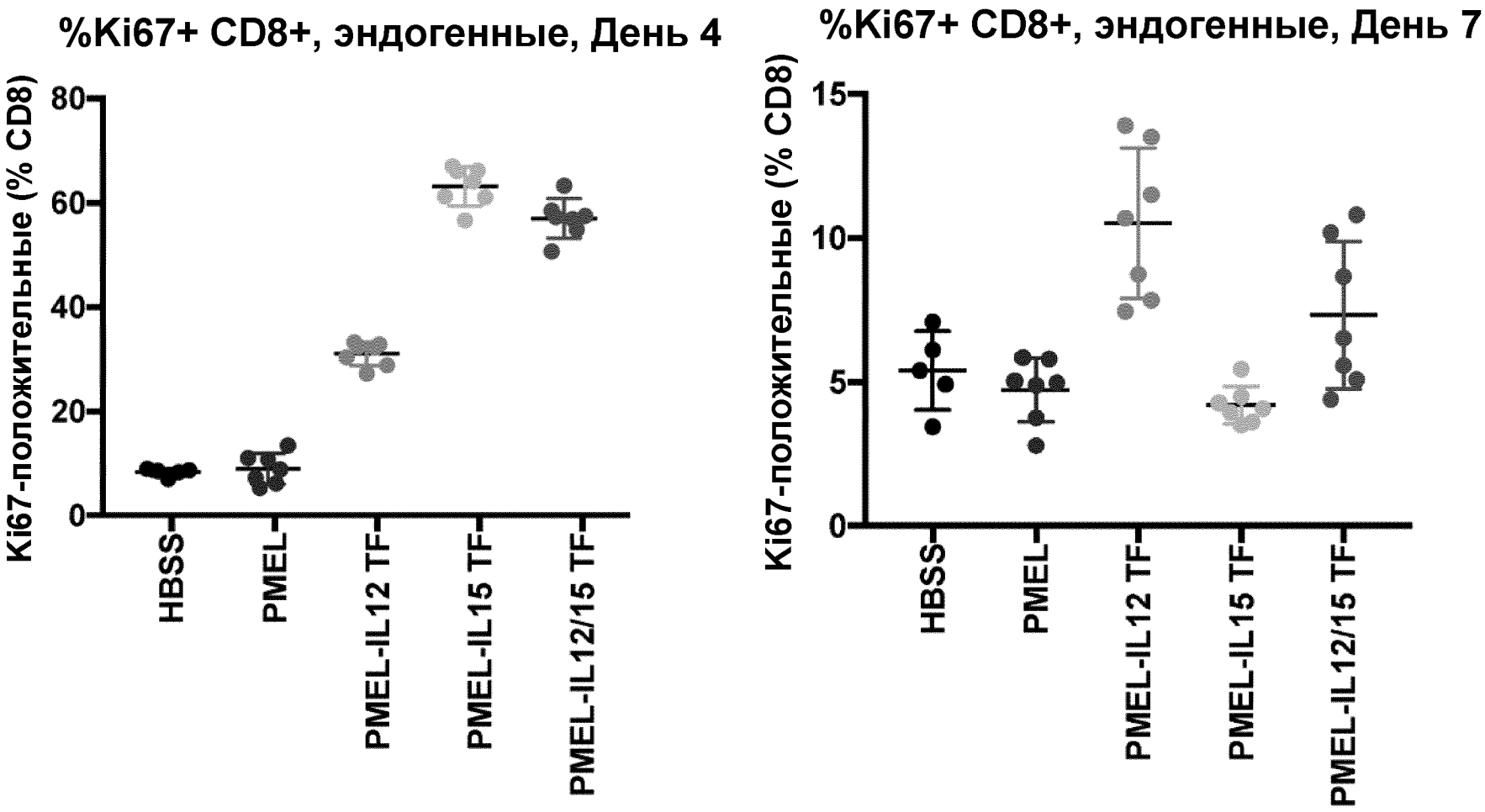
(событие: критерий для эвтаназии или объем опухоли >500 мм³)



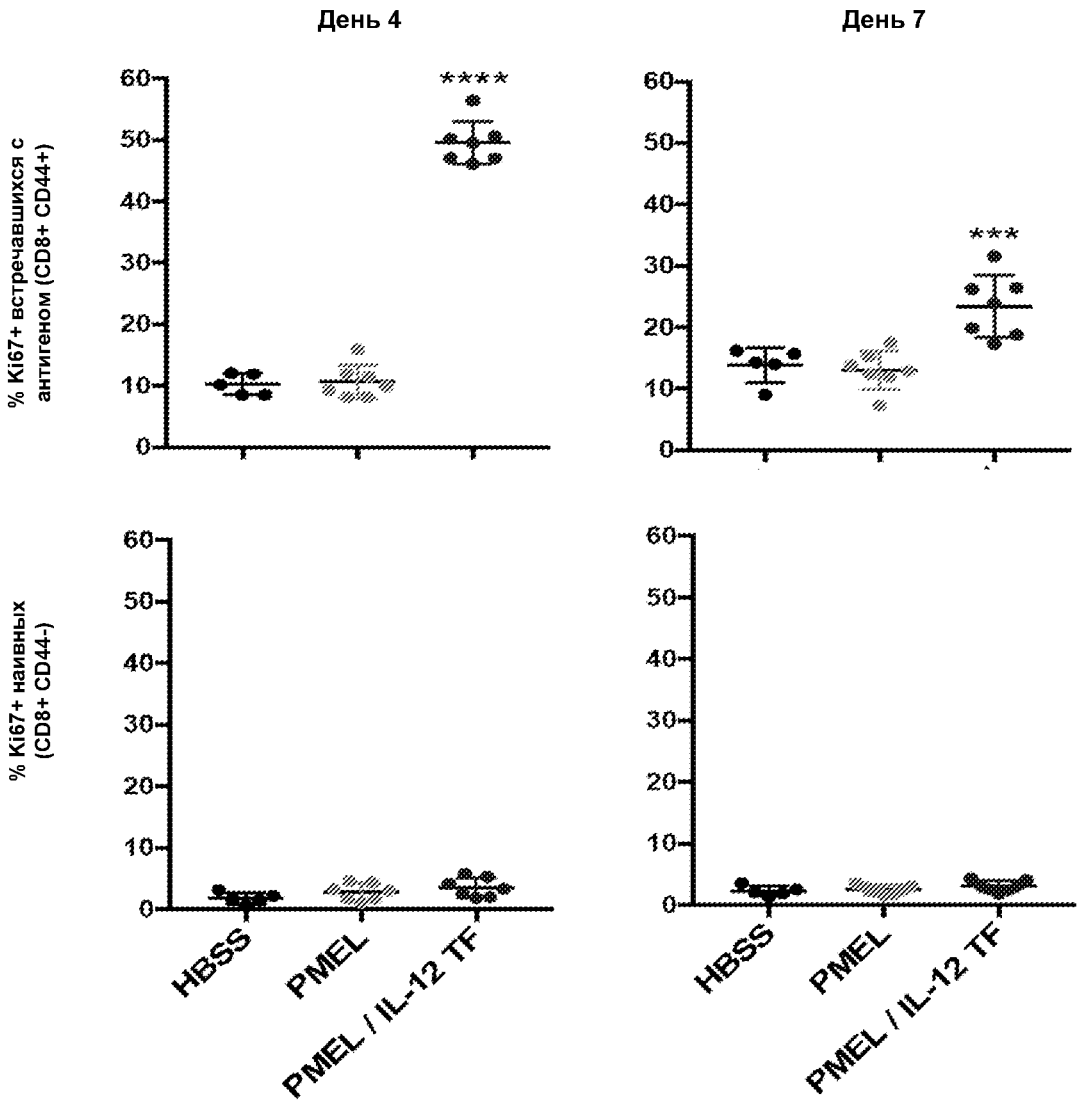
Фиг. 5А


PMEL/мкл крови, День 1
PMEL/мкл крови
100
80
60
40
20
0
CD8/мкл крови, День 1
#CD8/мкл крови
2000
1500
1000
500
0
NK/мкл крови, День 1
NK/мкл крови
400
300
200
100
0
#PMEL/мкл крови, День 4
PMEL/мкл крови
2000
1500
1000
500
0
#CD8/мкл крови, День 4
CD8/мкл крови
1500
1000
500
0
NK/мкл крови, День 4
NK/мкл крови
400
300
200
100
0
HBSS
PMEL
PMEL-IL12 TF
PMEL-IL15 TF
PMEL-IL12/15 TF

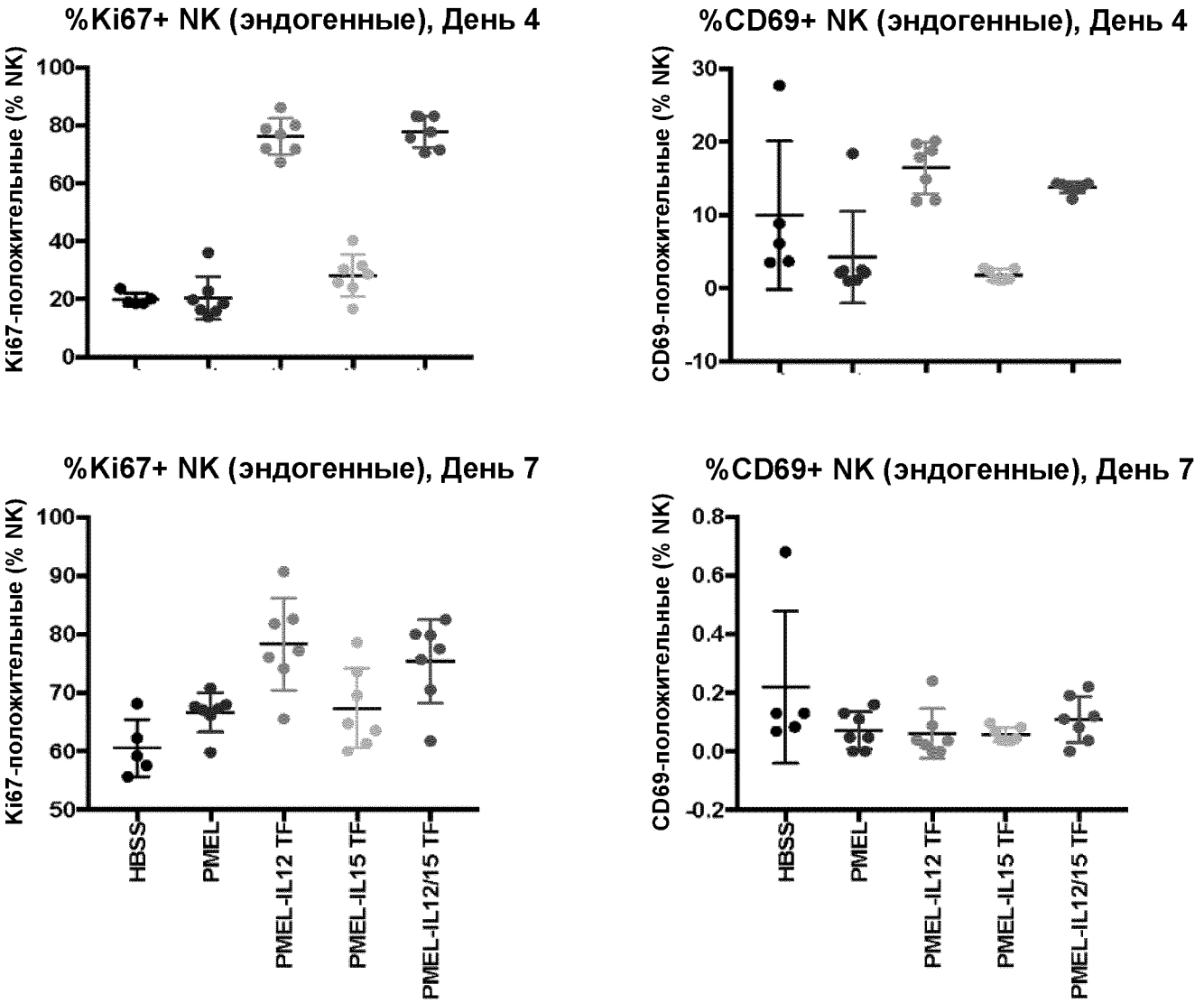
Фиг. 5B


%Ki67+ CD8+, эндогенные, День 4
Ki67-положительные (% CD8)
80
60
40
20
0
HBSS
PMEL
PMEL-IL12 TF
PMEL-IL15 TF
PMEL-IL12/15 TF
%Ki67+ CD8+, эндогенные, День 7
Ki67-положительные (% CD8)
15
10
5
0
HBSS
PMEL
PMEL-IL12 TF
PMEL-IL15 TF
PMEL-IL12/15 TF

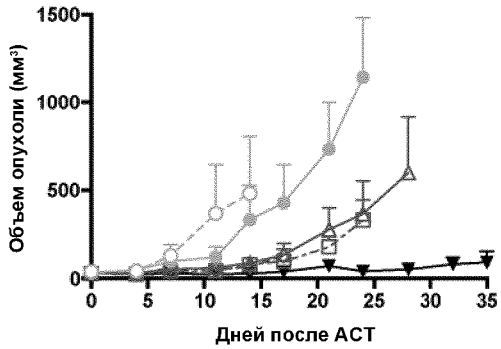
Фиг. 5C

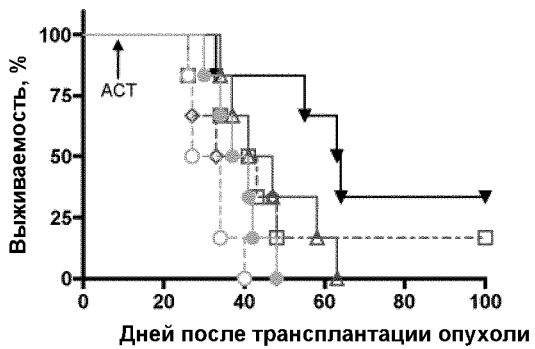

День 4
День 7
% Ki67+ встречавшихся с антигеном (CD8+ CD44+)
% Ki67+ наивных (CD8+ CD44-)
****
***
0
10
20
30
40
50
60
HBSS
PMEL
PMEL / IL-12 TF

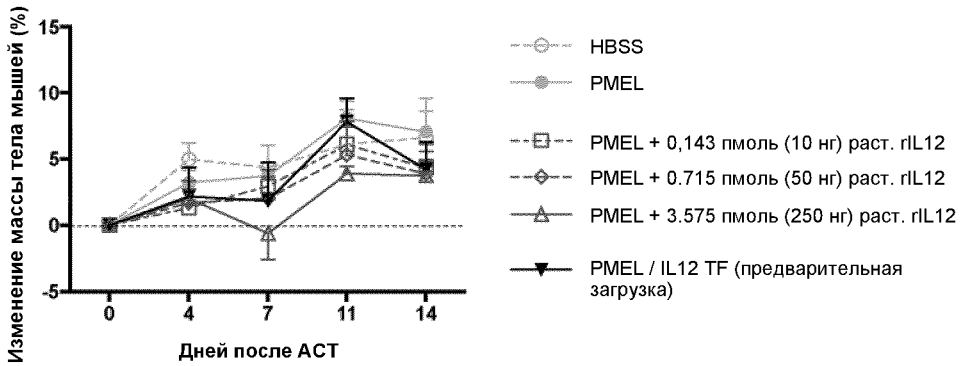
Фиг. 5D

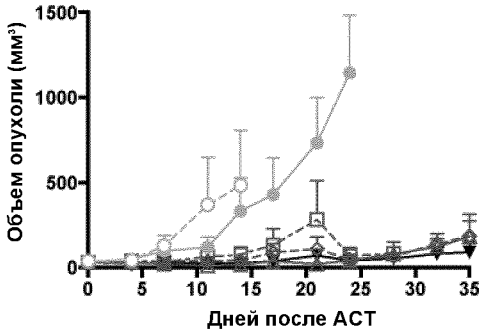

%Ki67+ NK (эндогенные), День 4
Ki67-положительные (% NK)
100
80
60
40
20
0
%CD69+ NK (эндогенные), День 4
CD69-положительные (% NK)
30
20
10
0
-10
%Ki67+ NK (эндогенные), День 7
Ki67-положительные (% NK)
100
90
80
70
60
50
%CD69+ NK (эндогенные), День 7
CD69-положительные (% NK)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
HBSS
PMEL
PMEL-IL12 TF
PMEL-IL15 TF
PMEL-IL12/15 TF

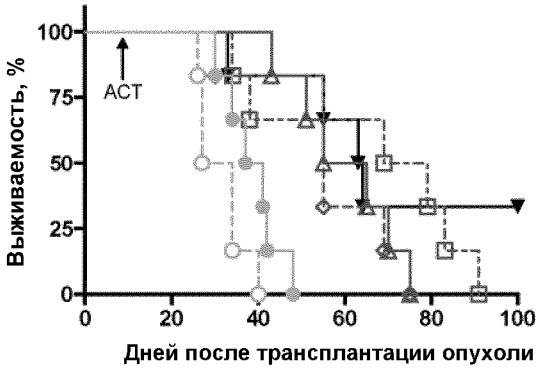
Фиг. 5E

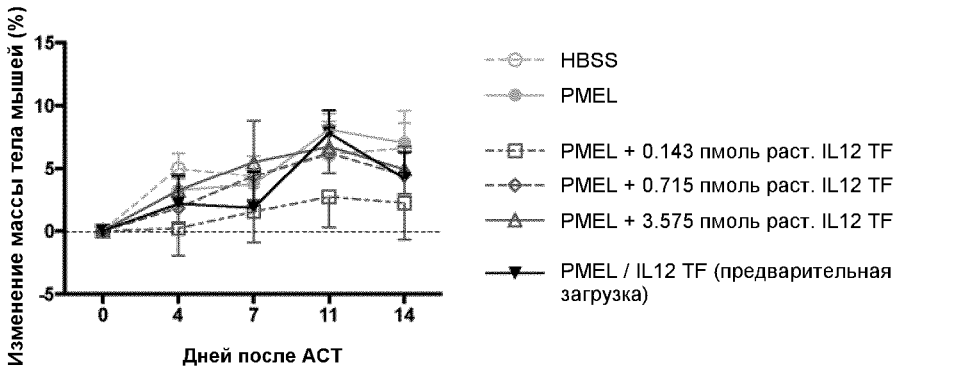

Объем опухоли (мм³)
1500
1000
500
0
0 5 10 15 20 25 30 35
Дней после АСТ


Выживаемость, %
100
75
50
25
0
ACT
0 20 40 60 80 100
Дней после трансплантации опухоли

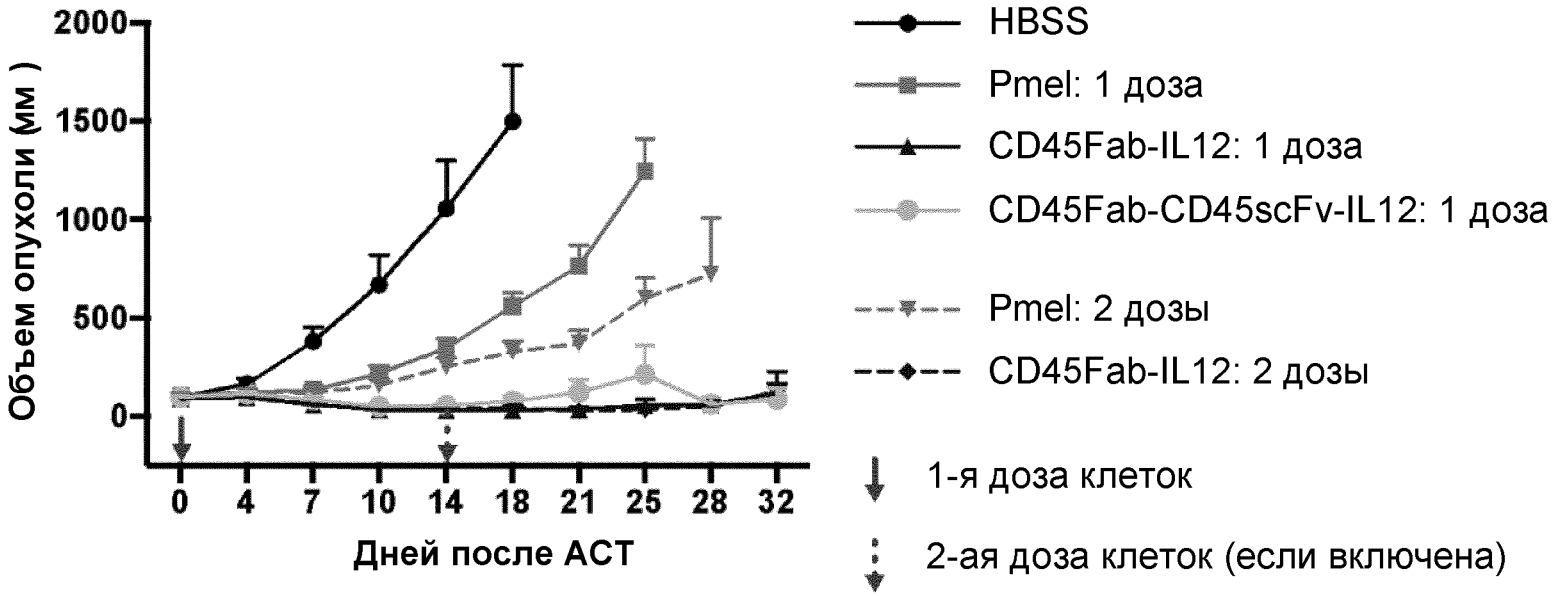

Изменение массы тела мышей (%)
15
10
5
0
-5
0 4 7 11 14
Дней после АСТ
HBSS
PMEL
PMEL + 0,143 пмоль (10 нг) раст. rIL12
PMEL + 0.715 пмоль (50 нг) раст. rIL12
PMEL + 3.575 пмоль (250 нг) раст. rIL12
PMEL / IL12 TF (предварительная загрузка)


Объем опухоли (мм³)
1500
1000
500
0
0 5 10 15 20 25 30 35
Дней после АСТ

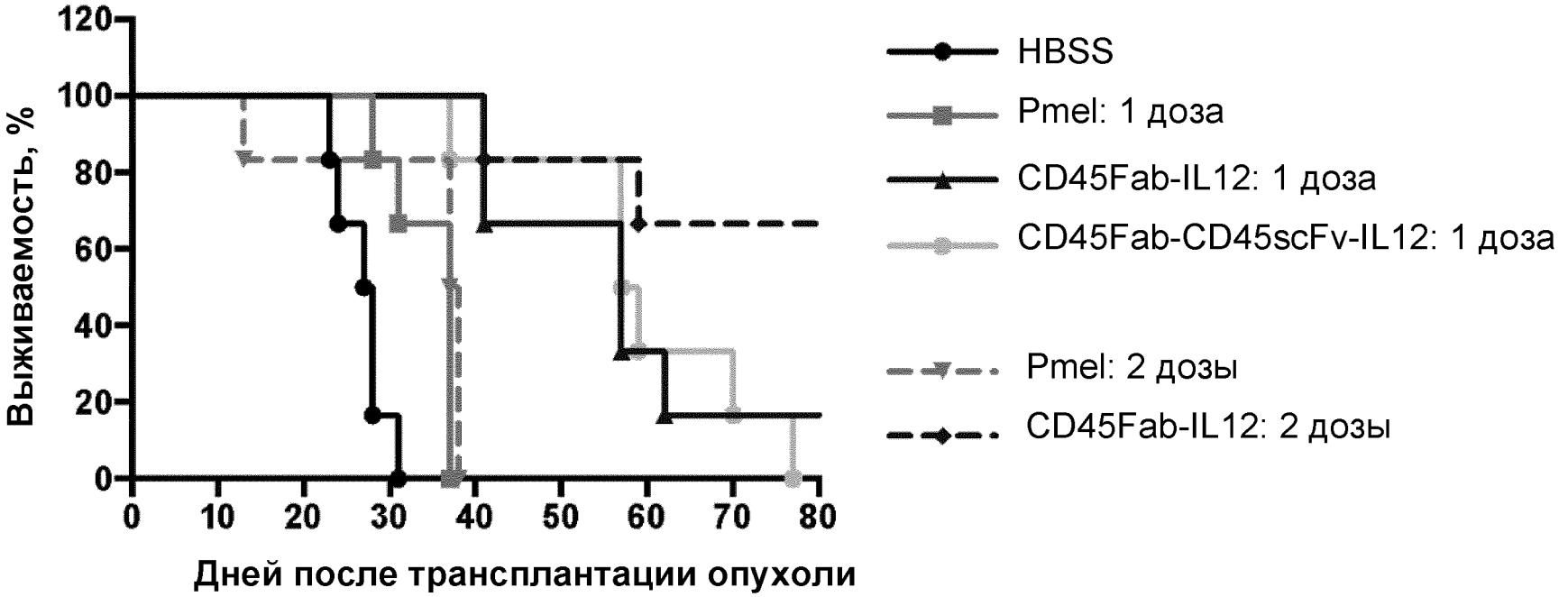

Выживаемость, %
100
75
50
25
0
ACT
0 20 40 60 80 100
Дней после трансплантации опухоли


Изменение массы тела мышей (%)
15
10
5
0
-5
0 4 7 11 14
Дней после АСТ
HBSS
PMEL
PMEL + 0.143 пмоль раст. IL12 TF
PMEL + 0.715 пмоль раст. IL12 TF
PMEL + 3.575 пмоль раст. IL12 TF
PMEL / IL12 TF (предварительная загрузка)

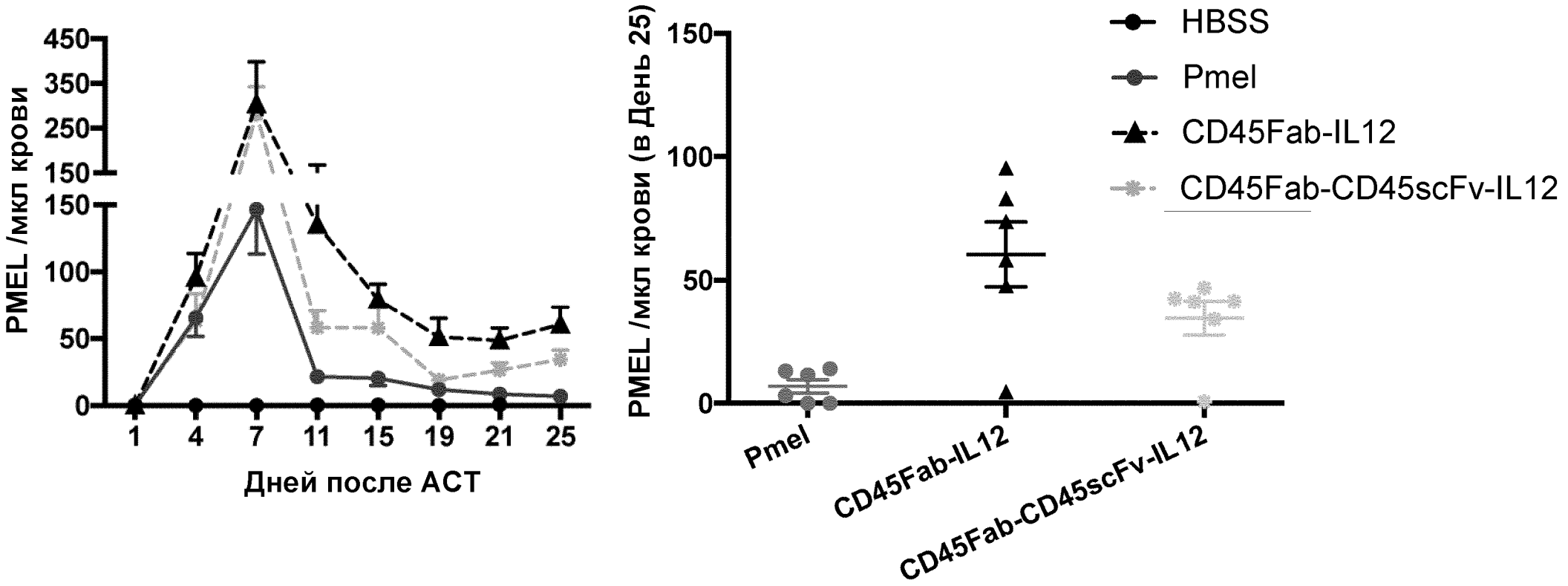
Фиг. 6


2000
1500
1000
500
0
Объем опухоли (мм)
0
4
7
10
14
18
21
25
28
32
Дней после АСТ
HBSS
Pmel: 1 доза
CD45Fab-IL12: 1 доза
CD45Fab-CD45scFv-IL12: 1 доза
Pmel: 2 дозы
CD45Fab-IL12: 2 дозы
1-я доза клеток
2-ая доза клеток (если включена)

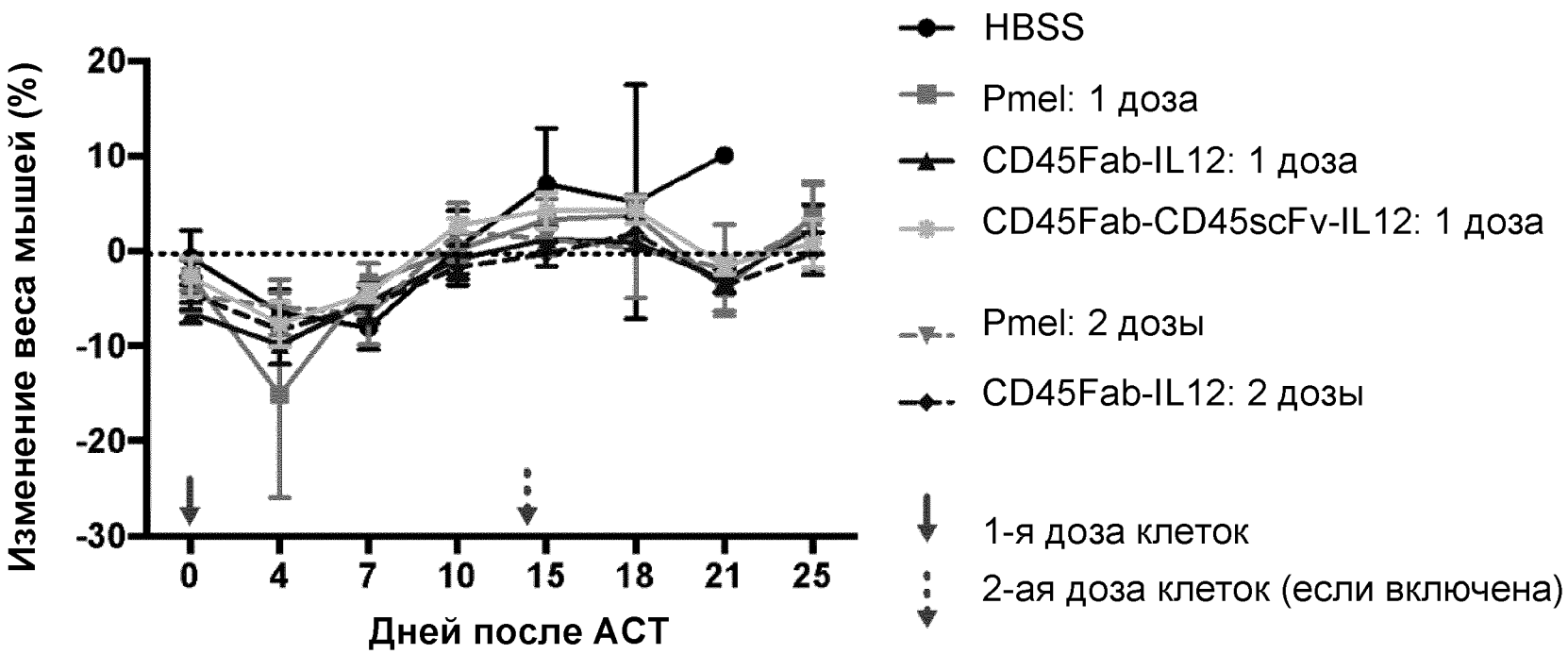
Фиг. 7A


120
100
80
60
40
20
0
Выживаемость, %
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Дней после трансплантации опухоли
HBSS
Pmel: 1 доза
CD45Fab-IL12: 1 доза
CD45Fab-CD45scFv-IL12: 1 доза
Pmel: 2 дозы
CD45Fab-IL12: 2 дозы

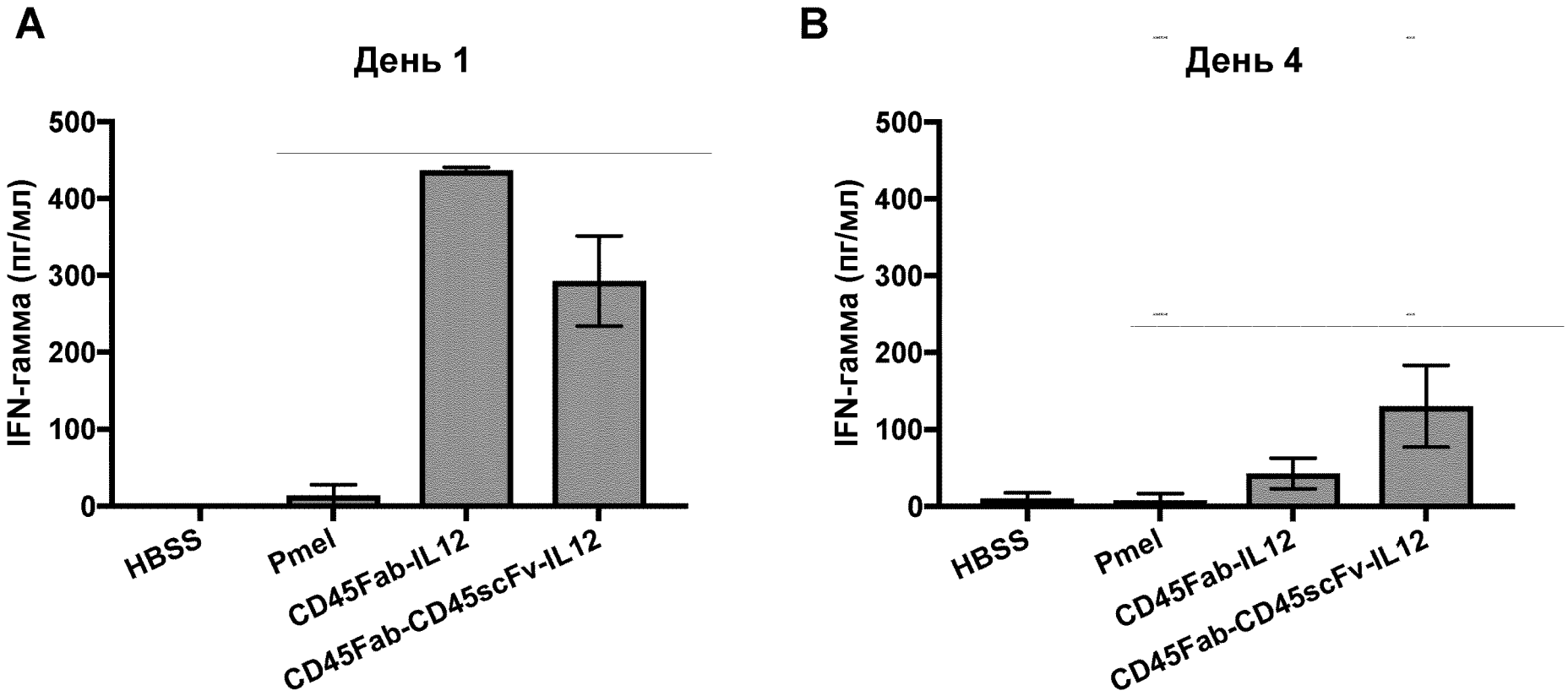
Фиг. 7B


PMEL /мкл крови
450
350
250
150
150
100
50
0
1
4
7
11
15
19
21
25
Дней после АСТ
PMEL /мкл крови (в День 25)
150
100
50
0
Pmel
CD45Fab-IL12
CD45Fab-CD45scFv-IL12
HBSS
Pmel
CD45Fab-IL12
CD45Fab-CD45scFv-IL12

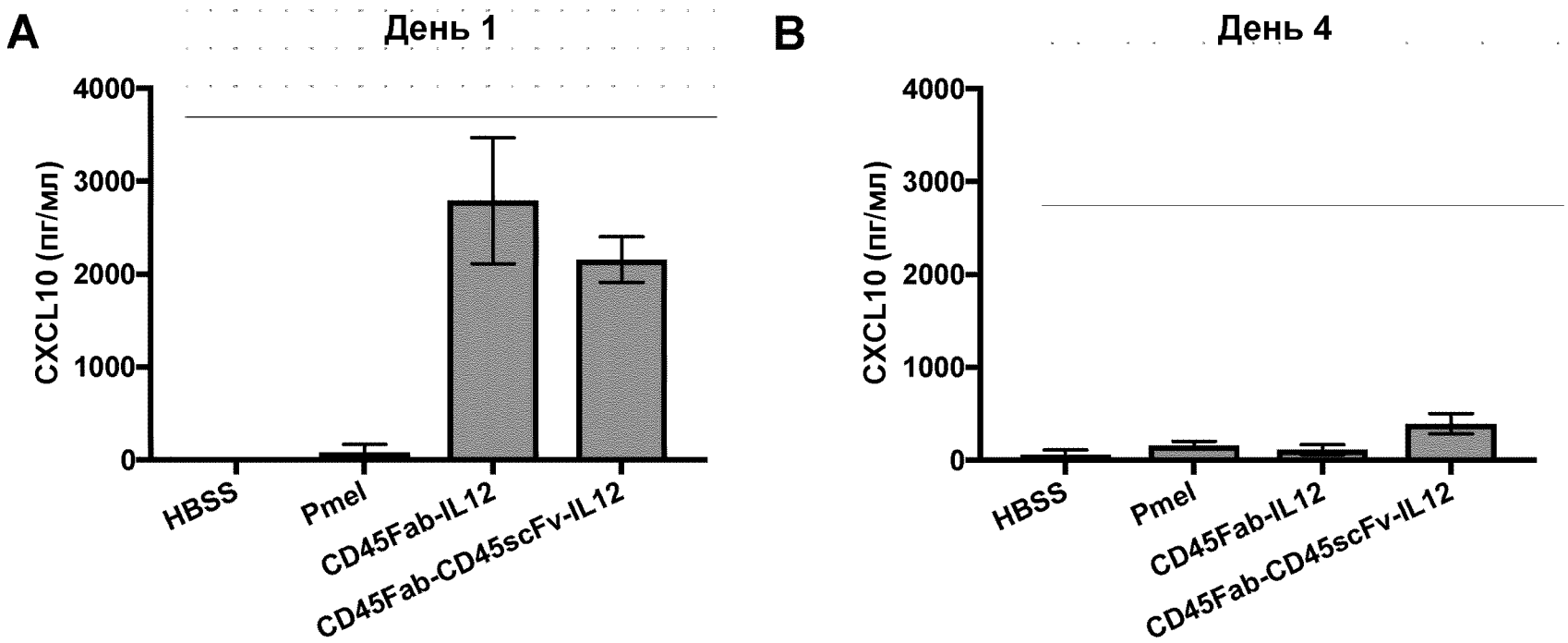
Фиг. 7C


Изменение веса мышей (%)
20
10
0
-10
-20
-30
0
4
7
10
15
18
21
25
Дней после АСТ
HBSS
Pmel: 1 доза
CD45Fab-IL12: 1 доза
CD45Fab-CD45scFv-IL12: 1 доза
Pmel: 2 дозы
CD45Fab-IL12: 2 дозы
1-я доза клеток
2-ая доза клеток (если включена)

Фиг. 7D

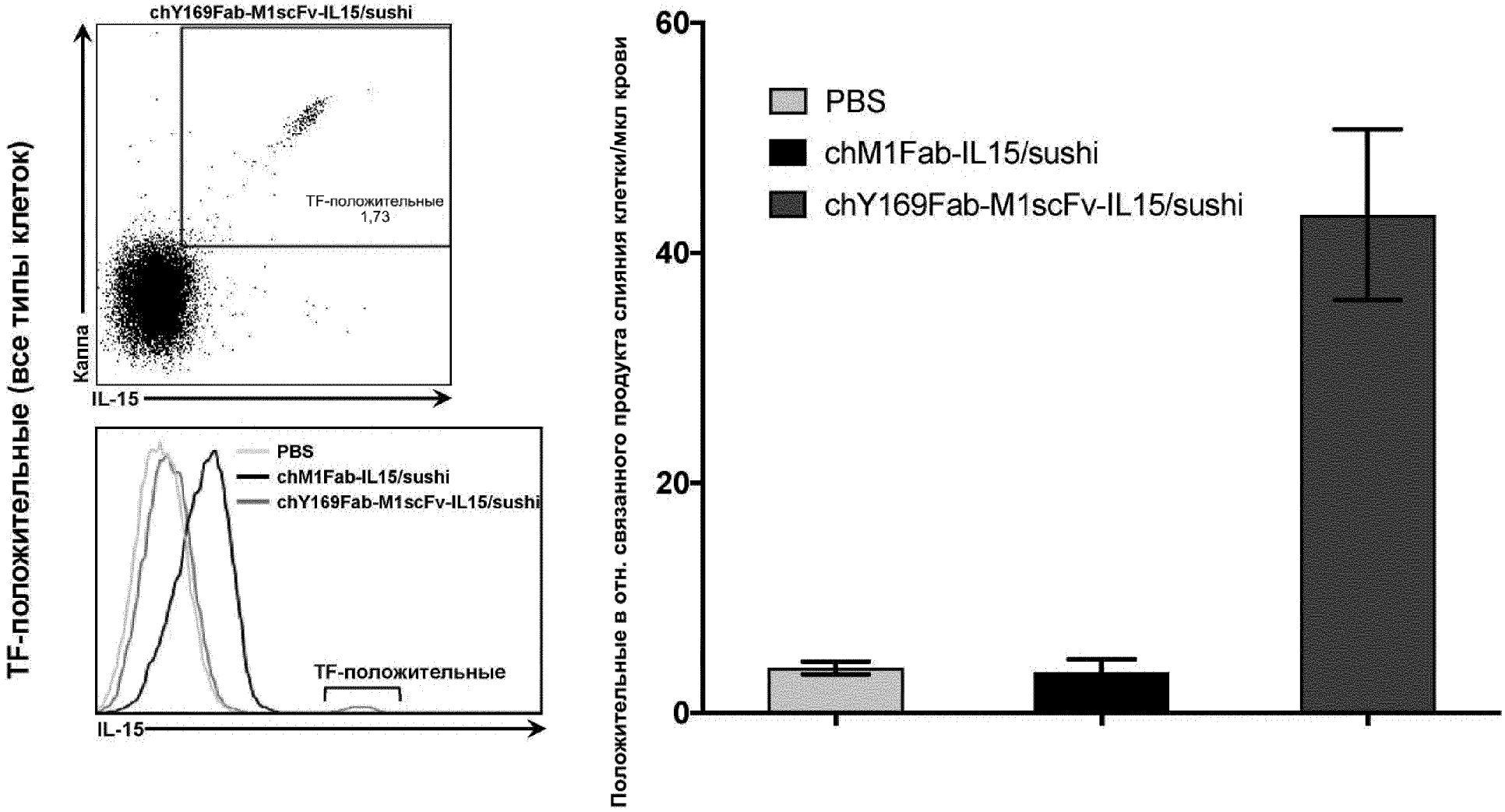

A
День 1
IFN-гамма (пг/мл)
500
400
300
200
100
0
HBSS
Pmel
CD45Fab-IL12
CD45Fab-CD45scFv-IL12
B
День 4
IFN-гамма (пг/мл)
500
400
300
200
100
0
HBSS
Pmel
CD45Fab-IL12
CD45Fab-CD45scFv-IL12

Фиг. 8

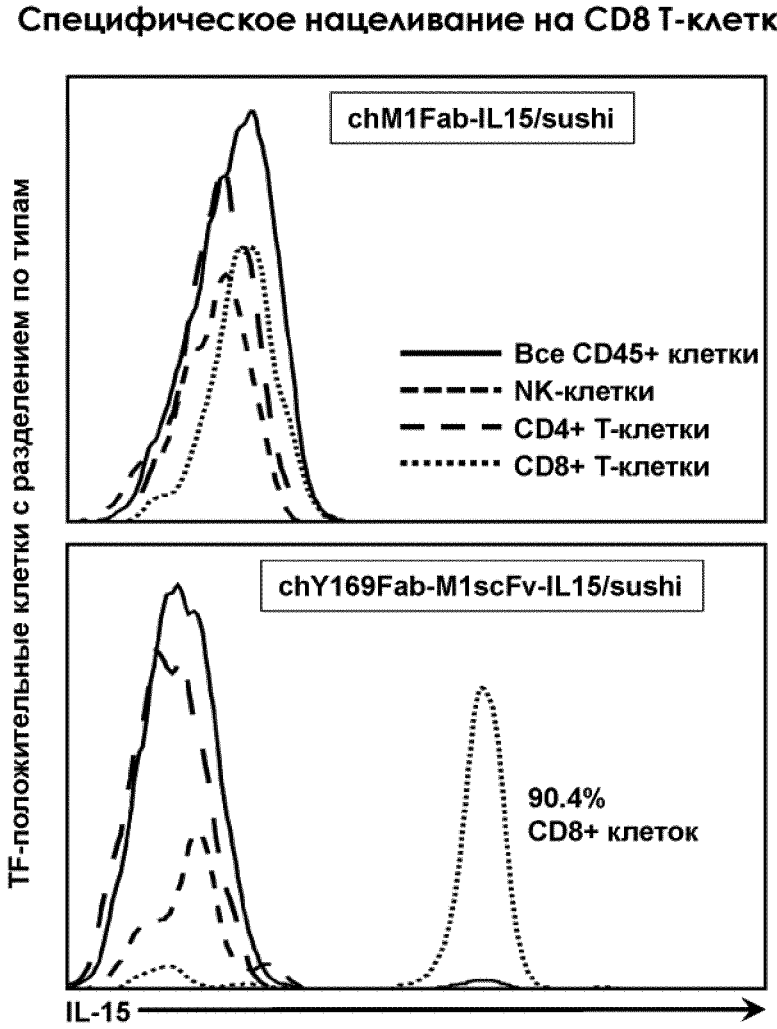

A
День 1
4000
3000
2000
1000
0
CXCL10 (пг/мл)
HBSS
Pmel
CD45Fab-IL12
CD45Fab-CD45scFv-IL12
B
День 4
4000
3000
2000
1000
0
CXCL10 (пг/мл)
HBSS
Pmel
CD45Fab-IL12
CD45Fab-CD45scFv-IL12

Фиг. 9

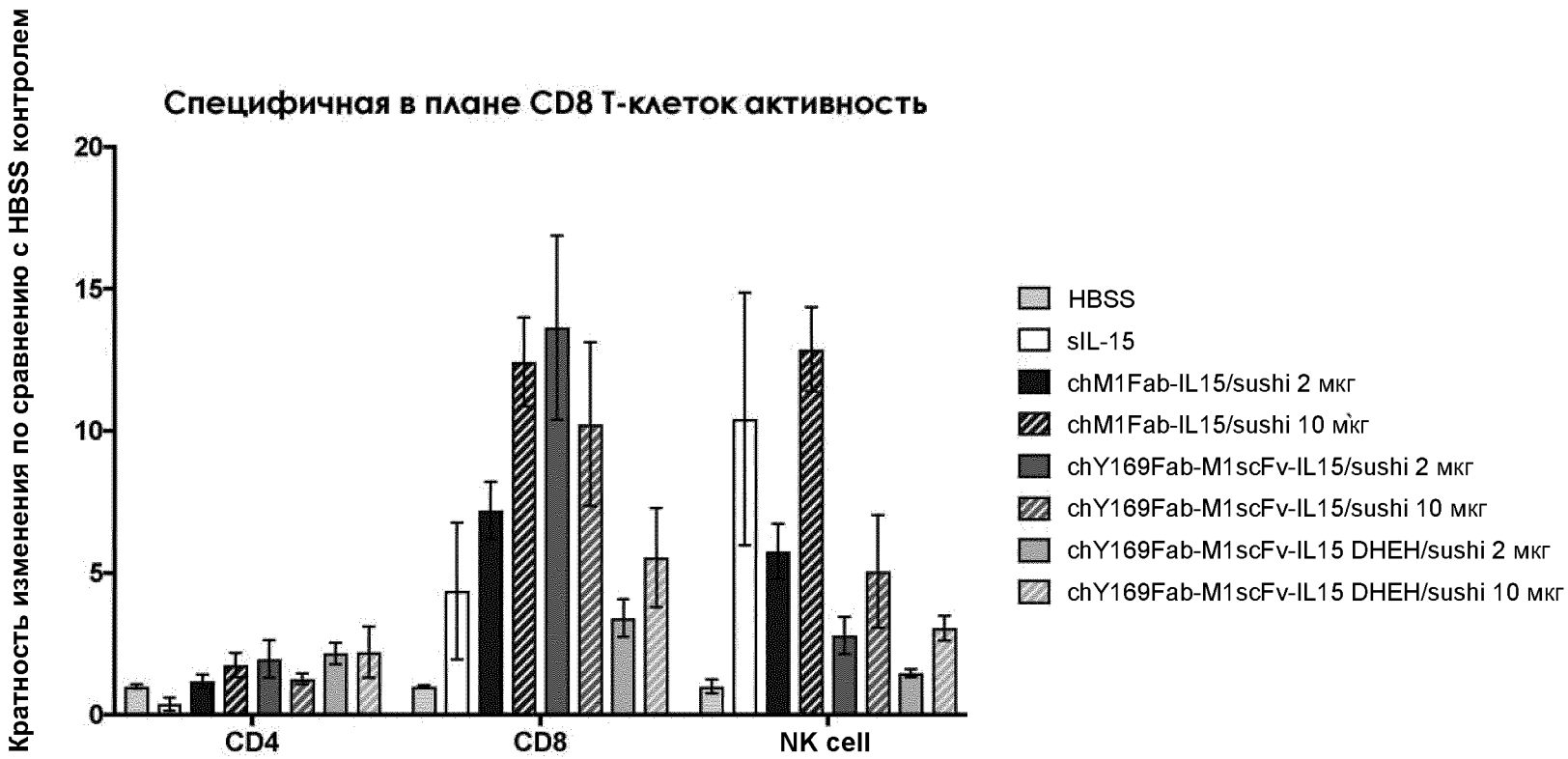
In Vivo нацеливание с помощью CD8-специфического связанного продукта слияния



Фиг. 10A

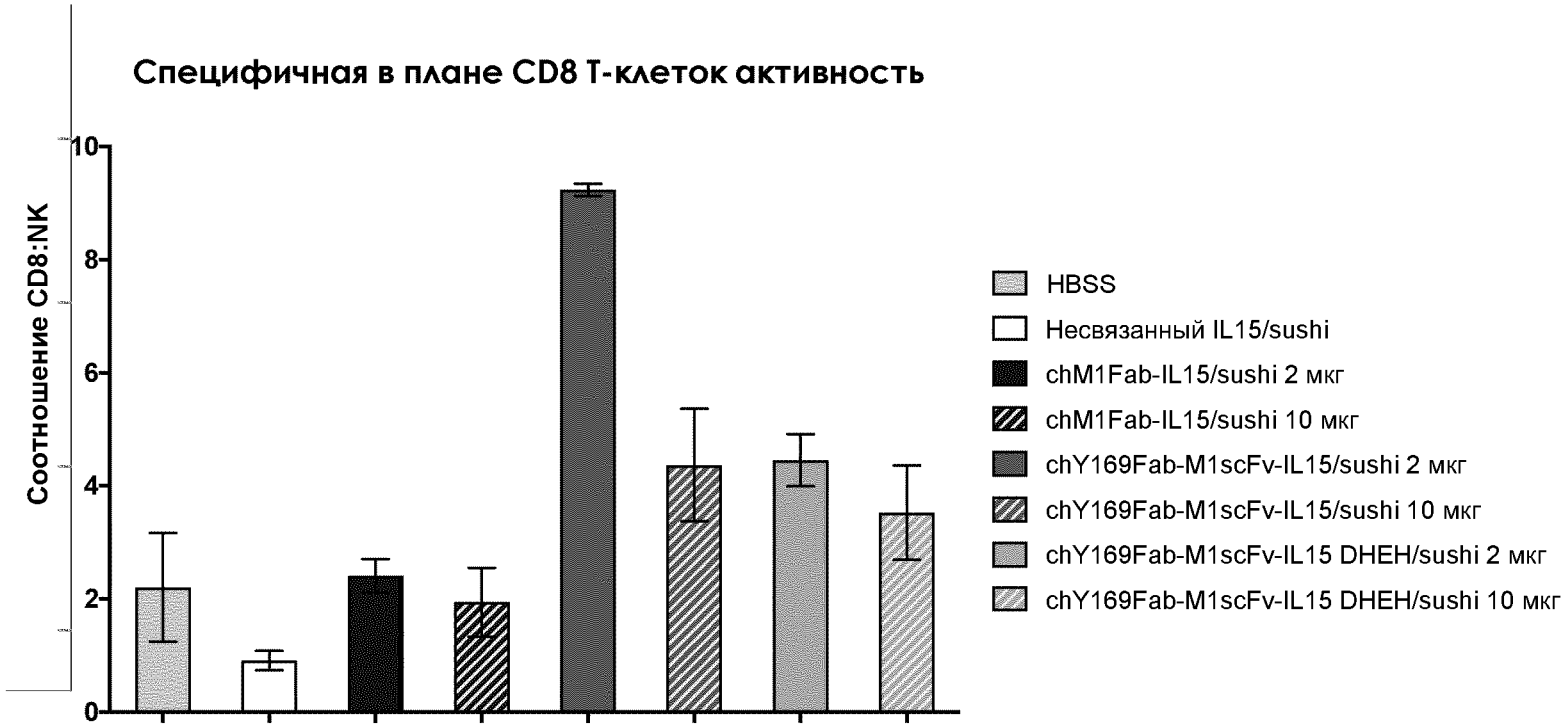

Специфическое нацеливание на CD8 Т-клетки
chM1Fab-IL15/sushi
Все CD45+ клетки
NK-клетки
CD4+ Т-клетки
CD8+ Т-клетки
chY169Fab-M1scFv-IL15/sushi
90.4%
CD8+ клеток
TF-положительные клетки с разделением по типам
IL-15

Фиг. 10B



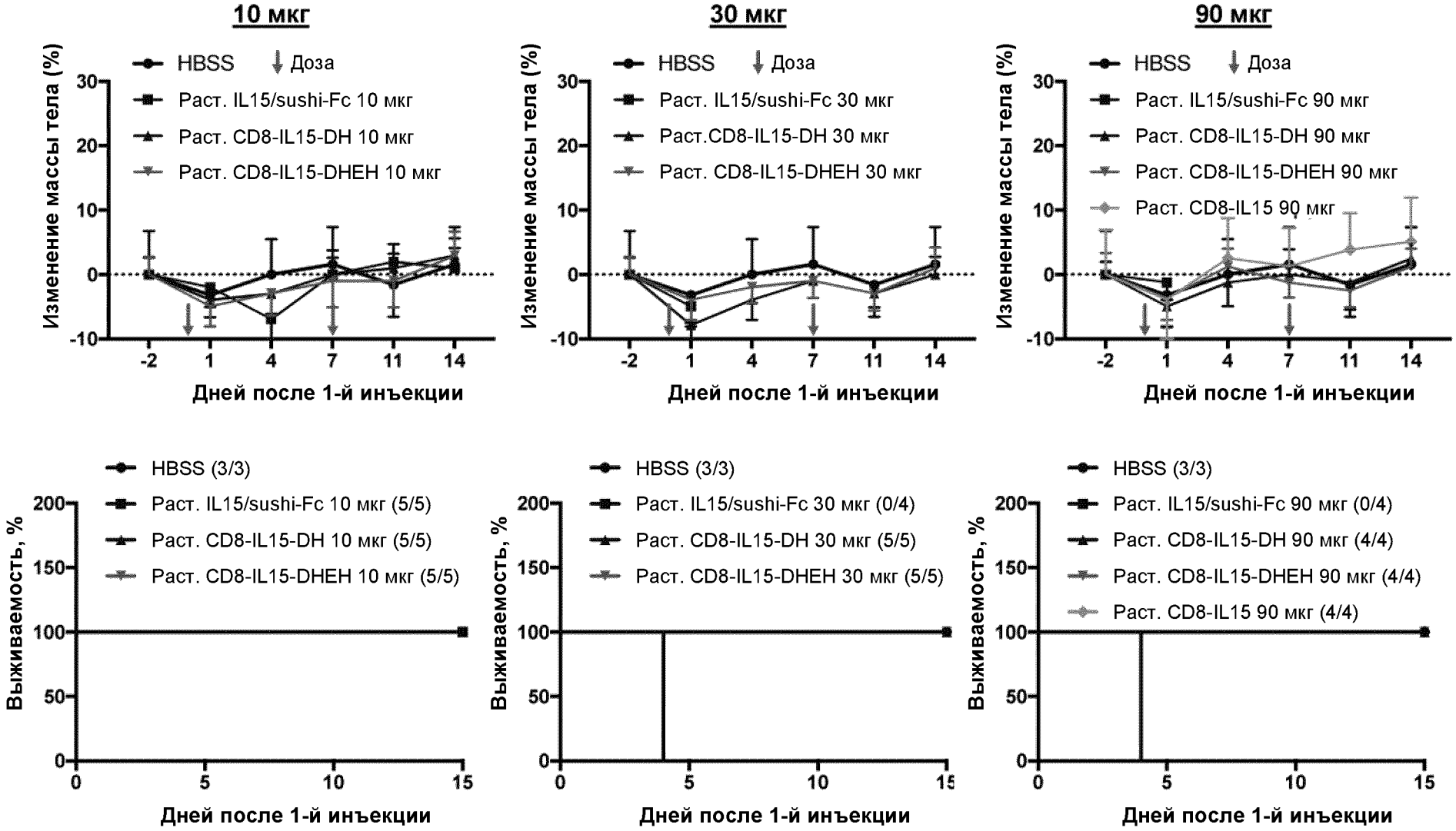
Экспансия иммунных клеток спустя 3 дня после инъецирования связанного продукта слияния или контроля

Фиг. 10C

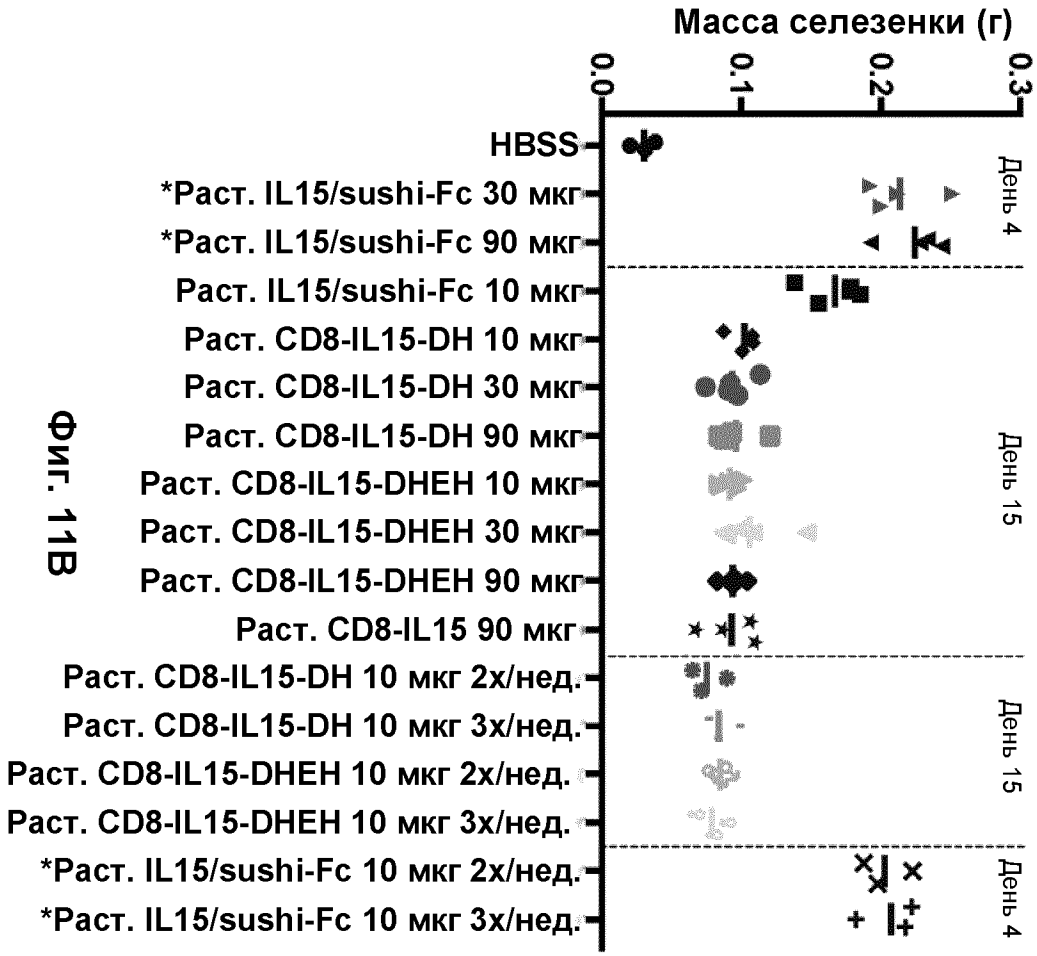


Относительная экспансия $CD8^+$ Т-клеток и NK-клеток спустя 3 дня после инъецирования связанного продукта слияния

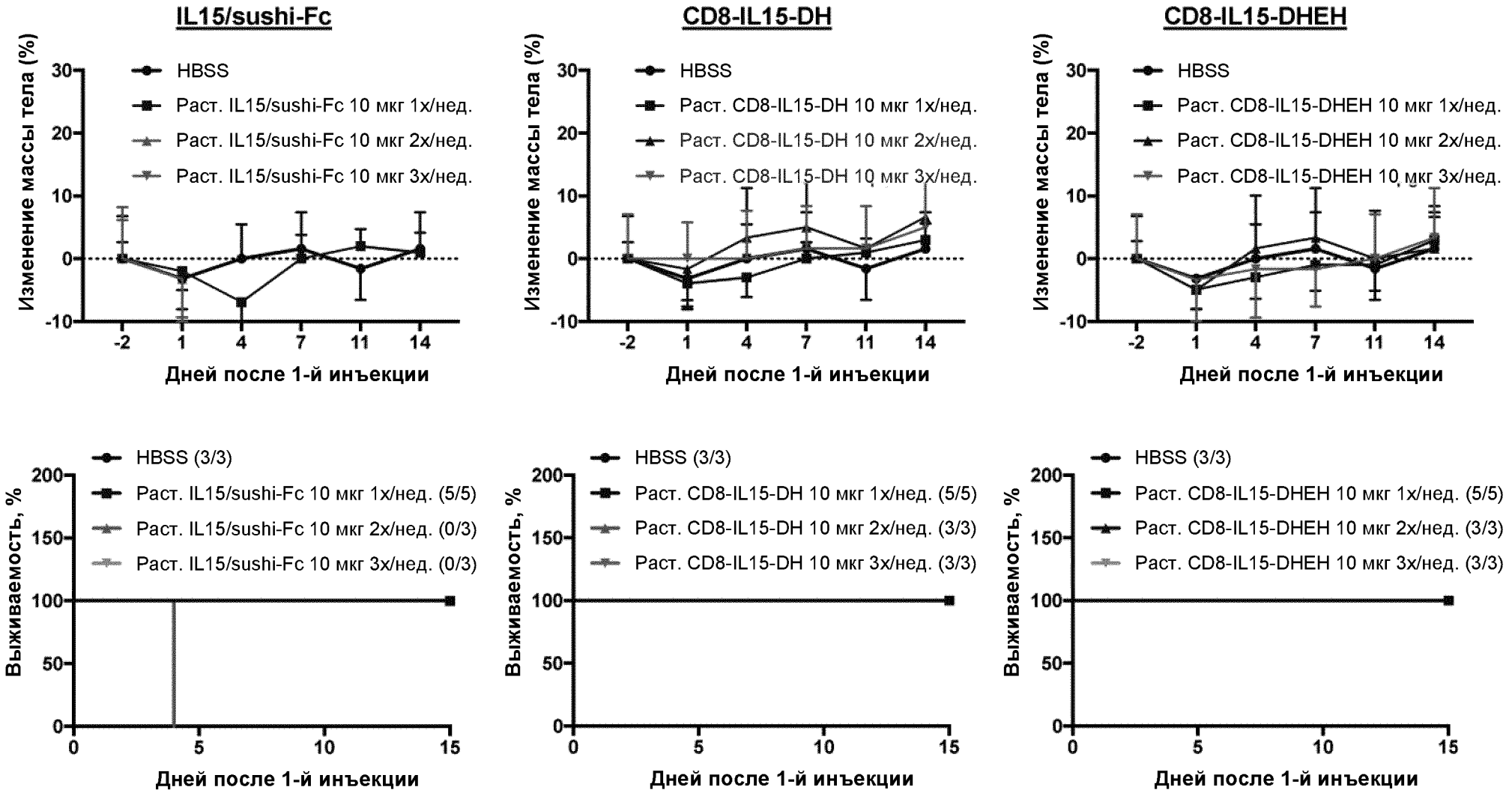
Фиг. 10D


10 мкг
30 мкг
90 мкг
HBSS
Доза
Раст. IL15/sushi-Fc 10 мкг
Раст. CD8-IL15-DH 10 мкг
Раст. CD8-IL15-DHEH 10 мкг
Раст. IL15/sushi-Fc 30 мкг
Раст.CD8-IL15-DH 30 мкг
Раст. CD8-IL15-DHEH 30 мкг
Раст. IL15/sushi-Fc 90 мкг
Раст. CD8-IL15-DH 90 мкг
Раст. CD8-IL15-DHEH 90 мкг
Раст. CD8-IL15 90 мкг
Изменение массы тела (%)
Дней после 1-й инъекции
HBSS (3/3)
Раст. IL15/sushi-Fc 10 мкг (5/5)
Раст. CD8-IL15-DH 10 мкг (5/5)
Раст. CD8-IL15-DHEH 10 мкг (5/5)
Раст. IL15/sushi-Fc 30 мкг (0/4)
Раст. CD8-IL15-DH 30 мкг (5/5)
Раст. CD8-IL15-DHEH 30 мкг (5/5)
Раст. IL15/sushi-Fc 90 мкг (0/4)
Раст. CD8-IL15-DH 90 мкг (4/4)
Раст. CD8-IL15-DHEH 90 мкг (4/4)
Раст. CD8-IL15 90 мкг (4/4)
Выживаемость, %

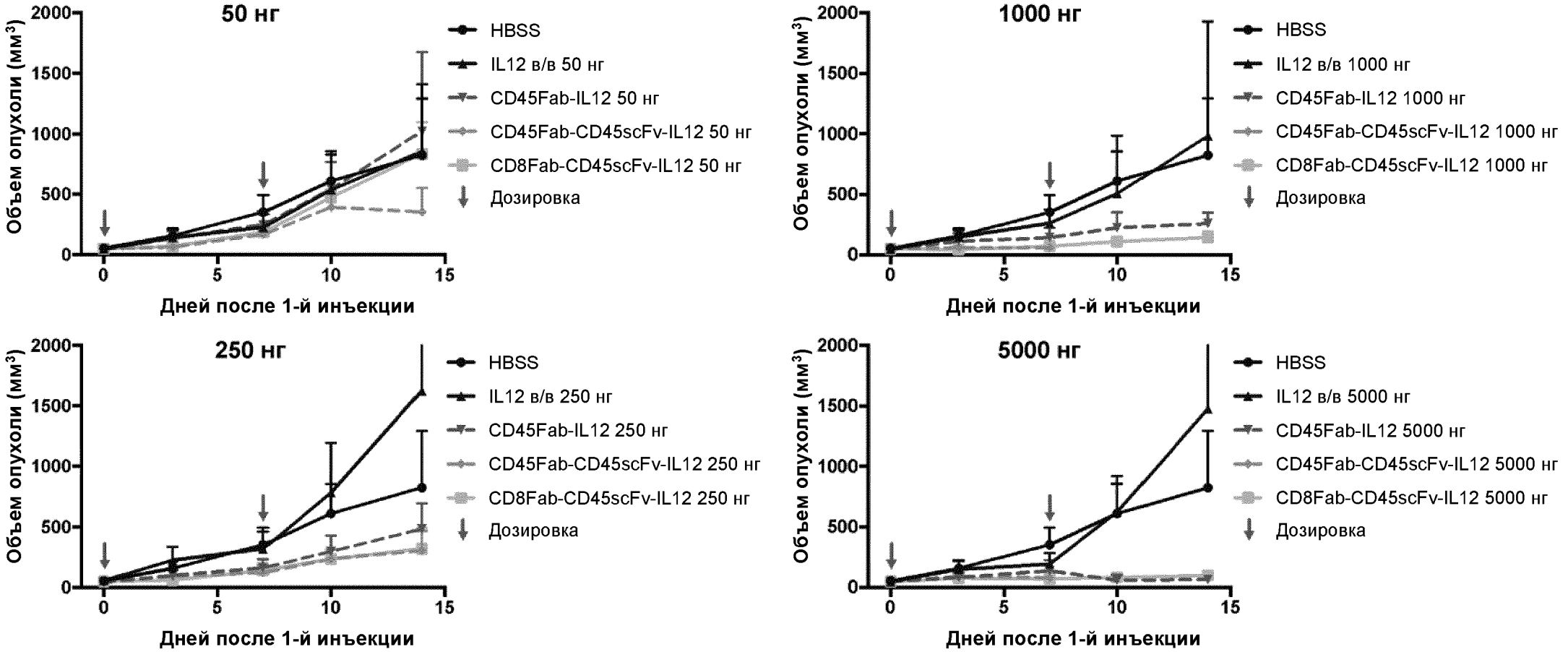
Фиг. 11A


Масса селезенки (г)
0.0
0.1
0.2
0.3
HBSS
*Раст. IL15/sushi-Fc 30 мкг
*Раст. IL15/sushi-Fc 90 мкг
Раст. IL15/sushi-Fc 10 мкг
Раст. CD8-IL15-DH 10 мкг
Раст. CD8-IL15-DH 30 мкг
Раст. CD8-IL15-DH 90 мкг
Раст. CD8-IL15-DHEH 10 мкг
Раст. CD8-IL15-DHEH 30 мкг
Раст. CD8-IL15-DHEH 90 мкг
Раст. CD8-IL15 90 мкг
Раст. CD8-IL15-DH 10 мкг 2х/нед.
Раст. CD8-IL15-DH 10 мкг 3х/нед.
Раст. CD8-IL15-DHEH 10 мкг 2х/нед.
Раст. CD8-IL15-DHEH 10 мкг 3х/нед.
*Раст. IL15/sushi-Fc 10 мкг 2х/нед.
*Раст. IL15/sushi-Fc 10 мкг 3х/нед.
День 4
День 15
День 15
День 4

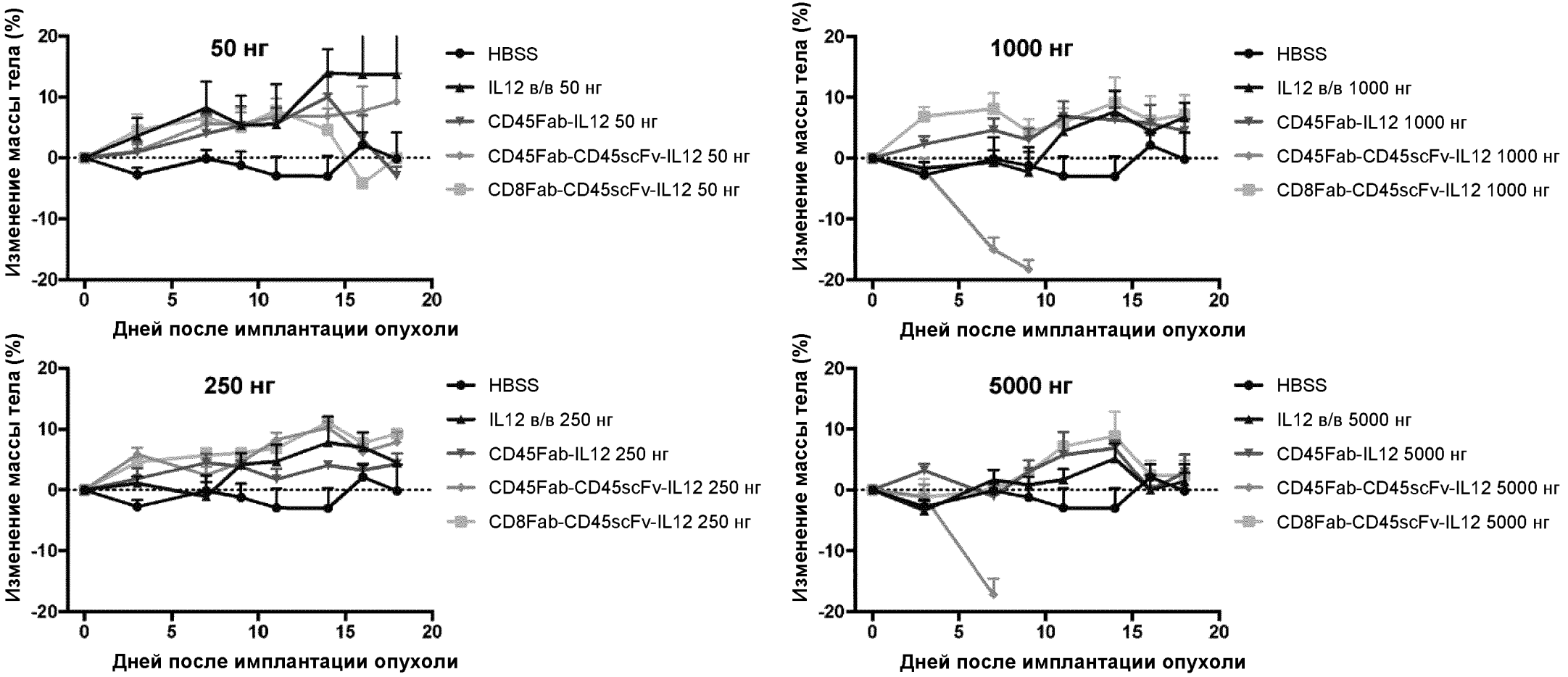
Фиг. 11B


IL15/sushi-Fc
CD8-IL15-DH
CD8-IL15-DHEH
Изменение массы тела (%)
HBSS
Раст. IL15/sushi-Fc 10 мкг 1х/нед.
Раст. IL15/sushi-Fc 10 мкг 2х/нед.
Раст. IL15/sushi-Fc 10 мкг 3х/нед.
Раст. CD8-IL15-DH 10 мкг 1х/нед.
Раст. CD8-IL15-DH 10 мкг 2х/нед.
Раст. CD8-IL15-DH 10 мкг 3х/нед.
Раст. CD8-IL15-DHEH 10 мкг 1х/нед.
Раст. CD8-IL15-DHEH 10 мкг 2х/нед.
Раст. CD8-IL15-DHEH 10 мкг 3х/нед.
Дней после 1-й инъекции
Выживаемость, %
HBSS (3/3)
Раст. IL15/sushi-Fc 10 мкг 1х/нед. (5/5)
Раст. IL15/sushi-Fc 10 мкг 2х/нед. (0/3)
Раст. IL15/sushi-Fc 10 мкг 3х/нед. (0/3)
Раст. CD8-IL15-DH 10 мкг 1х/нед. (5/5)
Раст. CD8-IL15-DH 10 мкг 2х/нед. (3/3)
Раст. CD8-IL15-DH 10 мкг 3х/нед. (3/3)
Раст. CD8-IL15-DHEH 10 мкг 1х/нед. (5/5)
Раст. CD8-IL15-DHEH 10 мкг 2х/нед. (3/3)
Раст. CD8-IL15-DHEH 10 мкг 3х/нед. (3/3)

Фиг. 11C

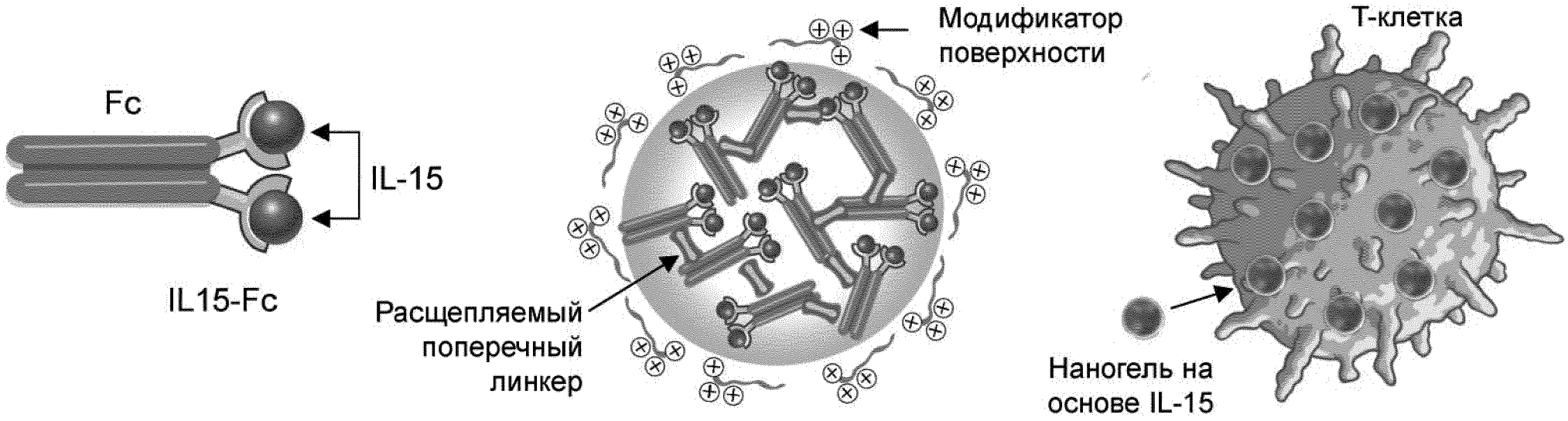

50 нг
1000 нг
250 нг
5000 нг
Объем опухоли (мм³)
Дней после 1-й инъекции
HBSS
IL12 в/в 50 нг
CD45Fab-IL12 50 нг
CD45Fab-CD45scFv-IL12 50 нг
CD8Fab-CD45scFv-IL12 50 нг
Дозировка
IL12 в/в 1000 нг
CD45Fab-IL12 1000 нг
CD45Fab-CD45scFv-IL12 1000 нг
CD8Fab-CD45scFv-IL12 1000 нг
IL12 в/в 250 нг
CD45Fab-IL12 250 нг
CD45Fab-CD45scFv-IL12 250 нг
CD8Fab-CD45scFv-IL12 250 нг
IL12 в/в 5000 нг
CD45Fab-IL12 5000 нг
CD45Fab-CD45scFv-IL12 5000 нг
CD8Fab-CD45scFv-IL12 5000 нг

Фиг. 12A

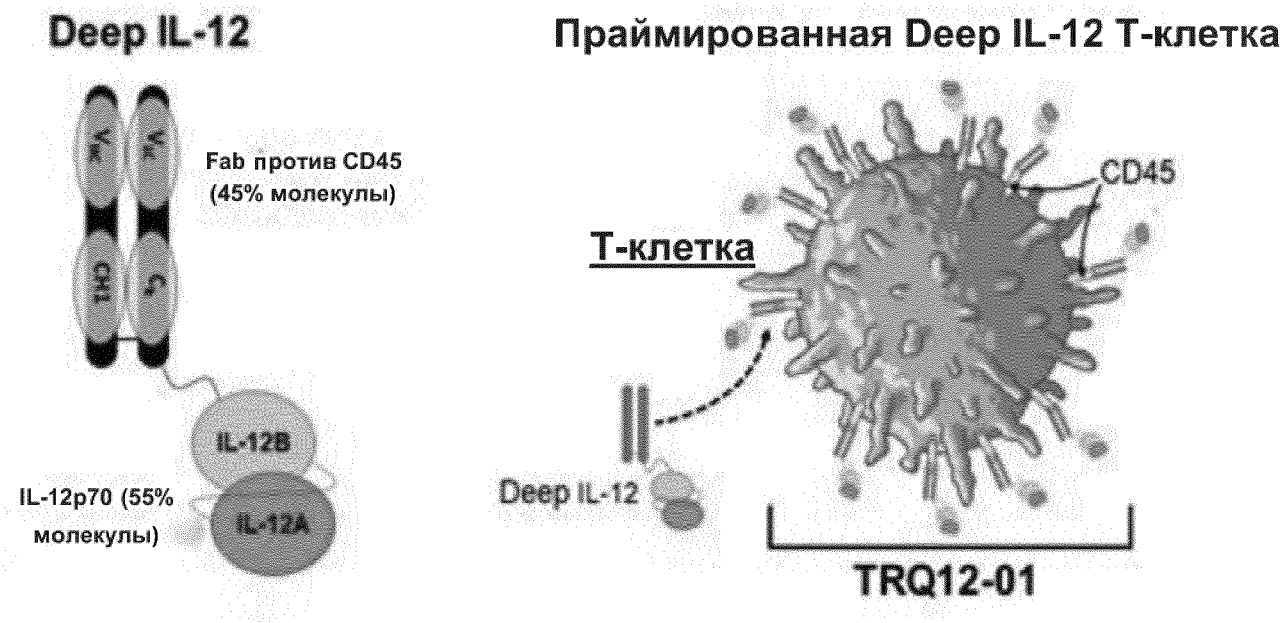

50 нг
1000 нг
250 нг
5000 нг
Изменение массы тела (%)
Дней после имплантации опухоли
HBSS
IL12 в/в 50 нг
CD45Fab-IL12 50 нг
CD45Fab-CD45scFv-IL12 50 нг
CD8Fab-CD45scFv-IL12 50 нг
IL12 в/в 1000 нг
CD45Fab-IL12 1000 нг
CD45Fab-CD45scFv-IL12 1000 нг
CD8Fab-CD45scFv-IL12 1000 нг
IL12 в/в 250 нг
CD45Fab-IL12 250 нг
CD45Fab-CD45scFv-IL12 250 нг
CD8Fab-CD45scFv-IL12 250 нг
IL12 в/в 5000 нг
CD45Fab-IL12 5000 нг
CD45Fab-CD45scFv-IL12 5000 нг
CD8Fab-CD45scFv-IL12 5000 нг

Фиг. 12B

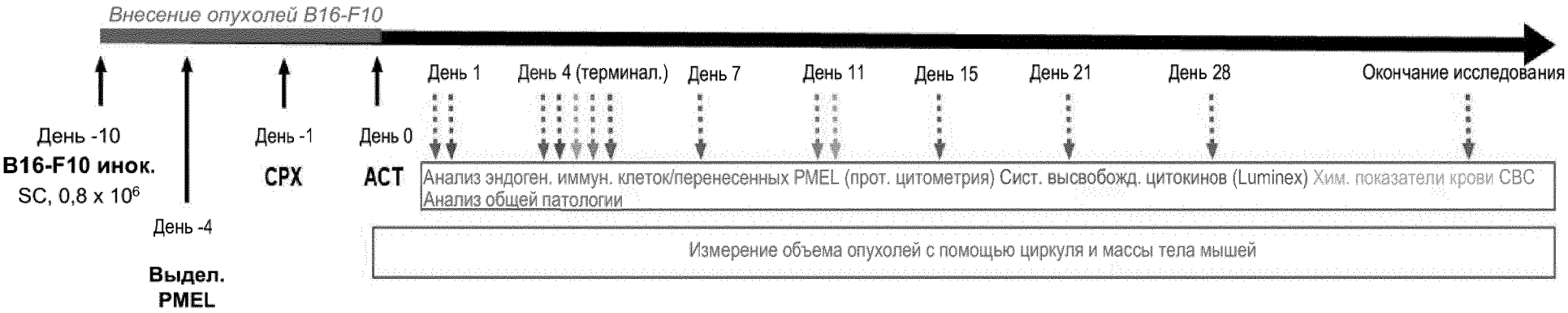
Наногель на основе IL-15 обеспечивает аутокринное стимулирование за счет цитокинов



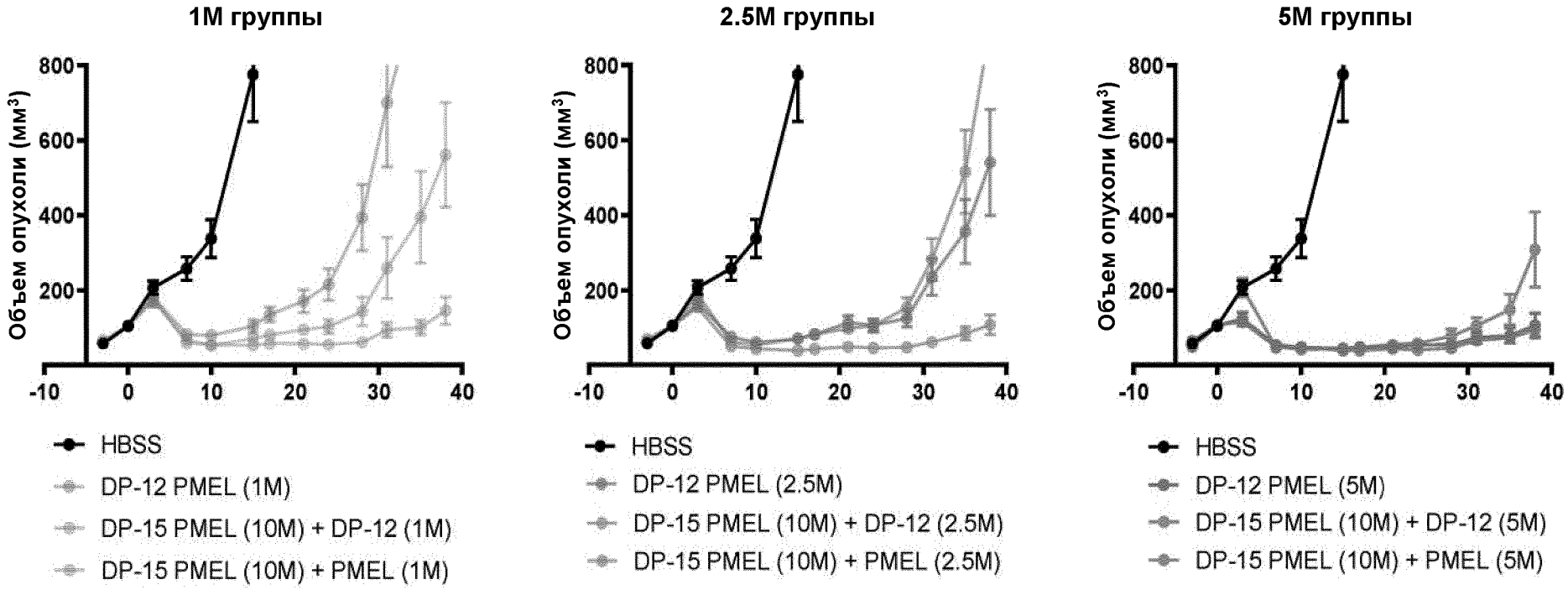
Фиг. 13А


Deep IL-12
VH
VL
CH1
CL
Fab против CD45
(45% молекулы)
IL-12B
IL-12p70 (55%
молекулы)
IL-12A
Праймированная Deep IL-12 Т-клетка
CD45
Т-клетка
Deep IL-12
TRQ12-01

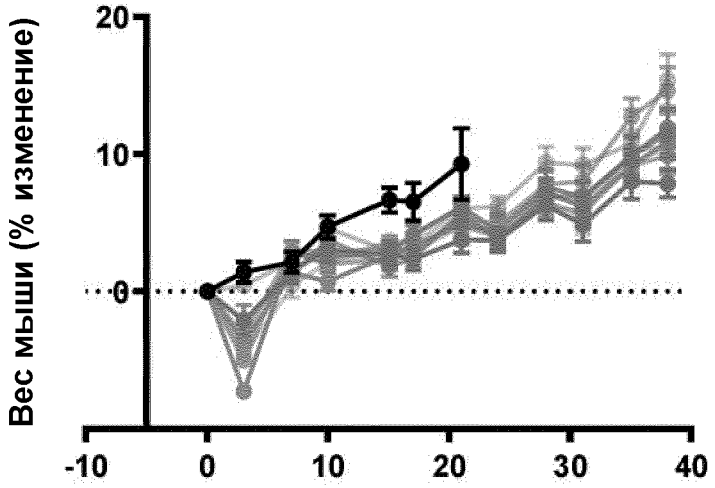
Фиг. 13B


Внесение опухолей B16-F10
День -10
B16-F10 инок.
SC, 0,8 x 10^6
День -4
Выдел.
PMEL
День -1
CPX
День 0
ACT
День 1
День 4 (терминал.)
День 7
День 11
День 15
День 21
День 28
Окончание исследования
Анализ эндоген. иммун. клеток/перенесенных PMEL (прот. цитометрия) Сист. высвобожд. цитокинов (Luminex) Хим. показатели крови CBC
Анализ общей патологии
Измерение объема опухолей с помощью циркуля и массы тела мышей

Фиг. 14

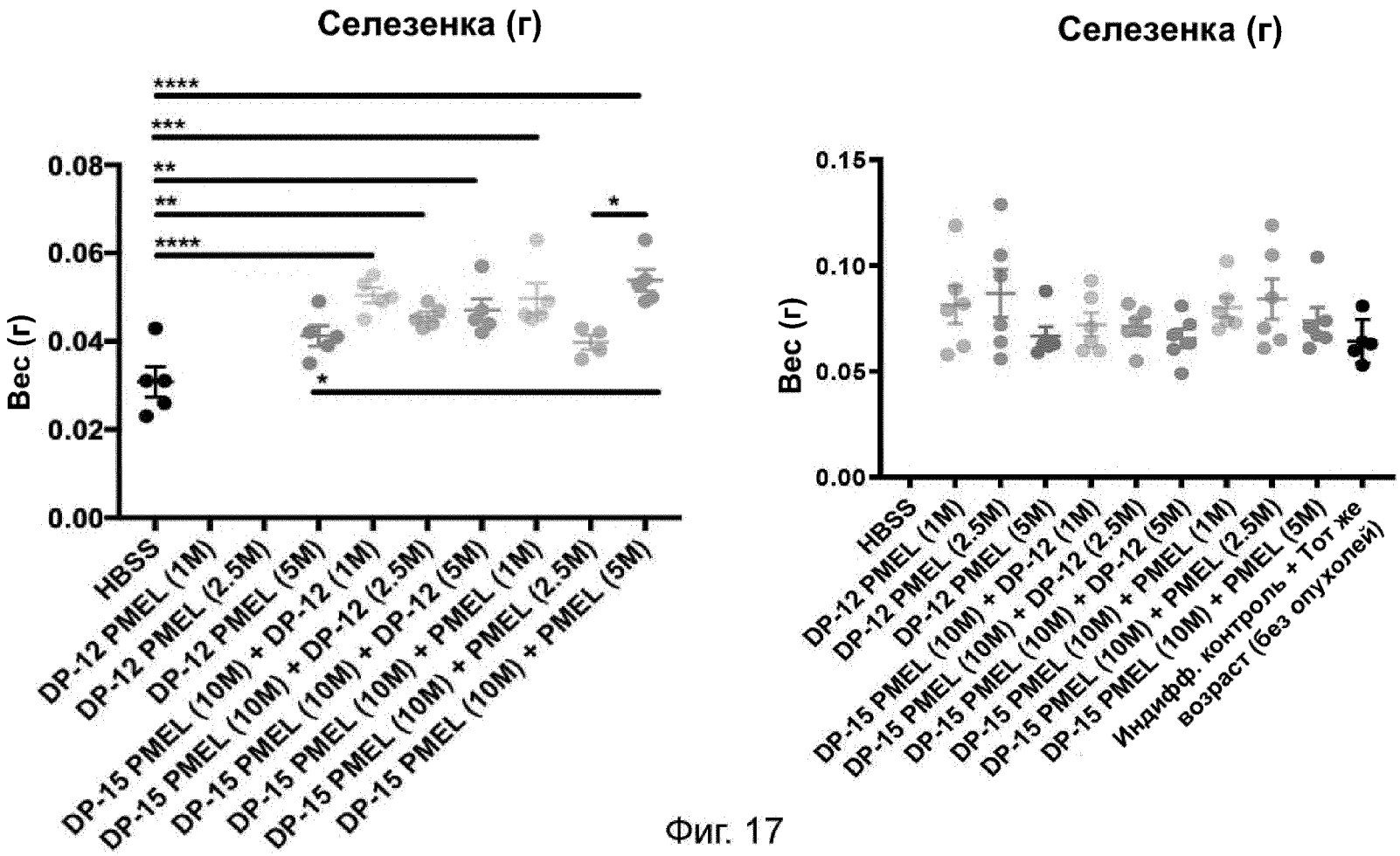

1M группы
2.5M группы
5M группы
Объем опухоли (мм³)
800
600
400
200
-10
0
10
20
30
40
HBSS
DP-12 PMEL (1M)
DP-15 PMEL (10M) + DP-12 (1M)
DP-15 PMEL (10M) + PMEL (1M)
HBSS
DP-12 PMEL (2.5M)
DP-15 PMEL (10M) + DP-12 (2.5M)
DP-15 PMEL (10M) + PMEL (2.5M)
HBSS
DP-12 PMEL (5M)
DP-15 PMEL (10M) + DP-12 (5M)
DP-15 PMEL (10M) + PMEL (5M)

Фиг. 15

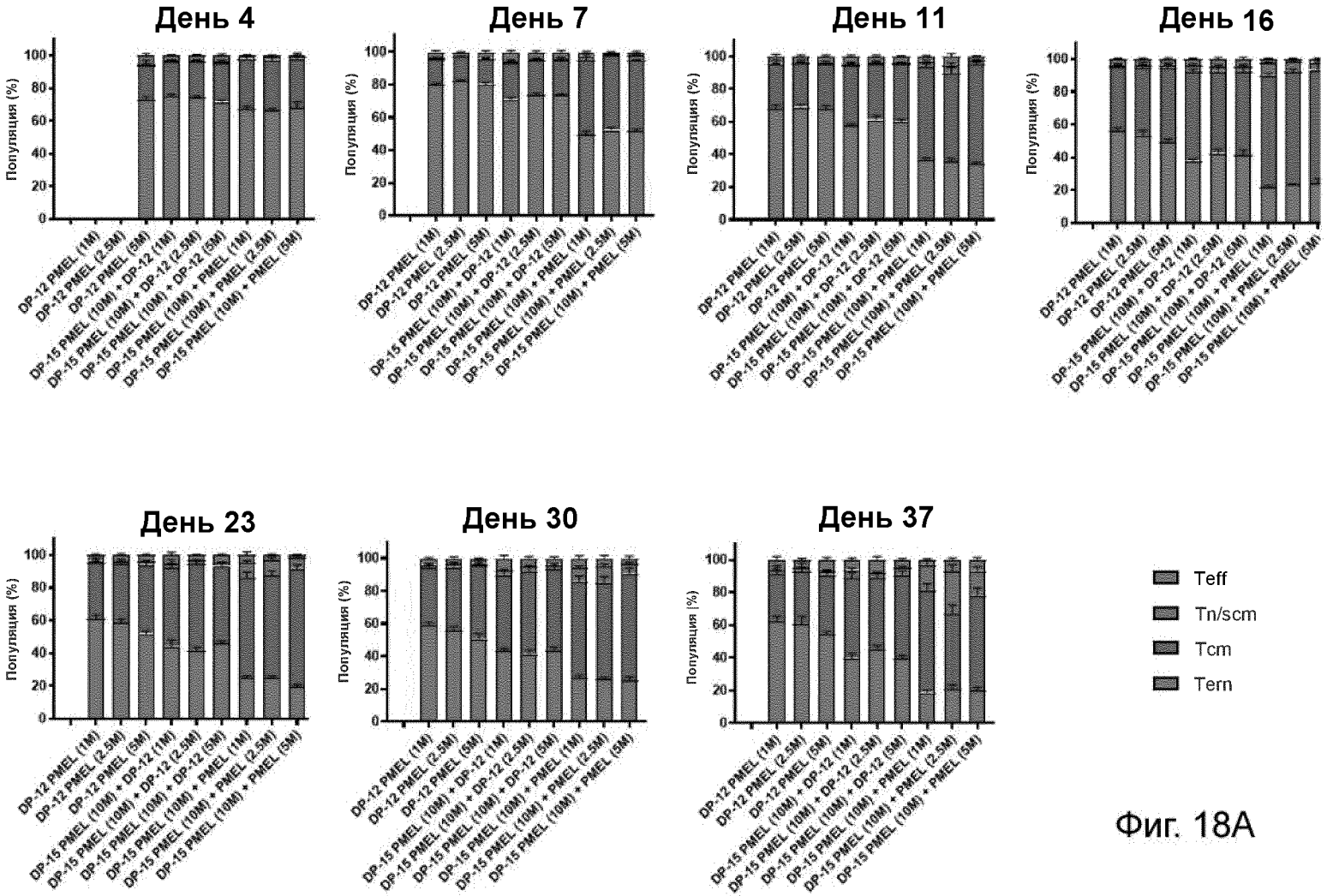


HBSS
DP-12 PMEL (1M)
DP-12 PMEL (2.5M)
DP-12 PMEL (5M)
DP-15 PMEL (10M) + DP-12 (1M)
DP-15 PMEL (10M) + DP-12 (2.5M)
DP-15 PMEL (10M) + DP-12 (5M)
DP-15 PMEL (10M) + PMEL (1M)
DP-15 PMEL (10M) + PMEL (2.5M)
DP-15 PMEL (10M) + PMEL (5M)

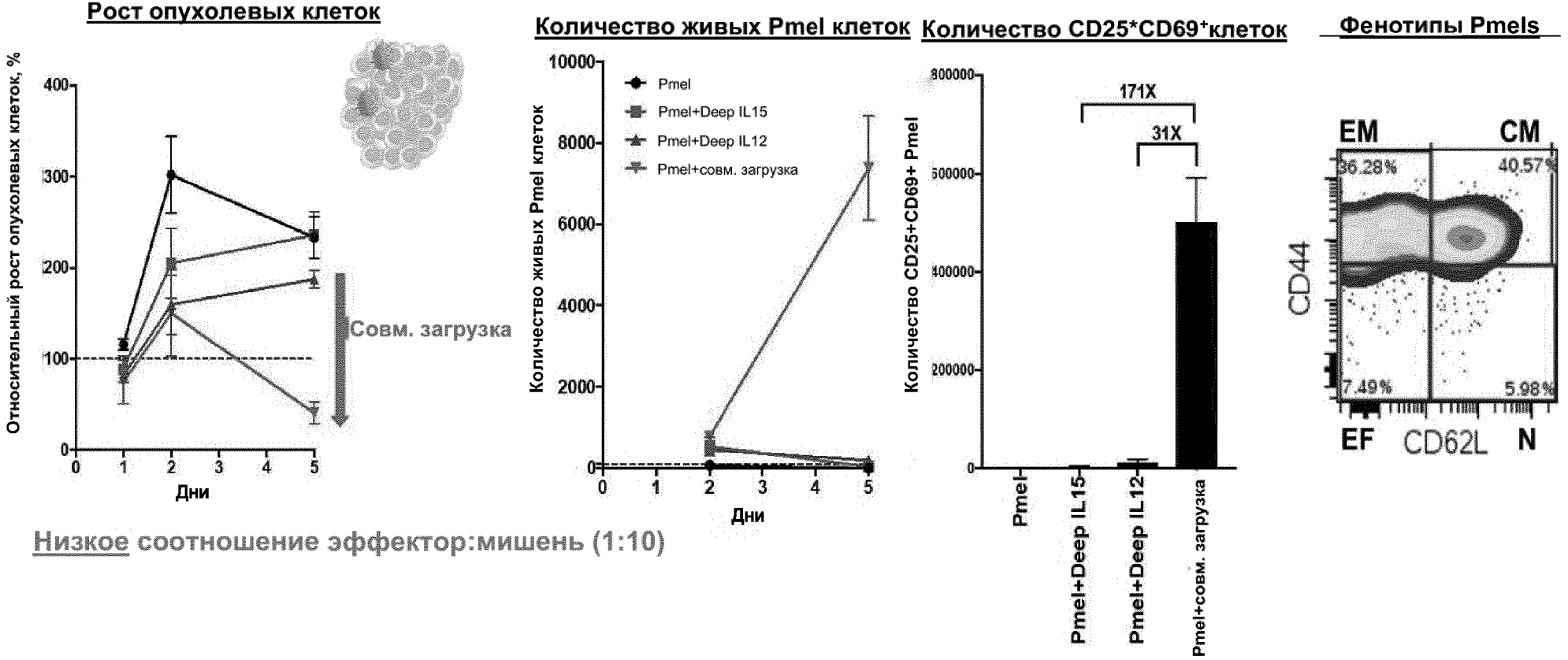
Фиг. 16


Селезенка (г)
Вес (г)
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
****
***
**
**
****
*
*
HBSS
DP-12 PMEL (1M)
DP-12 PMEL (2.5M)
DP-12 PMEL (5M)
DP-15 PMEL (10M) + DP-12 (1M)
DP-15 PMEL (10M) + DP-12 (2.5M)
DP-15 PMEL (10M) + DP-12 (5M)
DP-15 PMEL (10M) + PMEL (1M)
DP-15 PMEL (10M) + PMEL (2.5M)
DP-15 PMEL (10M) + PMEL (5M)
Селезенка (г)
Вес (г)
0.15
0.10
0.05
0.00
HBSS
DP-12 PMEL (1M)
DP-12 PMEL (2.5M)
DP-12 PMEL (5M)
DP-15 PMEL (10M) + DP-12 (1M)
DP-15 PMEL (10M) + DP-12 (2.5M)
DP-15 PMEL (10M) + DP-12 (5M)
DP-15 PMEL (10M) + PMEL (1M)
DP-15 PMEL (10M) + PMEL (2.5M)
DP-15 PMEL (10M) + PMEL (5M)
Индифф. контроль + Тот же возраст (без опухолей)

Фиг. 17


День 4
День 7
День 11
День 16
День 23
День 30
День 37
Популяция (%)
0
20
40
60
80
100
DP-12 PMEL (1M)
DP-12 PMEL (2.5M)
DP-12 PMEL (5M)
DP-15 PMEL (10M) + DP-12 (1M)
DP-15 PMEL (10M) + DP-12 (2.5M)
DP-15 PMEL (10M) + DP-12 (5M)
DP-15 PMEL (10M) + PMEL (1M)
DP-15 PMEL (10M) + PMEL (2.5M)
DP-15 PMEL (10M) + PMEL (5M)
Teff
Tn/scm
Tcm
Tem

Фиг. 18A

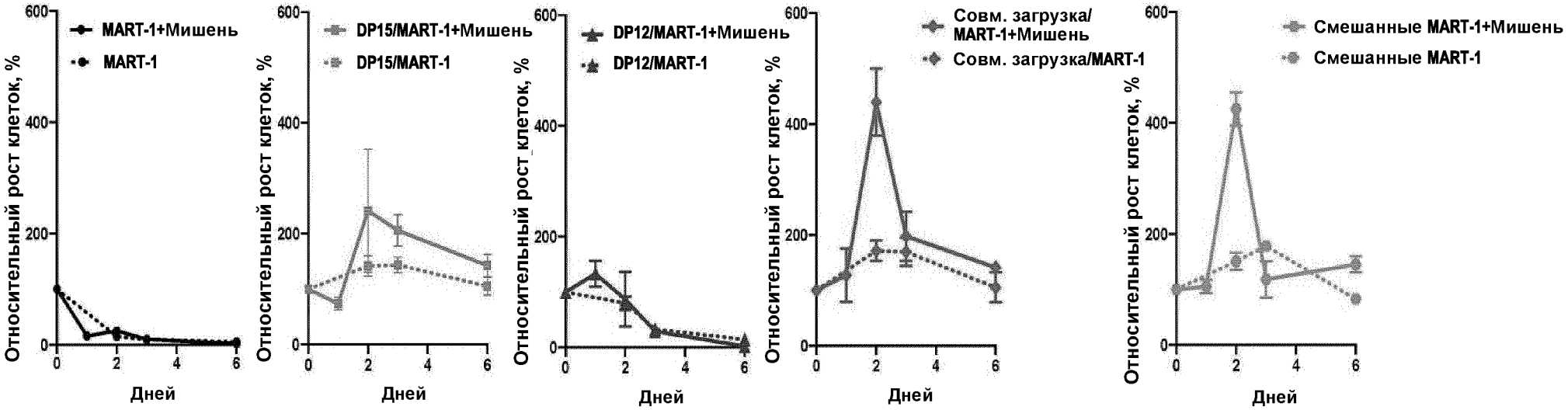


Низкое соотношение эффектор:мишень (1:10)

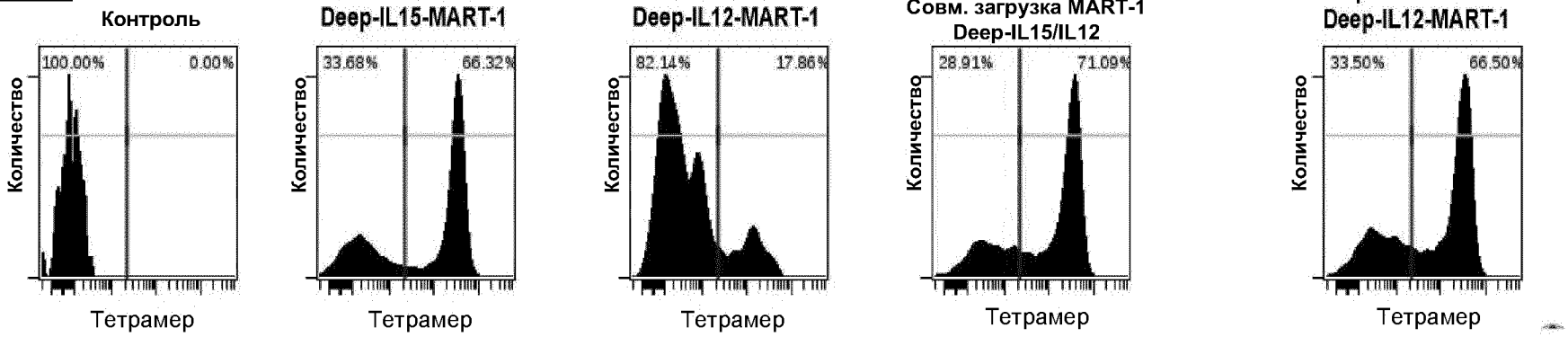
Фиг. 18B

Экспансия MART-1 клеток с мишенями (E:T = 10:1)

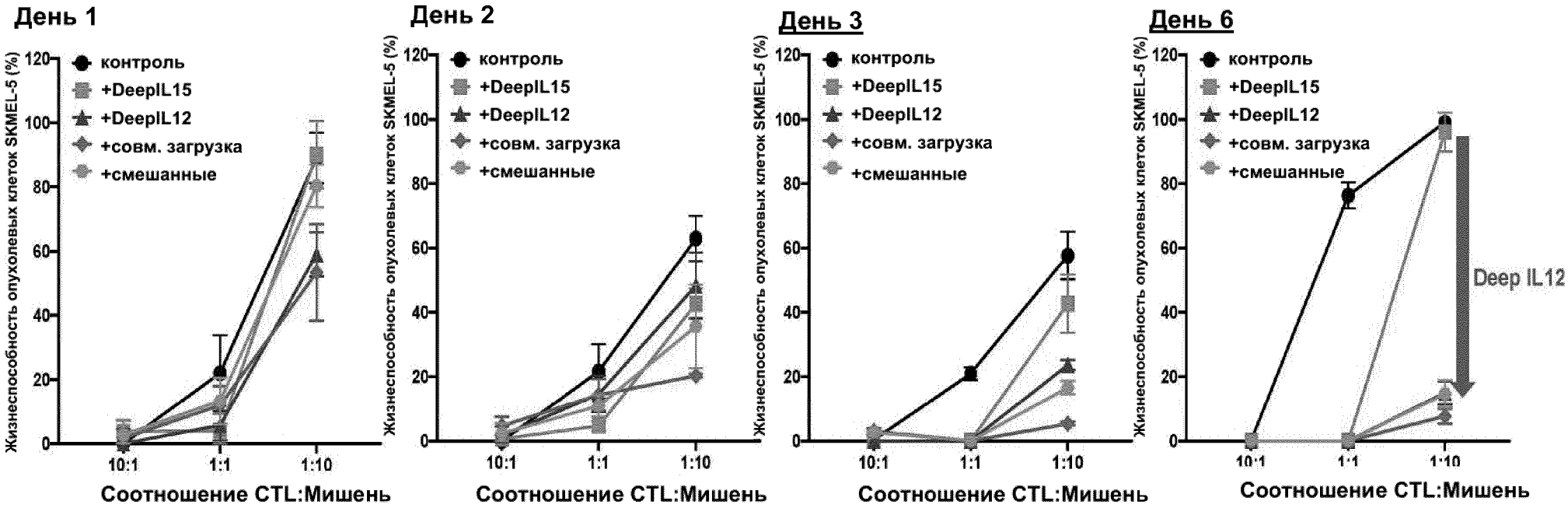
Фиг. 19



День 6

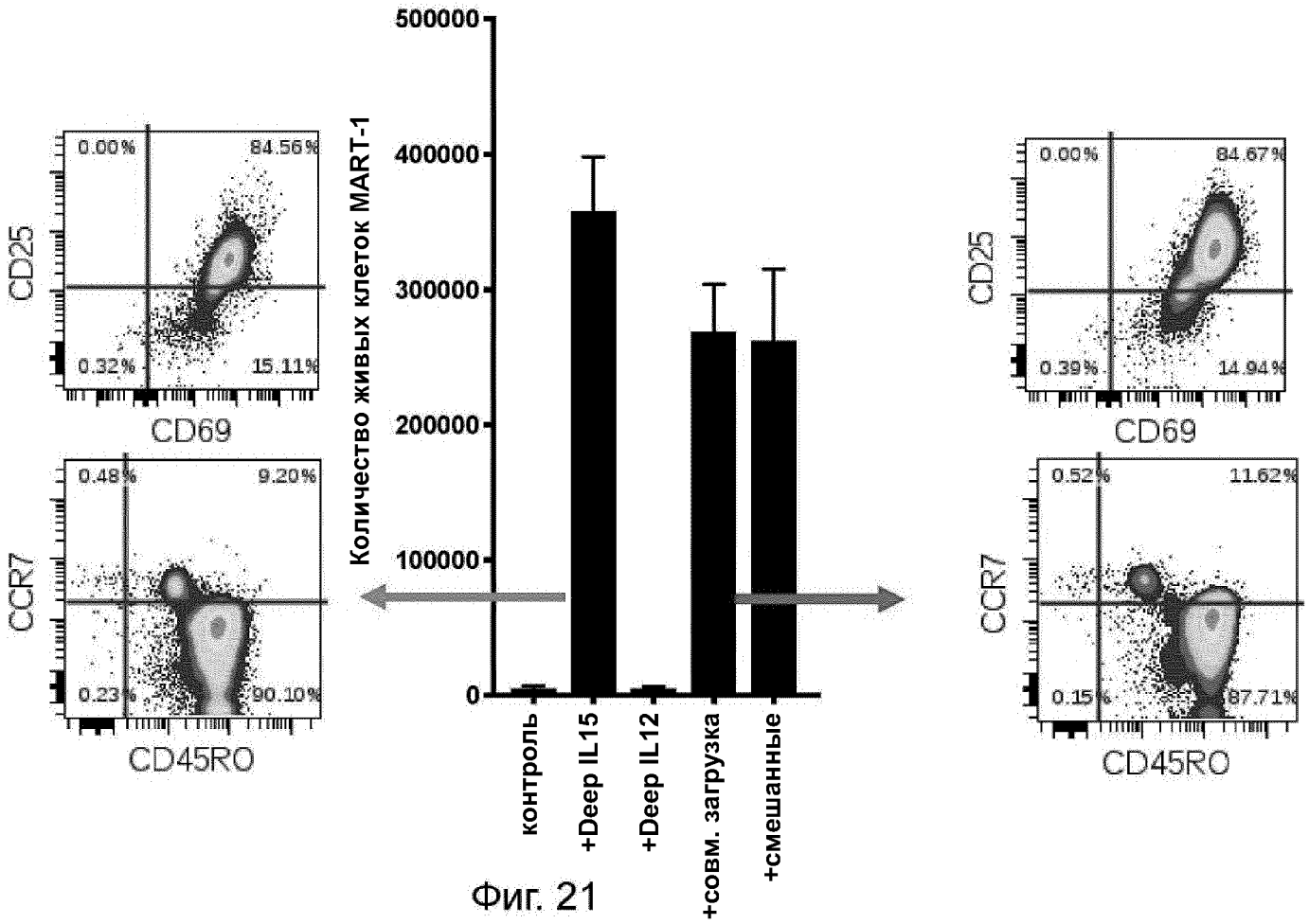


Цитотоксичность клеток-мишеней, определенная с помощью МТТ анализа



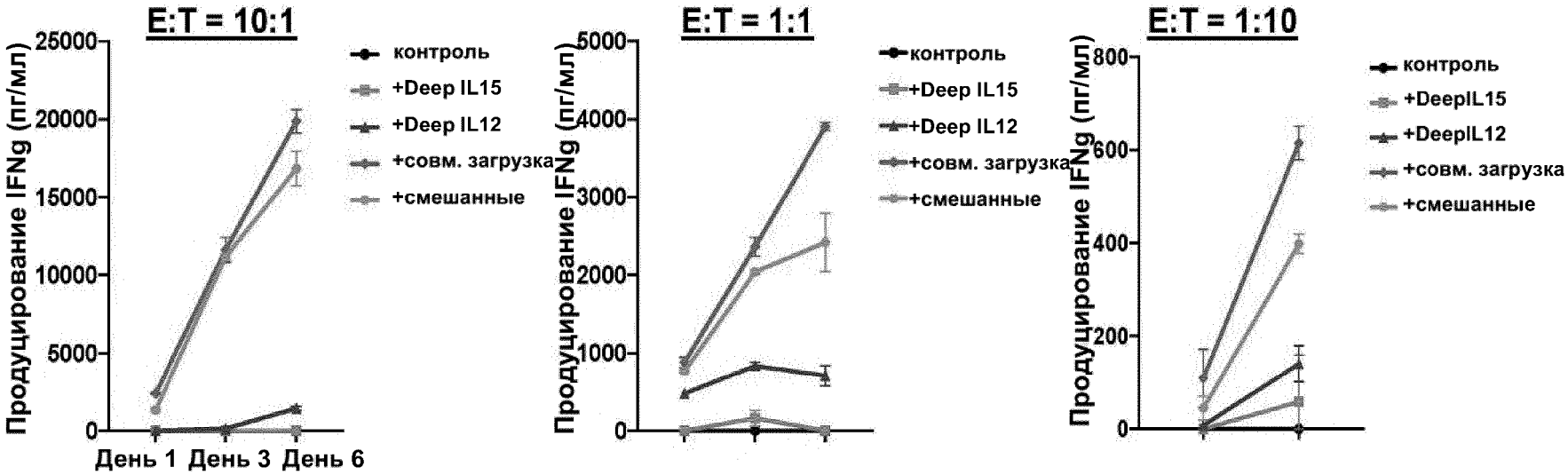
Фиг. 20

Экспансия клеток MART-1 в День 6 (E:T = 10:1)

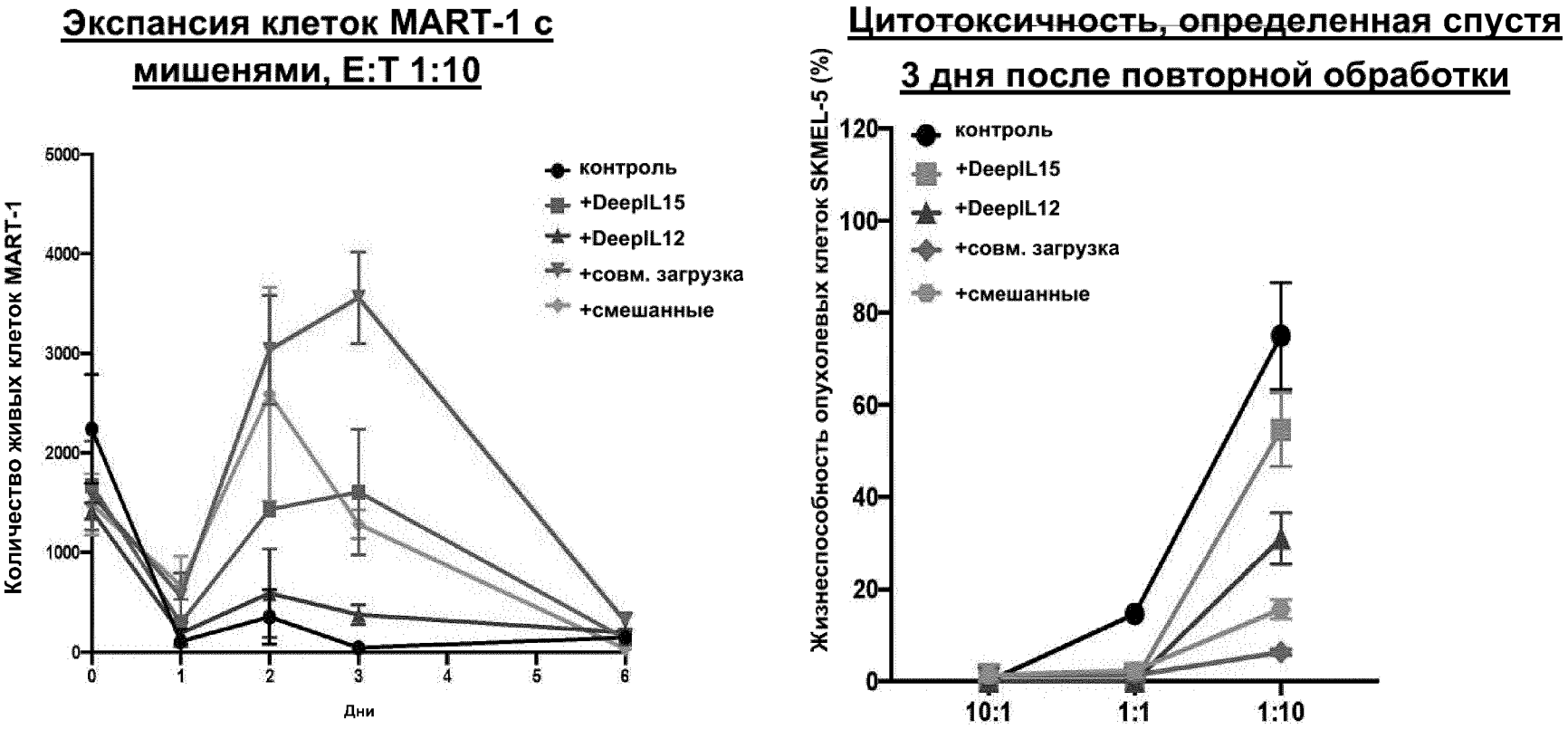


Фиг. 21

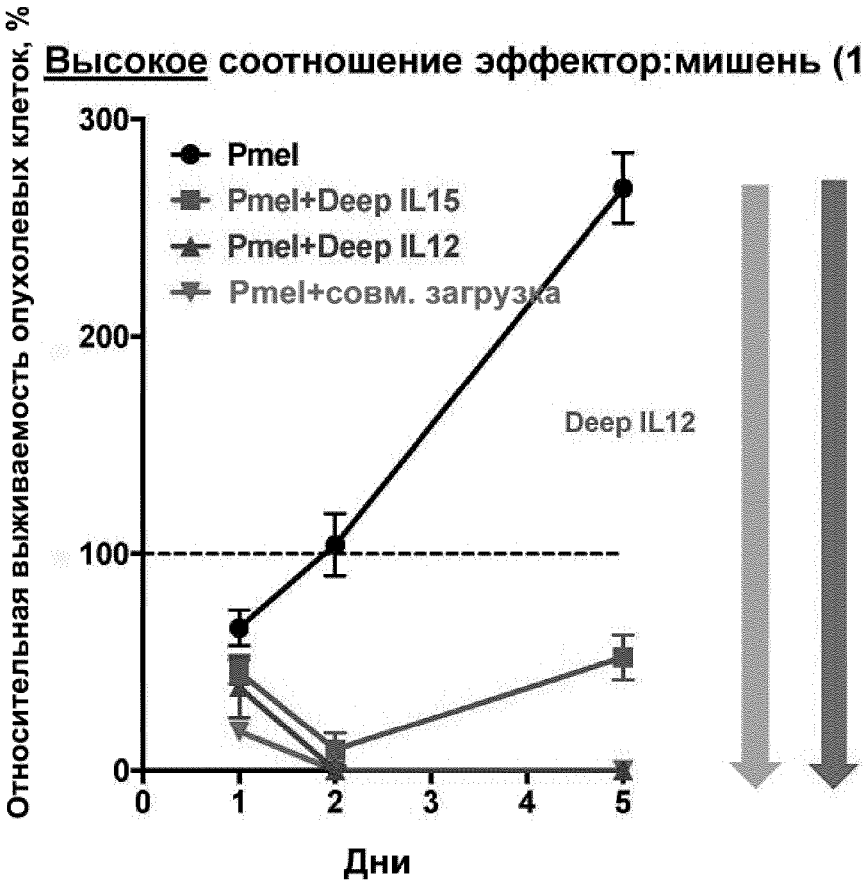
Продуцирование IFNg, определенное в клеточной культуре

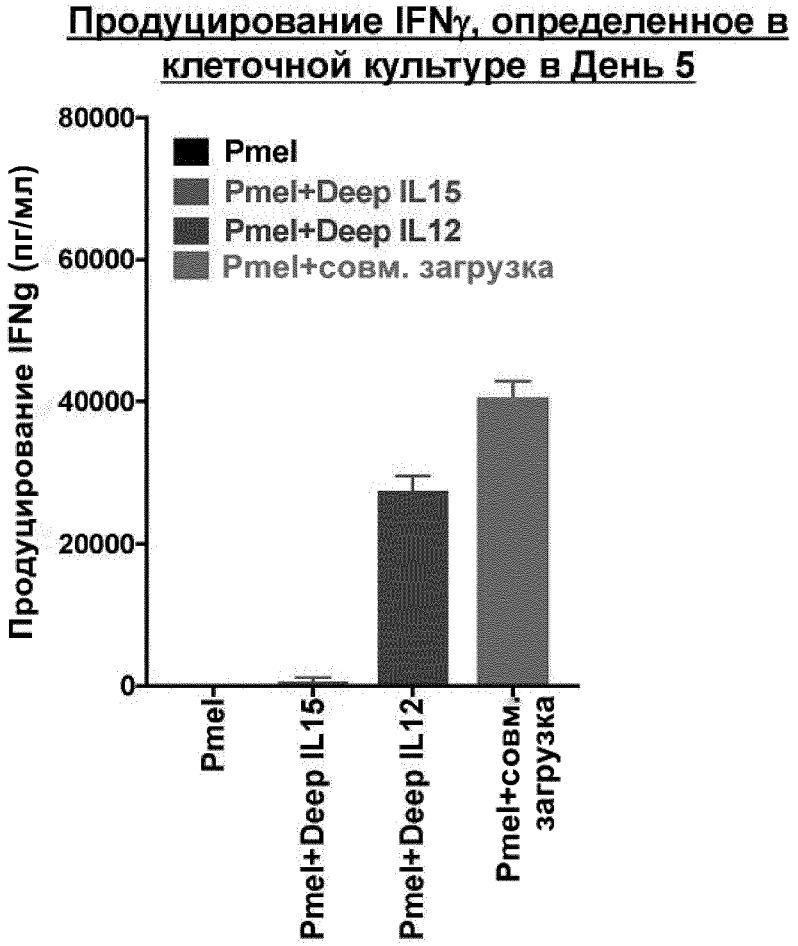


Фиг. 22

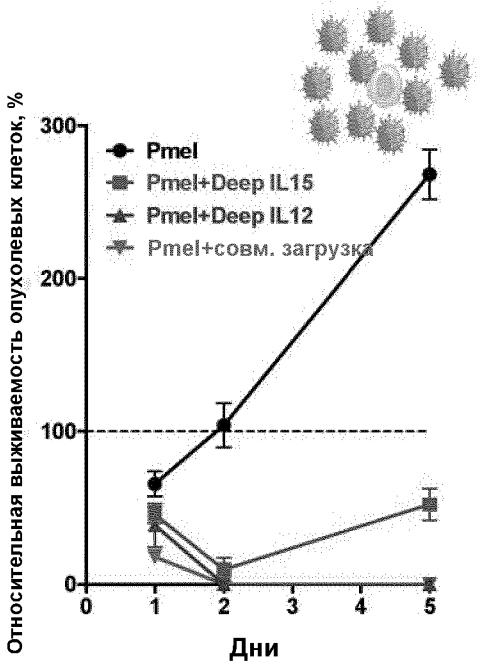

Экспансия клеток MART-1 с мишенями, E:T 1:10
Количество живых клеток MART-1
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
1
2
3
4
5
6
Дни
контроль
+DeepIL15
+DeepIL12
+совм. загрузка
+смешанные
Цитотоксичность, определенная спустя 3 дня после повторной обработки
Жизнеспособность опухолевых клеток SKMEL-5 (%)
120
100
80
60
40
20
0
10:1
1:1
1:10
контроль
+DeepIL15
+DeepIL12
+совм. загрузка
+смешанные

Фиг. 23A

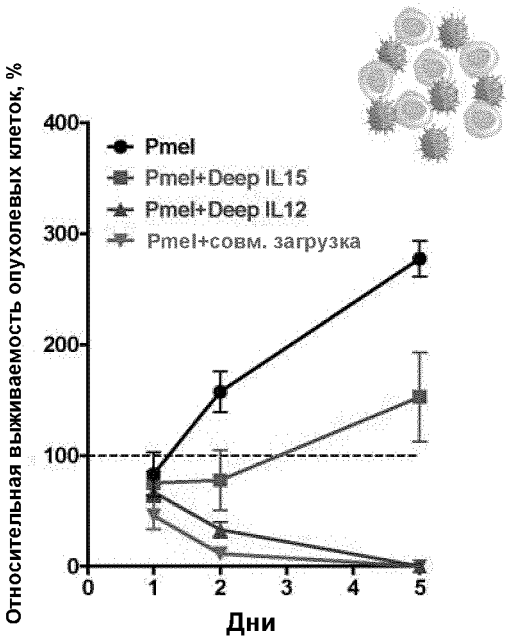

Высокое соотношение эффектор:мишень (10:1)
Относительная выживаемость опухолевых клеток, %
300
200
100
0
0
1
2
3
4
5
Дни
Pmel
Pmel+Deep IL15
Pmel+Deep IL12
Pmel+совм. загрузка
Deep IL12


Продуцирование IFNγ, определенное в клеточной культуре в День 5
Продуцирование IFNg (пг/мл)
80000
60000
40000
20000
0
Pmel
Pmel+Deep IL15
Pmel+Deep IL12
Pmel+совм. загрузка
Pmel
Pmel+Deep IL15
Pmel+Deep IL12
Pmel+совм. загрузка

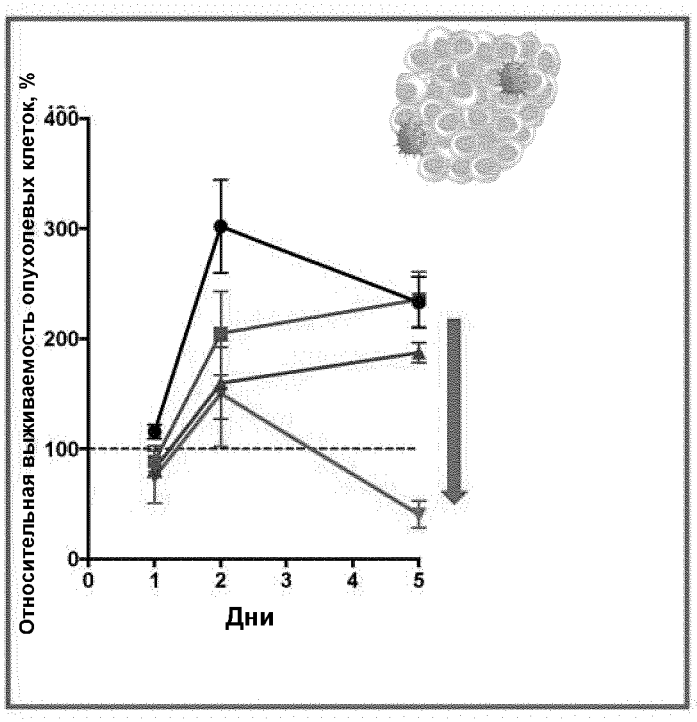
Фиг. 23B



Высокое соотношение эффектор:мишень (10:1)

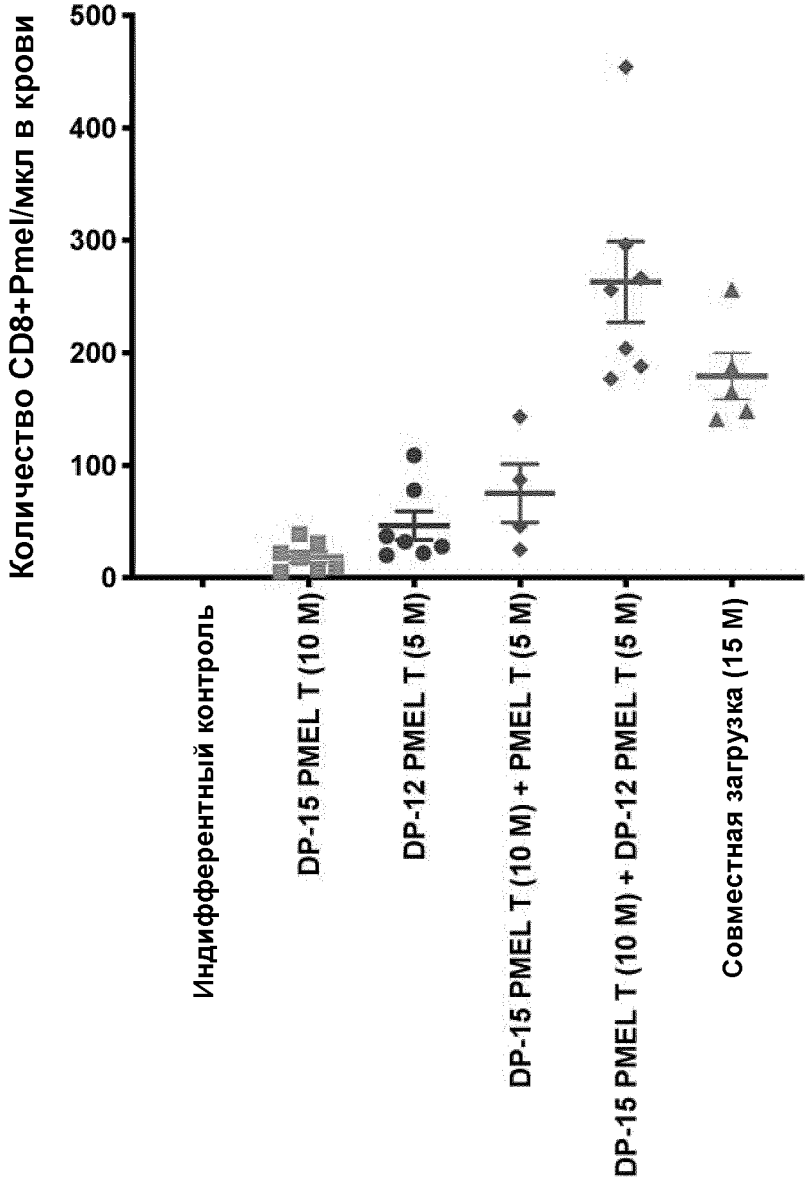


Среднее соотношение эффектор:мишень (1:1)

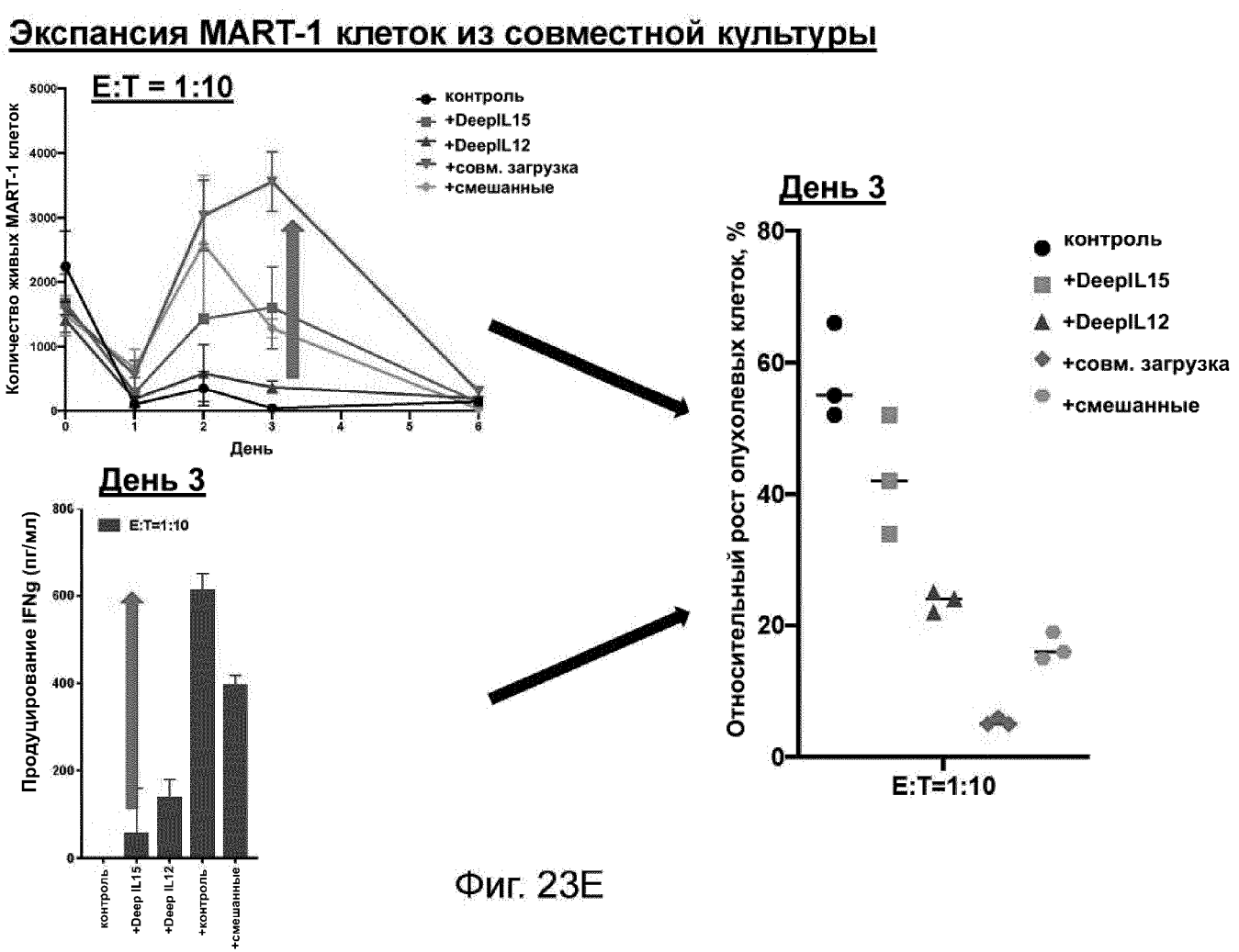


Низкое соотношение эффектор:мишень (1:10)

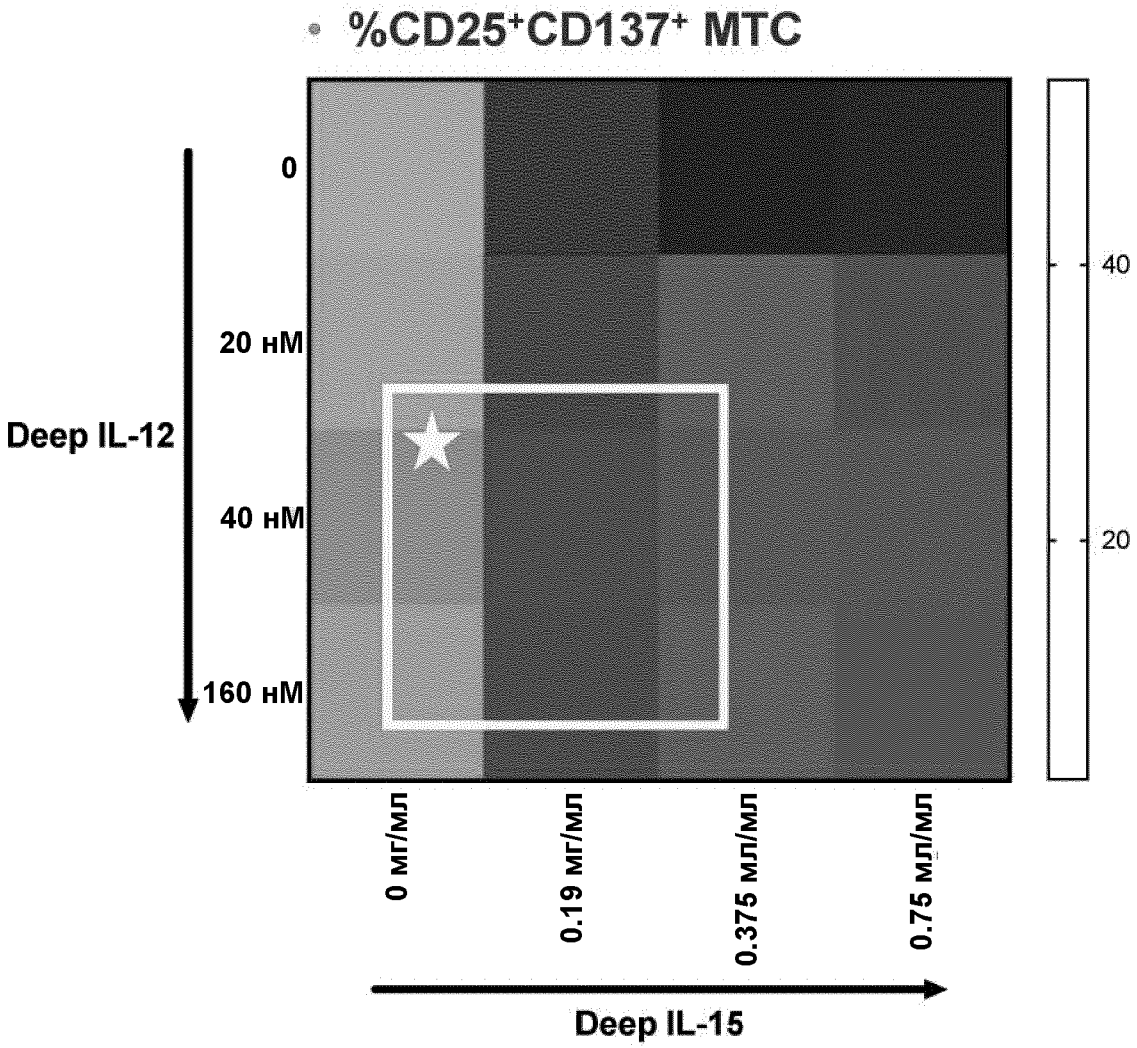
Фиг. 23C


Количество CD8+Pmel/мкл в крови
500
400
300
200
100
0
Индифферентный контроль
DP-15 PMEL T (10 M)
DP-12 PMEL T (5 M)
DP-15 PMEL T (10 M) + PMEL T (5 M)
DP-15 PMEL T (10 M) + DP-12 PMEL T (5 M)
Совместная загрузка (15 M)

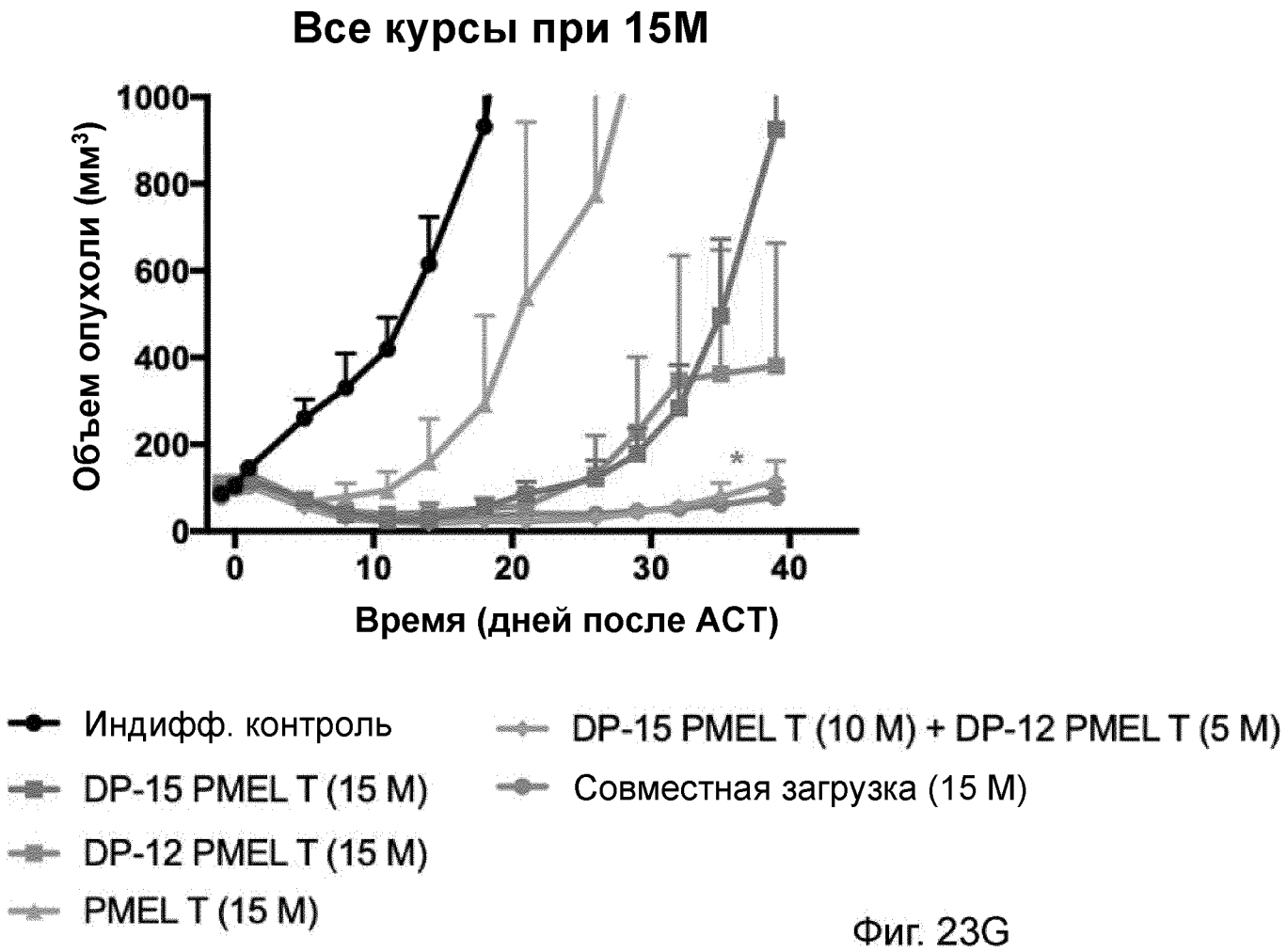
Фиг. 23D


Экспансия MART-1 клеток из совместной культуры
E:T = 1:10
Количество живых MART-1 клеток
День
контроль
+DeepIL15
+DeepIL12
+совм. загрузка
+смешанные
День 3
Продуцирование IFNg (пг/мл)
E:T=1:10
контроль
+Deep IL15
+Deep IL12
+контроль
+смешанные
День 3
Относительный рост опухолевых клеток, %
E:T=1:10
контроль
+DeepIL15
+DeepIL12
+совм. загрузка
+смешанные

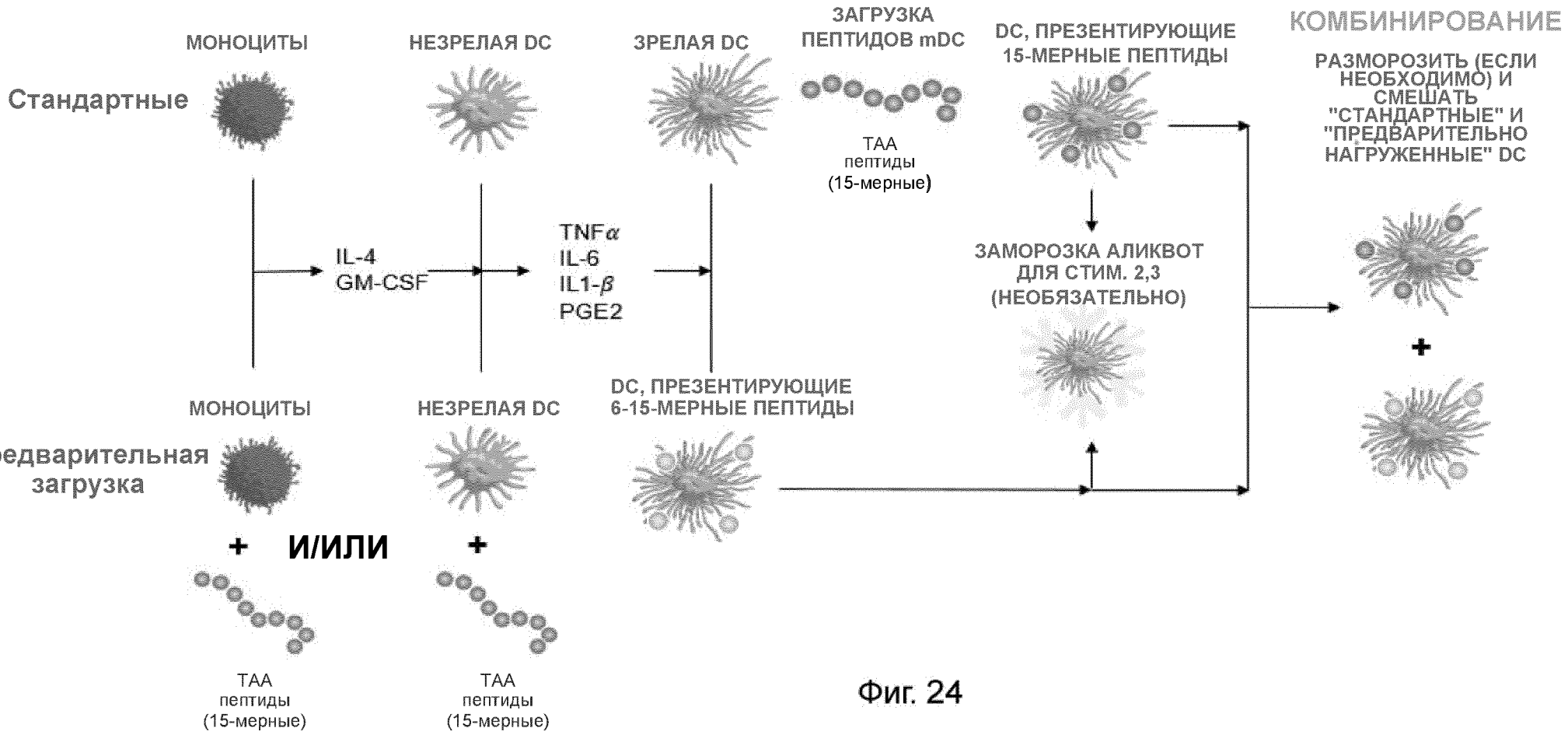
Фиг. 23E


%CD25+CD137+ MTC
0
20 нМ
40 нМ
160 нМ
Deep IL-12
40
20
0 мг/мл
0.19 мг/мл
0.375 мл/мл
0.75 мл/мл
Deep IL-15

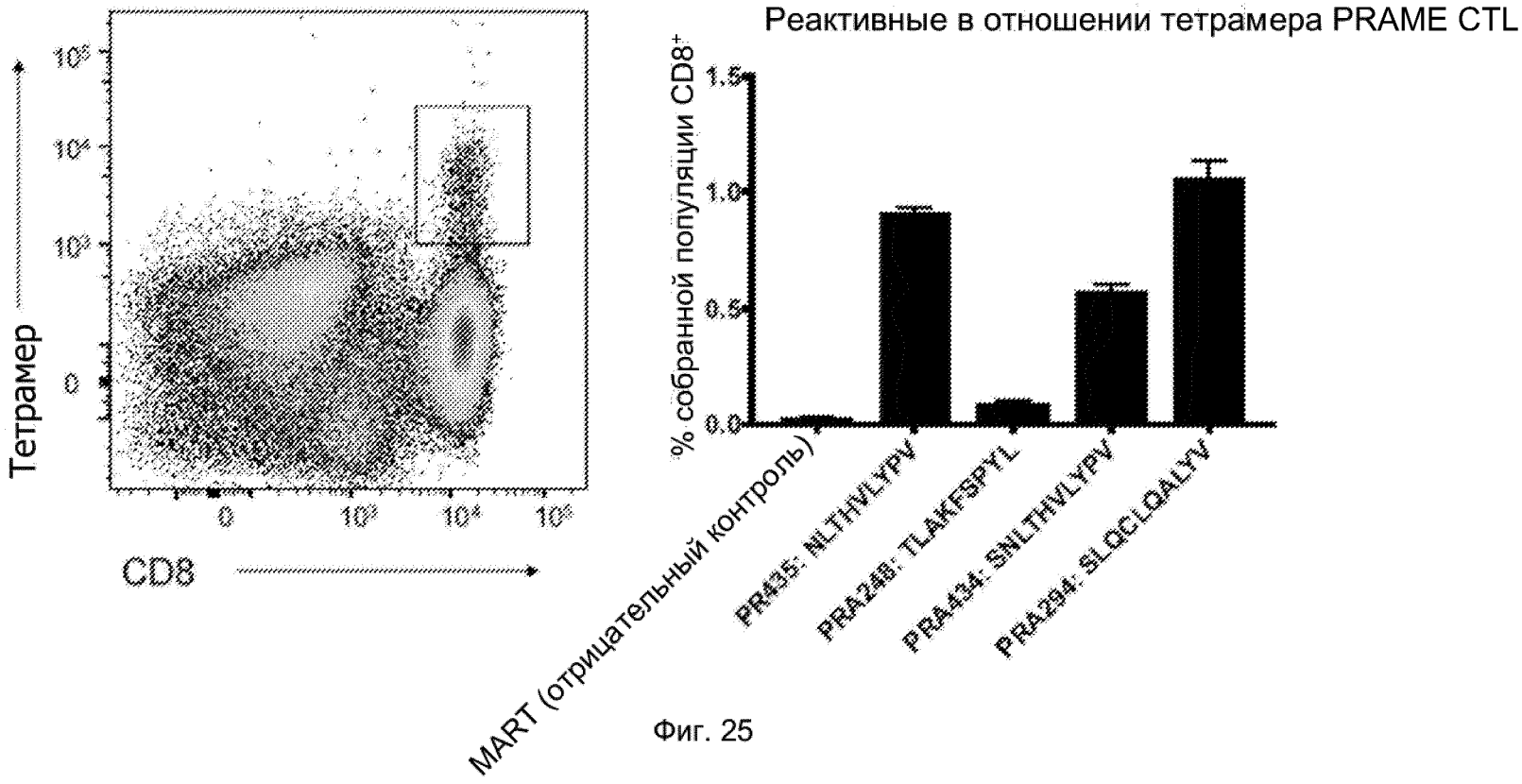
Фиг. 23F


Все курсы при 15M
Объем опухоли (мм3)
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
Время (дней после АСТ)
*
Индифф. контроль
DP-15 PMEL T (15 M)
DP-12 PMEL T (15 M)
PMEL T (15 M)
DP-15 PMEL T (10 M) + DP-12 PMEL T (5 M)
Совместная загрузка (15 M)

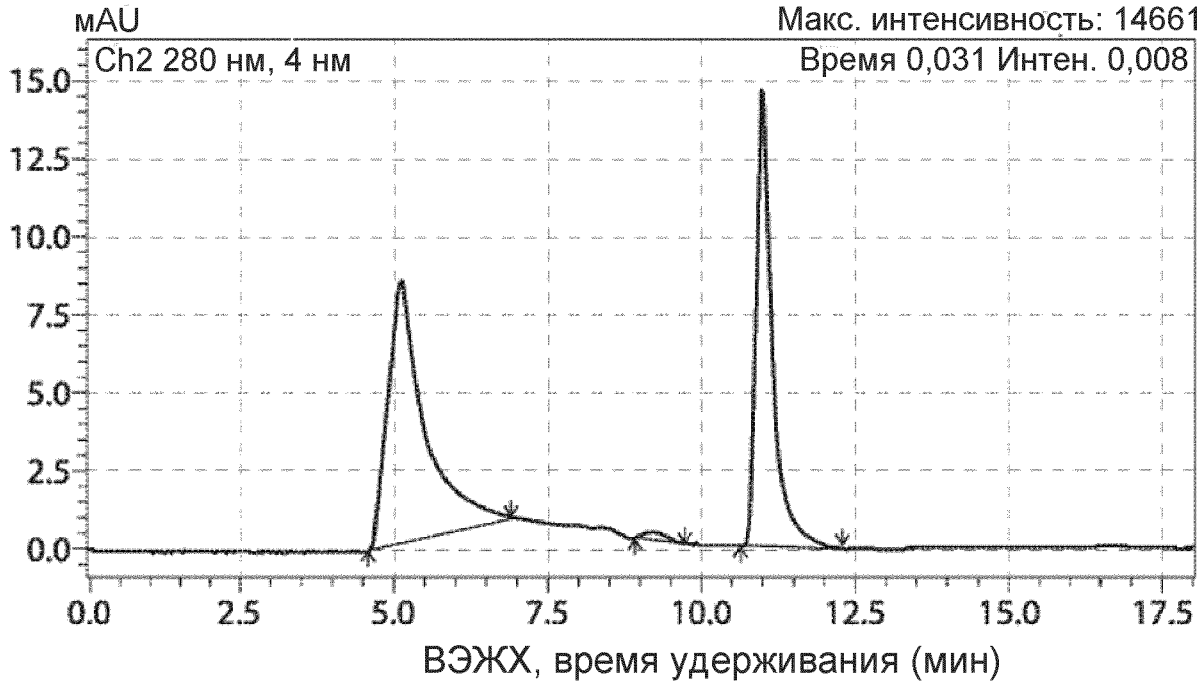
Фиг. 23G


МОНОЦИТЫ
НЕЗРЕЛАЯ DC
ЗРЕЛАЯ DC
ЗАГРУЗКА ПЕПТИДОВ mDC
DC, ПРЕЗЕНТИРУЮЩИЕ 15-МЕРНЫЕ ПЕПТИДЫ
КОМБИНИРОВАНИЕ
Стандартные
IL-4
GM-CSF
TNFα
IL-6
IL1-β
PGE2
TAA пептиды (15-мерные)
РАЗМОРОЗИТЬ (ЕСЛИ НЕОБХОДИМО) И СМЕШАТЬ "СТАНДАРТНЫЕ" И "ПРЕДВАРИТЕЛЬНО НАГРУЖЕННЫЕ" DC
ЗАМОРОЗКА АЛИКВОТ ДЛЯ СТИМ. 2,3 (НЕОБЯЗАТЕЛЬНО)
МОНОЦИТЫ
НЕЗРЕЛАЯ DC
DC, ПРЕЗЕНТИРУЮЩИЕ 6-15-МЕРНЫЕ ПЕПТИДЫ
Предварительная загрузка
+
И/ИЛИ
+
TAA пептиды (15-мерные)
TAA пептиды (15-мерные)

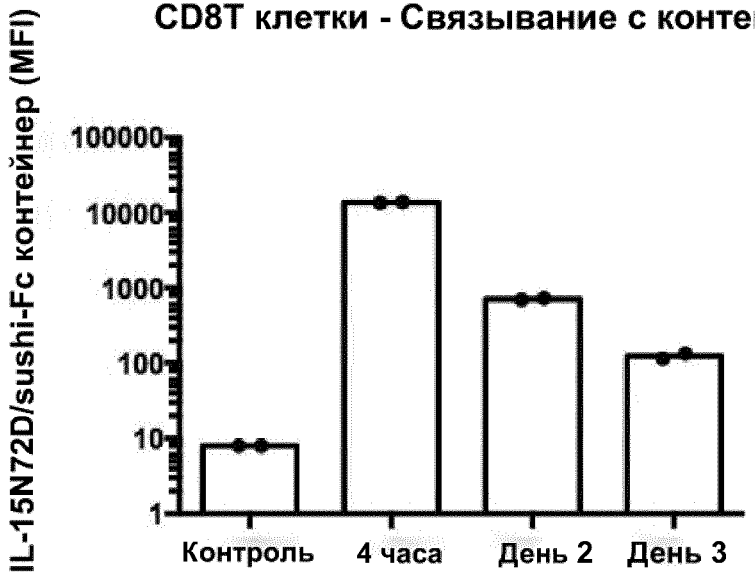
Фиг. 24


Тетрамер
CD8
0
10³
10⁴
10⁵
Реактивные в отношении тетрамера PRAME CTL
% собранной популяции CD8+
1.5
1.0
0.5
0.0
MART (отрицательный контроль)
PRA35: NLTHVLYPV
PRA248: TLAKFSPYL
PRA434: SNLTHVLYPV
PRA294: SLQCLQALYV

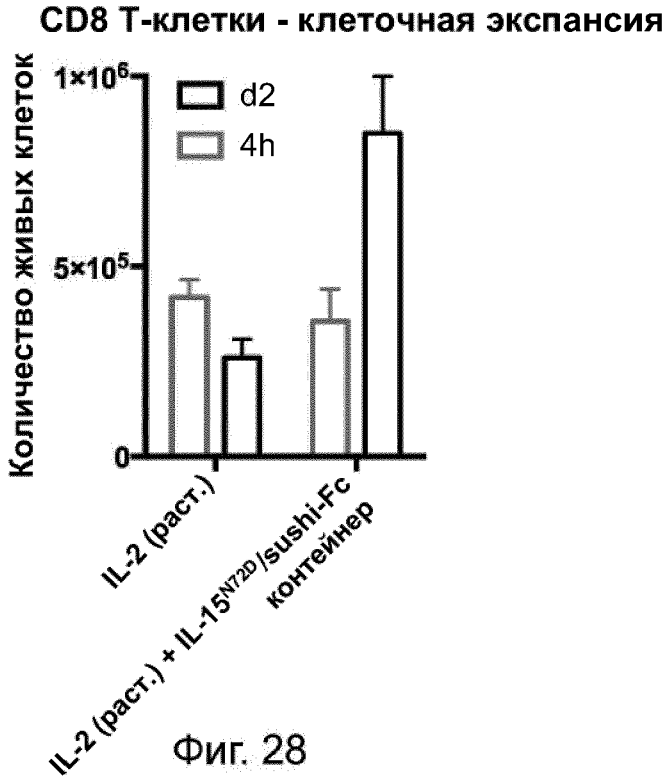
Фиг. 25


мAU
Макс. интенсивность: 14661
Ch2 280 нм, 4 нм
Время 0,031 Интен. 0,008
15.0
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
17.5
ВЭЖХ, время удерживания (мин)

Фиг. 26

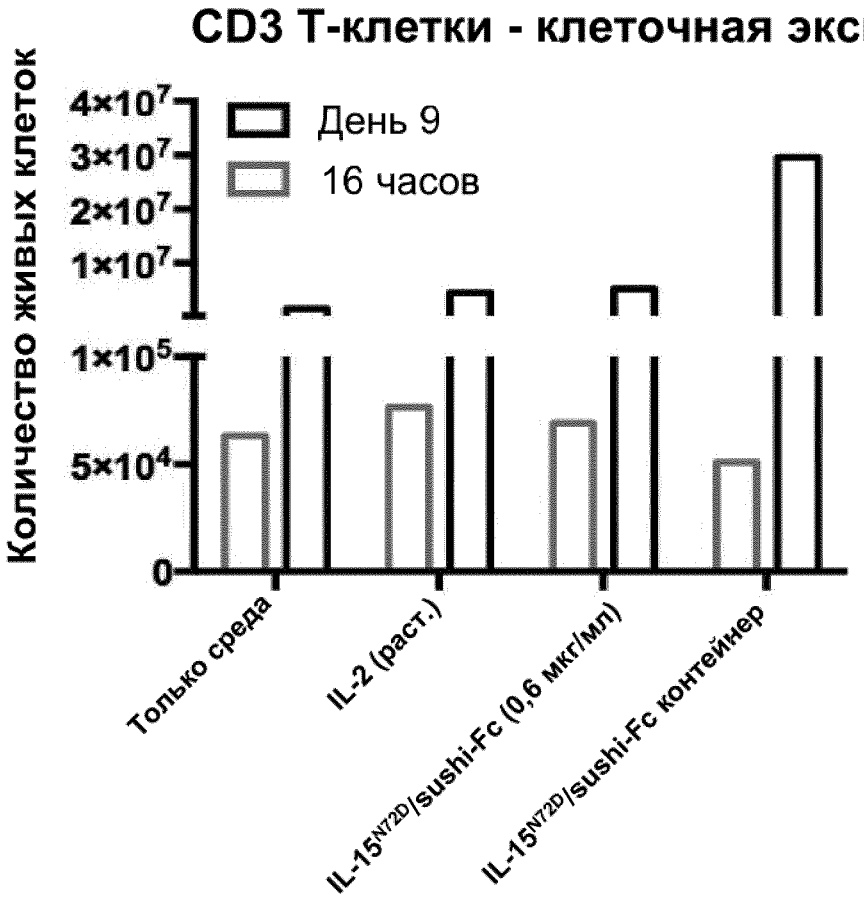

CD8T клетки - Связывание с контейнером
IL-15N72D/sushi-Fc контейнер (MFI)
100000
10000
1000
100
10
1
Контроль
4 часа
День 2
День 3

Фиг. 27

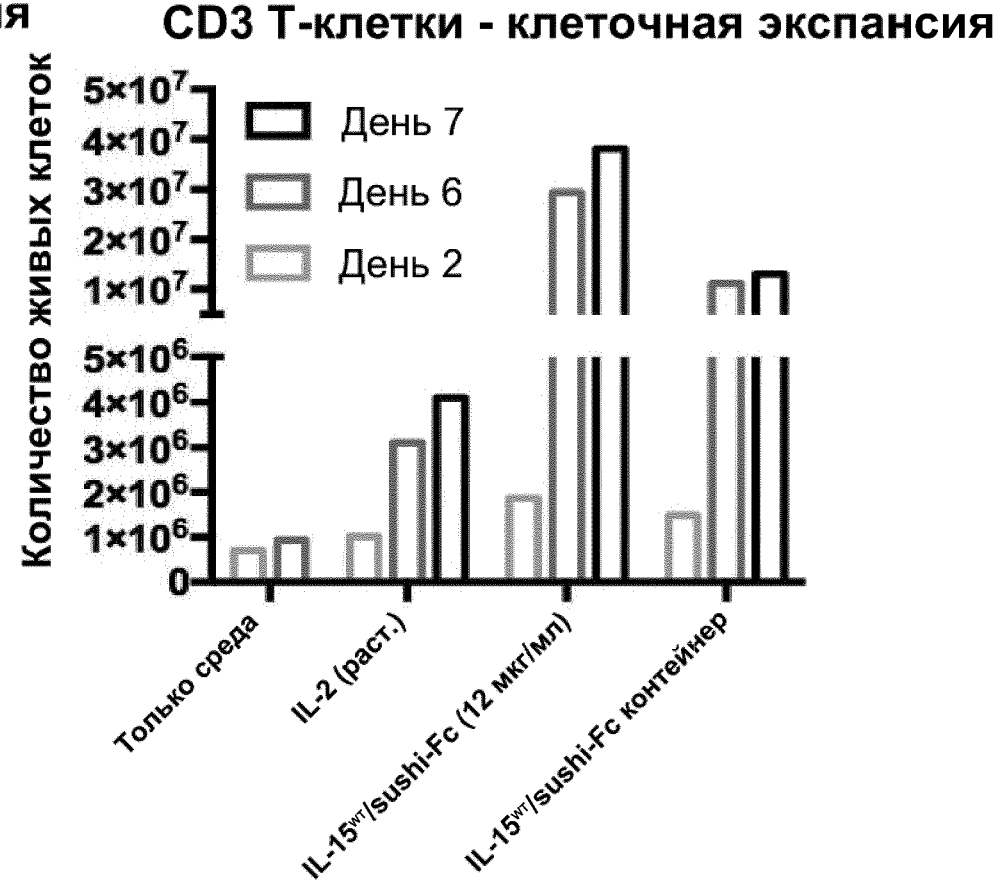

CD8 Т-клетки - клеточная экспансия
Количество живых клеток
1×10^6
5×10^5
0
d2
4h
IL-2 (раст.)
IL-2 (раст.) + IL-15N72D/sushi-Fc контейнер

Фиг. 28

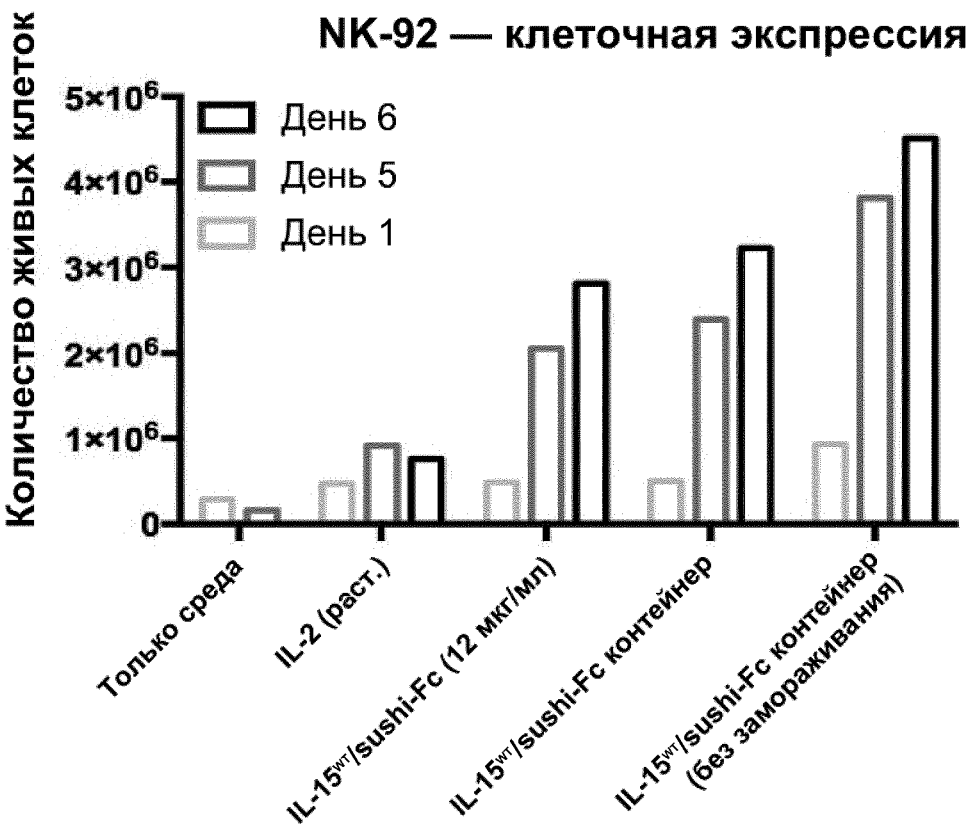
Фиг. 29A



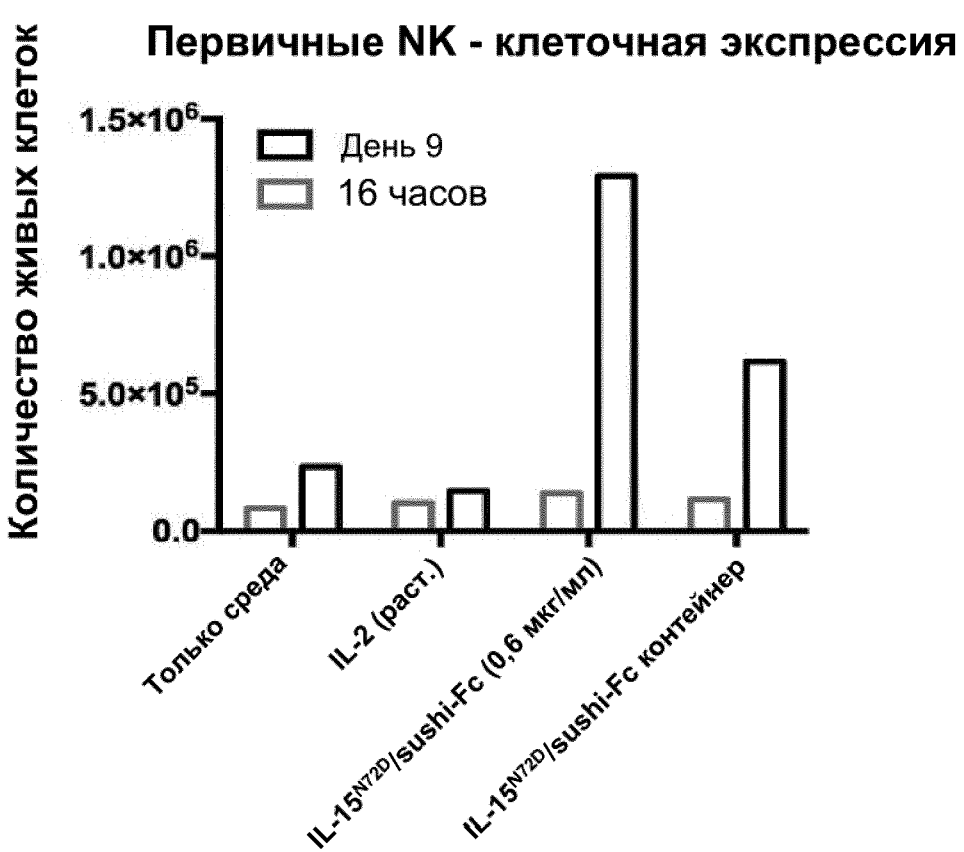
Фиг. 29B



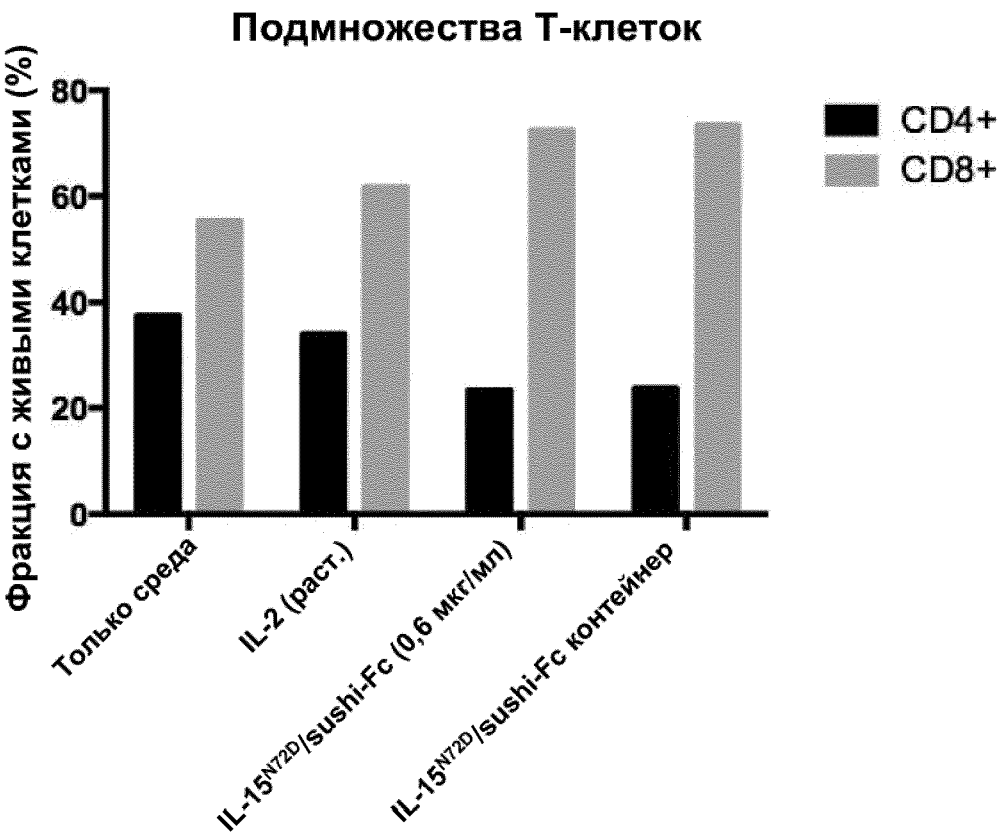
Фиг. 30A



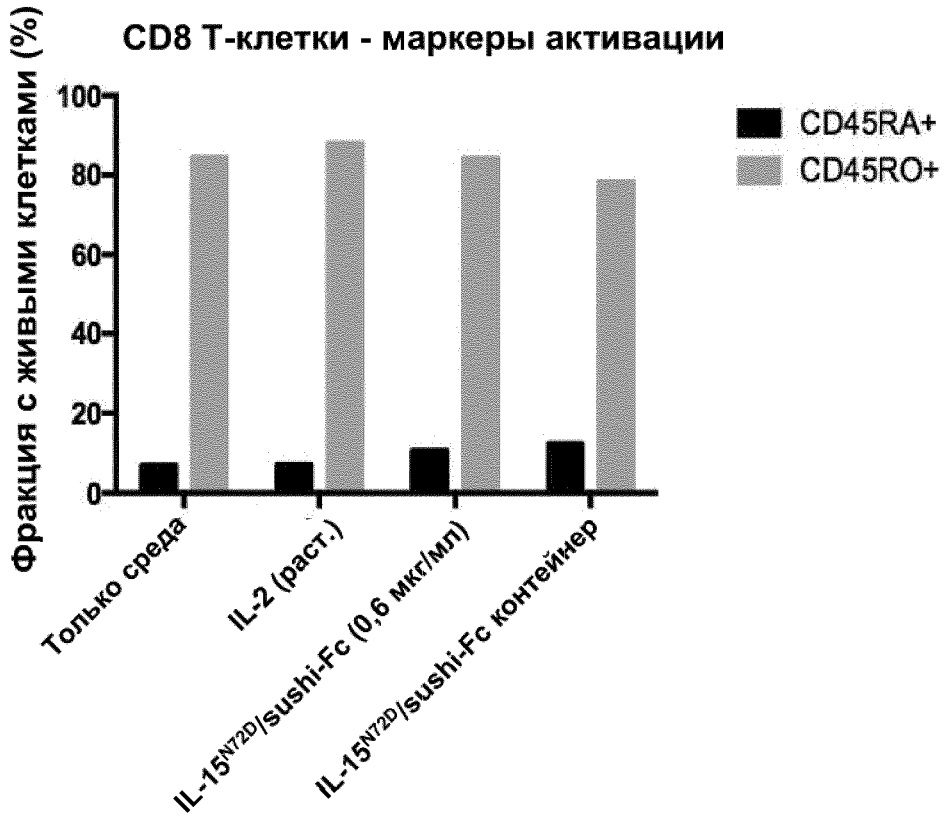
Фиг. 30B



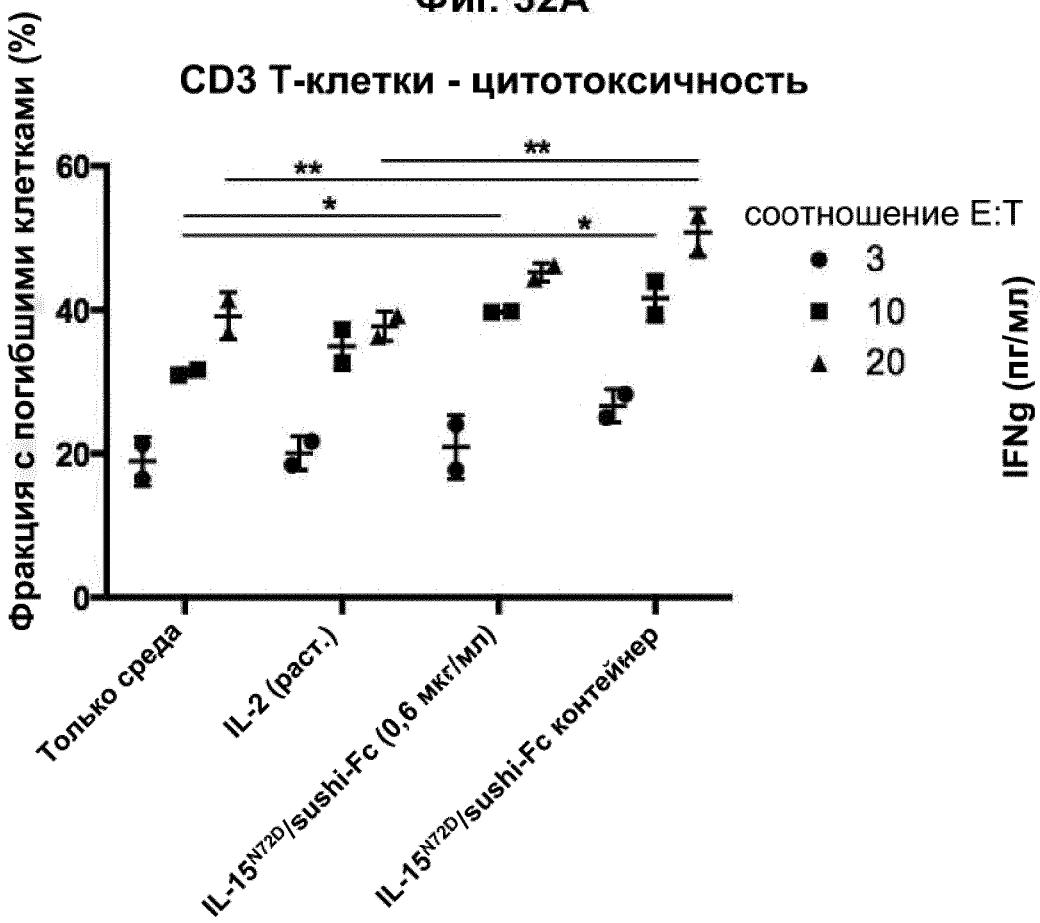
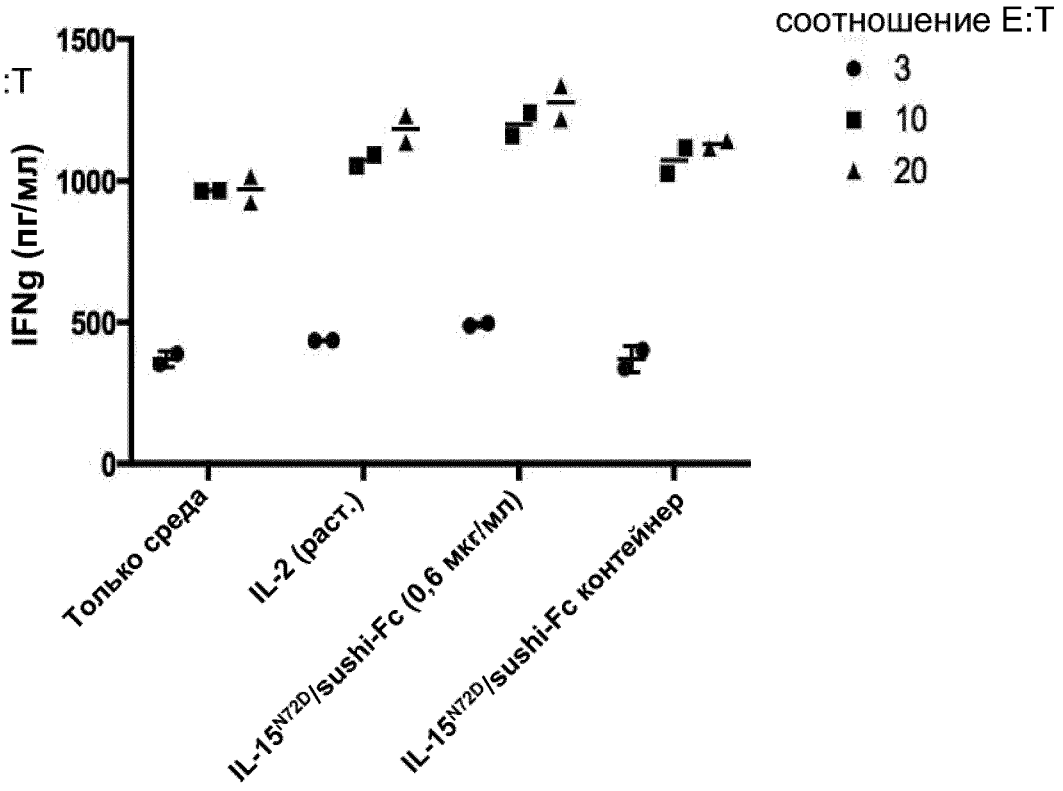
Фиг. 31A



Фиг. 31B



Фиг. 32A



Фиг. 32B