

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202291824** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2022.09.28

(51) Int. Cl. *C07K 14/54* (2006.01)  
*A61K 38/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.12.17

---

(54) **БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ВАРИАНТ IL-7**

---

(31) 19306671.9

(72) Изобретатель:

(32) 2019.12.17

Пуарье Никола, Мари Каролин,  
Морелло Ауроре (FR)

(33) EP

(86) PCT/EP2020/086600

(74) Представитель:

(87) WO 2021/122866 2021.06.24

Фелицына С.Б. (RU)

(71) Заявитель:

ОЗЕ ИММЬЮНОТЕРАПЬЮТИКС  
(FR)

---

(57) Изобретение относится к вариантам IL-7, содержащим его бифункциональным молекулам и к их применению.

**202291824**  
**A1**

**202291824**

**A1**

## БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ВАРИАНТ ИЛ-7

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области иммунотерапии. Настоящее изобретение относится к бифункциональной молекуле, содержащей вариант ИЛ-7.

Предшествующий уровень техники

Интерлейкин-7 является иммуностимулирующим цитокином из суперсемейства ИЛ-2 и играет важную роль в адаптивной иммунной системе, стимулируя иммунные ответы. Этот цитокин активирует иммунные функции за счет обеспечения выживания и дифференцировки Т-клеток и В-клеток, обеспечения выживания лимфоидных клеток, стимуляции активности естественных киллеров (NK). ИЛ-7 также регулирует развитие лимфатических узлов посредством клеток-индукторов лимфоидной ткани (LTi) и способствует выживанию и делению наивных Т-клеток или Т-клеток памяти. Кроме того, ИЛ-7 усиливает иммунный ответ у человека, способствуя секреции ИЛ-2 и интерферона- $\gamma$ . Рецептор ИЛ-7 является гетеродимерным и состоит из ИЛ-7R $\alpha$  (CD127) и общей  $\gamma$ -цепи (CD132).  $\gamma$ -Цепь экспрессируется на всех типах гемопоэтических клеток, тогда как ИЛ-7R $\alpha$  в основном экспрессируется лимфоцитами, которые включают В- и Т-лимфоидные предшественники, наивные Т-клетки и Т-клетки памяти. Низкая экспрессия ИЛ-7R $\alpha$  наблюдается на регуляторных Т-клетках по сравнению с эффекторными/наивными Т-клетками, которые экспрессируют более высокий уровень. Таким образом, CD127 используется в качестве поверхностного маркера для различения этих двух популяций. ИЛ-7R $\alpha$  также экспрессируется на врожденных лимфоидных клетках, таких как NK и Т-клетки, происходящие из лимфоидной ткани кишечника (GALT). Цепь ИЛ-7R $\alpha$  (CD127) является общей с TSLP (опухолевой стромальный лимфопоэтин), а CD132 ( $\gamma$  цепь) является общей с ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-9, ИЛ-15 и интерлейкином-21. Посредством CD127/CD132 индуцируются два основных сигнальных пути: (1) путь янус-киназы/STAT (т.е. Jak-Stat-3 и 5) и (2) путь фосфатидилинозитол-3-киназы (т.е. PI3K-Akt). Введение ИЛ-7 хорошо переносится пациентом и приводит к экспансии CD8 и CD4 клеток и относительному уменьшению количества CD4<sup>+</sup> Т-регуляторных клеток. Рекомбинантный ИЛ-7 сам по себе или ИЛ-7, слитый с N-концевым доменом Fc антител, был протестирован в клинических условиях для того, чтобы подтвердить увеличение периода полураспада ИЛ-7 за счет слияния с Fc доменом и повышение долгосрочной эффективности лечения.

Рекомбинантный цитокин ИЛ-7 имеет плохой фармакокинетический профиль, что ограничивает его применение в клинике. После инъекции рекомбинантный ИЛ-7 быстро распределяется и элиминируется, что приводит к нежелательному периоду полувыведения

IL-7 у человека (в диапазоне от 6,8 до 9,5 часов) (Sportes et al., Clin Cancer Res. 2010 Jan 15;16(2):727-35) или у мышей (2,5 часа) (Hyо Jung Nam et al., Eur. J. Immunol. 2010. 40:351-358). Объединение Fc-домена IgG с IL-7 продлевает период его полувыведения, поскольку IgG может связываться с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) и участвовать в трансцитозе и эндосомальной рециркуляции молекулы. Для гибридной молекулы Fc-IL-7 наблюдается продолжительный период полувыведения из кровотока ( $t_{1/2} = 13$  ч), который остается на обнаруживаемых уровнях (200 пг/мл) до 8 дней после введения мышам (Hyо Jung Nam et al., Евро. J. Immunol. 2010. 40:351-358). Хотя период полувыведения цитокина IL-7, слитого с доменом Fc, увеличивается, молекула требует частых инъекций *in vivo*, чтобы иметь биологический эффект. В случае иммуноцитоклиновых молекул цитокин объединяют с антителом (например, нацеленным на раковый антиген, блокаду иммунных контрольных точек, костимулирующую молекулу...) для преимущественной концентрации цитокина на клетках-мишенях, экспрессирующих антиген. Однако аффинность цитокина IL-7 к своему рецептору CD127/CD132 (от наномолярного до пикомолярного диапазона) может быть выше, чем аффинность антитела к своей мишени. Следовательно, цитокин будет управлять фармакокинетикой продукта, что приведет к быстрому истощению доступного лекарственного средства *in vivo* из-за механизма целевого распределения лекарственного средства (TMDD). Такая быстрая элиминация была описана для таких иммуноцитоклинов, как IL-2 или IL-15, что свидетельствует о том, что фармакокинетические свойства слитого белка могут напрямую влиять на эффективность лекарственного средства (List et Neri Clin Pharmacol. 2013; 5(Suppl 1): 29–45).

Таким образом, в данной области техники сохраняется значительная потребность в новом и улучшенном варианте IL-7, который позволяет улучшить распределение и уменьшить элиминацию продуктов IL-7, особенно бифункциональной молекулы, содержащей IL-7. Авторы раскрытого в данном описании изобретения сделали значительный шаг вперед в этом направлении.

#### Сущность изобретения

Авторы предлагают мутации IL-7 и оптимизированные каркасы Fc для улучшения распределения и элиминации бифункциональной молекулы для усиления биологического эффекта *in vivo*. Авторы наблюдали, что мутации IL-7, особенно в сочетании с изотипом IgG и определенной длиной линкера, обеспечивают лучшее распределение бифункциональной молекулы и более длительный период полувыведения *in vivo*.

Предлагаемые в данном изобретении бифункциональные молекулы прежде всего демонстрируют хорошую фармакокинетическую и фармакодинамику *in vivo*, особенно по

сравнению с бифункциональными молекулами, содержащими IL-7 дикого типа. Кроме того, с этими новыми молекулами оказались связаны преимущественные и неожиданные свойства, подробно раскрытые во введении к разделу «Подробное описание изобретения» и в Примерах.

В первом аспекте изобретение относится к бифункциональной молекуле, содержащей вариант интерлейкина 7 (IL-7), конъюгированный со связывающим фрагментом, где:

- связывающий фрагмент связывается с мишенью, специфически экспрессируемой на поверхности иммунных клеток,

- вариант IL-7 обладает по меньшей мере 75% идентичностью с человеческим IL-7 дикого типа (wth-IL-7), содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, причем вариант содержит по меньшей мере одну аминокислотную мутацию, которая i) снижает аффинность варианта IL-7 к рецептору IL-7 (IL-7R) по сравнению с аффинностью wth-IL-7 к IL-7R, и ii) улучшает фармакокинетику бифункциональной молекулы содержащей вариант IL-7, по сравнению с бифункциональной молекулой, содержащей wth-IL-7.

В частности, по меньшей мере одна мутация представляет собой аминокислотную замену или группу аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из (i) C2S-C141S и C47S-C92S, C2S-C141S и C34S-C129S или C47S-C92S и C34S-C129S, (ii) W142H, W142F или W142Y, (iii) D74E, D74Q или D74N, iv) Q11E, Y12F, M17L, Q22E и/или K81R; или любой их комбинации (нумерация аминокислот такая, как в SEQ ID NO: 1).

В частности, изобретение касается бифункциональной молекулы, содержащей вариант интерлейкина 7 (IL-7), конъюгированный со связывающим фрагментом, где:

- связывающий фрагмент связывается с мишенью, специфически экспрессируемой на поверхности иммунных клеток,

- вариант IL-7 обладает по меньшей мере 75% идентичностью с человеческим IL-7 дикого типа (wth-IL-7), содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, где вариант содержит по меньшей мере одну аминокислотную мутацию, выбранную из группы, состоящей из (i) W142H, W142F или W142Y, (ii) C2S-C141S и C47S-C92S, C2S-C141S и C34S-C129S, или C47S-C92S и C34S-C129S, (iii) D74E, D74Q или D74N, iv) Q11E, Y12F, M17L, Q22E и/или K81R; или любой их комбинации (нумерация аминокислот такая же, как в SEQ ID NO: 1), которая i) снижает аффинность варианта IL-7 к рецептору IL-7 (IL-7R) по сравнению с аффинностью wth-IL-7 к IL-7R, и ii) улучшает фармакокинетику бифункциональной молекулы, содержащей вариант IL-7, по сравнению с бифункциональной молекулой,

содержащей wth-IL-7.

В одном аспекте вариант IL-7 содержит группу аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из C2S-C141S и C47S-C92S, C2S-C141 и C34S-C129S, и C47S-C92S и C34S-C129S (нумерация аминокислот такая же, как в SEQ ID NO: 1).

В другом аспекте вариант IL-7 содержит аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из W142H, W142F и W142Y (нумерация аминокислот такая же, как в SEQ ID NO: 1).

В другом аспекте вариант IL-7 содержит аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из D74E, D74Q и D74N (нумерация аминокислот такая же, как в SEQ ID NO: 1).

В частности, вариант IL-7 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 2-15.

В одном аспекте связывающий фрагмент содержит константный домен тяжелой цепи, предпочтительно Fc-домен, IgG1 человека, необязательно с заменой или комбинацией замен, выбранных из группы, состоящей из T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E; K322A и K444A, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из N297A, необязательно в сочетании с M252Y/S254T/T256E и L234A/L235A.

В частности, связывающий фрагмент содержит константный домен тяжелой цепи, предпочтительно Fc-домен, IgG4 человека, необязательно с заменой или комбинацией замен, выбранных из группы, состоящей из S228P; L234A/L235A, S228P + M252Y/S254T/T256E.17 и K444A.

Предпочтительно иммунная клетка представляет собой Т-клетку, предпочтительно истощенную Т-клетку.

В одном аспекте мишень экспрессируется Т-клетками, и связывающий фрагмент связывается с мишенью, выбранной из группы, состоящей из PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 и CD8.

Предпочтительно мишень экспрессируется истощенными Т-клетками, и связывающий фрагмент связывается с мишенью, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из PD-1, CTLA-4, BTLA, TIGIT, LAG3 и TIM3.

В одном аспекте связывающая группа представляет собой антитело или его

антигенный фрагмент, и N-конец варианта IL-7 слит с C-концом константного домена тяжелой или легкой цепи антитела или фрагмента этого антитела, предпочтительно с C-концом константного домена тяжелой цепи, необязательно посредством пептидного линкера.

В другом аспекте вариант IL-7 слит со связывающим фрагментом посредством пептидного линкера, выбранного из группы, состоящей из GGGGS (SEQ ID NO: 68), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 67), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 69) и GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 70), предпочтительно представляющего собой (GGGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 70).

В одном аспекте молекула содержит первый мономер, содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный через C-конец с N-концом первой гетеродимерной Fc-цепи, необязательно через пептидный линкер, причем указанная первая гетеродимерная Fc-цепь ковалентно связана через C-конец с N-концом варианта IL-7, необязательно через пептидный линкер, и второй мономер, содержащий комплементарную вторую гетеродимерную Fc-цепь, лишенную антигенсвязывающего домена. Предпочтительно во втором мономере комплементарная вторая гетеродимерная Fc-цепь ковалентно связана с вариантом IL-7, необязательно через пептидный линкер, предпочтительно ковалентно связана через C-конец с N-концом варианта IL-7, необязательно через пептидный линкер.

В другом аспекте молекула содержит первый мономер, содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный через C-конец с N-концом первой гетеродимерной Fc-цепи, необязательно через пептидный линкер, причем указанная первая гетеродимерная Fc-цепь не содержит IL-7, и второй мономер, содержащий комплементарную вторую гетеродимерную Fc-цепь, лишенную антигенсвязывающего домена, при этом указанная вторая гетеродимерная Fc-цепь ковалентно связана с вариантом IL-7, необязательно через пептидный линкер, предпочтительно связана через C-конец с N-концом варианта IL-7, необязательно через пептидный линкер.

В другом аспекте молекула содержит первый мономер, содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный через C-конец с N-концом первой гетеродимерной Fc-цепи, необязательно через пептидный линкер, и второй мономер, содержащий антигенсвязывающий домен ковалентно связан через C-конец с N-концом комплементарной второй гетеродимерной цепи Fc, необязательно через пептидный линкер, при этом только одна из гетеродимерных цепей Fc, предпочтительно первая, ковалентно связана через C-конец с N-концом варианта IL-7.

В частности, антигенсвязывающий домен бифункциональной молекулы

представляет собой домен Fab, Fab', одноцепочечный переменный фрагмент (scFV) или однодоменное антитело (sdAb).

Предпочтительно антигенсвязывающий домен содержит или, по существу, состоит из: (i) тяжелой цепи, содержащей CDR1 с SEQ ID NO: 51, CDR2 с SEQ ID NO: 53 и CDR3 с SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 или 62; и (ii) легкой цепи, содержащей CDR1 с SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 65, CDR2 с SEQ ID NO: 66 и CDR3 с SEQ ID NO: 16.

В частности, антигенсвязывающий домен содержит или, по существу, состоит из:

(a) переменной области тяжелой цепи (VH), содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25;

(b) переменной области легкой цепи (VL), содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28.

Предпочтительно антигенсвязывающий домен содержит или, по существу, состоит из переменной области тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 24 и переменной области легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 28.

Изобретение также относится к выделенной последовательности нуклеиновой кислоты или группе выделенных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих бифункциональную молекулу по изобретению.

Изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту по изобретению.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей бифункциональную молекулу, нуклеиновую кислоту или клетку-хозяина по изобретению, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем.

Наконец, изобретение касается бифункциональной молекулы, нуклеиновой кислоты, клетки-хозяина или фармацевтической композиции согласно изобретению, для применения в качестве лекарственного средства, особенно для применения при лечении ракового или инфекционного заболевания.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Анализ ELISA на связывание PD-1. Иммуобилизовали человеческий рекомбинантный белок PD-1 (rPD1) и добавляли антитела в различных концентрациях. Выявление осуществляли с антителом против Fc человека, связанным с пероксидазой. Колориметрию определяли при 450 нм с использованием субстрата ТМВ. А. Связывание PD-1 бифункциональной молекулой, содержащей анти-PD1 антитело и IL-7, мутированный по аминокислоте D74, Q22, M17, Q11, K81. В. Связывание PD-1 бифункциональной молекулой, содержащей IL-7, мутированный по аминокислоте W142. С. Связывание PD-1 бифункциональной молекулой, мутированной по дисульфидным

связям IL-7 (мутант SS1, SS2 и SS3). Все протестированные молекулы, как показано на этой фигуре, были сконструированы с изотипом IgG4m и линкером GGGGSGGGGSGGGGS между Fc и доменом IL-7.

Фиг. 2. Анализ ELISA связывания CD127 для IgG, слитого с мутированным IL-7. Рекомбинантный белок PD-1 иммобилизовали на планшете, затем бифункциональные анти-PD-1 IL-7 молекулы предварительно инкубировали с рекомбинантным белком CD127 (с гистидиновой меткой, Sino ref 10975-H08H) и добавляли в лунку. Выявление проводили с помощью смеси антигистидинового антитела, связанного с биотином + стрептавидин, связанный с пероксидазой. Колориметрию определяли при 450 нм с использованием субстрата ТМВ. А. Связывание CD127 бифункциональной молекулой, содержащей IL-7, мутированный по аминокислотам D74, Q22, M17, Q11, K81. В. Связывание CD127 бифункциональной молекулой, содержащей IL-7, мутированный по аминокислоте W142.

Фиг. 3. Сигнальный путь IL-7R различных бифункциональных молекул, измеренный по фосфорилированию STAT5. PBMC человека, выделенные из периферической крови здоровых добровольцев, инкубировали в течение 15 минут с анти-PD-1 IL-7 бифункциональными молекулами. Затем клетки фиксировали, пермеабелизовали и окрашивали меченным AF647 анти-pSTAT5 (клон 47/Stat5 (pY694)). Данные были получены путем расчета MFI pSTAT5 в CD3 T-клетках. А. Активация pSTAT5 анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулы, содержащей IL-7, мутированный по аминокислотам D74, Q22, M17, Q11, K81. В. Активация pSTAT5 анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулой, содержащей IL-7, мутированный по аминокислоте W142. С. Активация pSTAT5 анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулой, содержащей IL-7, мутированный в дисульфидных связях IL-7, SS2 (● черный) и SS3 (▲) по сравнению с анти-PD-1 IL-7 WT (● серый). Все протестированные молекулы, как показано на этой фигуре, были сконструированы с изотипом IgG4m и линкером GGGGSGGGGSGGGGS между Fc и доменом IL-7.

Фиг. 4. Фармакокинетика у мышей анти-PD-1 IL-7 бифункциональных молекул. Мышам внутривенно вводили одну дозу IgG, слитого с IL-7 дикого типа или мутированным IL-7. Концентрацию молекулы в сыворотке оценивали с помощью ELISA в несколько моментов времени после инъекции. А. Инъекция IgG4-G4S3 IL7 WT (■ серый); IgG4-G4S3 IL7 D74E (● черный) В. Инъекция IgG4-G4S3 IL7 WT (■ серый) или IgG4-G4S3 IL7 W142H (● черный) С. Инъекция IgG4-G4S3 IL7 WT (■ серый); IgG4-G4S3 IL7 SS2 (●) или IgG4-G4S3 IL7 SS3 (▲). D. Корреляция между площадью под кривой (AUC), рассчитанной по PK, и ED50 pSTAT5 (нМ) для каждой молекулы. Все протестированные

молекулы, как показано на этой фигуре, были сконструированы с изотипом IgG4m и линкером GGGGSGGGGSGGGGS между Fc и доменом IL-7.

Фиг. 5. Добавление дисульфидной связи между анти-PD-1 и IL-7 снижает активацию pSTAT5, в то же время увеличивая экспозицию лекарственного средства *in vivo*. А. Передача сигналов IL7R, измеренная по активации pSTAT5 на PBMC человека после обработки анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулой WT (серый ●) или анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулой с дополнительной дисульфидной связью (черный ●). В. Фармакокинетика у мышей анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулы WT (серый ●) или анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулы с дополнительной дисульфидной связью (черный ●). Мышам внутривенно вводили одну дозу анти-PD-1 IL-7 бифункциональных молекул. Концентрацию молекул в сыворотке оценивали с помощью ELISA в несколько моментов времени после инъекции. Все протестированные молекулы, как показано на этой фигуре, были сконструированы с изотипом IgG4m и линкером GGGGSGGGGSGGGGS между Fc и доменом IL-7.

Фиг. 6. Анализ ELISA на связывание PD-1. Имобилизовали человеческий рекомбинантный белок PD-1 (rPD1) и добавляли антитела в различных концентрациях. Выявление осуществляли с антителом против Fc человека, связанным с пероксидазой. Колориметрию определяли при 450 нм с использованием субстрата ТМВ. А. Связывание PD-1 анти-PD-1 IL-7 WT бифункциональной молекулой с IgG4m (● серый), анти-PD-1 IL-7 WT бифункциональной молекулой с IgG1m (▲ черный), анти-PD-1 IL-7 D74E бифункциональной молекулой с изотипом IgG1m (■) или анти-PD-1 IL-7 W142H бифункциональной молекулой с IgG1m (◇). В. В другом эксперименте тестировали связывание PD-1 анти-PD-1 IL-7 SS2 бифункциональной молекулой с изотипом IgG4m (■) или анти-PD-1 IL-7 SS2 бифункциональной молекулой с IgG1m (▲).

Фиг. 7. ELISA-анализ связывания CD127 анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулой, сконструированной с использованием изотипа IgG1N298A или IgG4. Рекомбинантный белок, на который нацелен каркас антитела, иммобилизовали, затем антитела, объединенные с IL-7, преинкубировали с рекомбинантным белком CD127 (с гистиридиновой меткой, Sino ref 10975-H08H). Выявление проводили с помощью смеси антигистиринового антитела, связанного с биотином и стрептавидина, связанного с пероксидазой. Колориметрию определяли при 450 нм с использованием субстрата ТМВ. А. Связывание CD127 анти-PD-1 IL-7 W142H бифункциональной молекулой с изотипом IgG4m (● серый), анти-PD-1 IL-7 W142H бифункциональной молекулой с IgG1m (▲ черный) или анти-PD-1 IL-7 WT бифункциональной молекулой с изотипом IgG1m (● черный). В. Связывание CD127 анти-PD-1 IL-7 SS2 бифункциональной молекулой с

изотипом IgG4m (● серый), анти-PD-1 IL-7 SS2 бифункциональной молекулой с IgG1m (▲ черный) или анти-PD-1 IL-7 WT бифункциональной молекулой с IgG1m (● черный). C. Связывание CD127 анти-PD-1 IL-7 SS3 бифункциональной молекулой с изотипом IgG4m (● серый), анти-PD-1 IL-7 SS3 бифункциональной молекулой с IgG1m (▲ черный) или анти-PD-1 IL-7 WT бифункциональной молекулой с IgG1m (● черный) D. Связывание CD127 анти-PD-1 W142H бифункциональной молекулой с изотипом IgG1m (● черный) или изотипом IgG1m + YTE (● серый). Также тестировали связывание CD127 анти-PD-1 D74E бифункциональной молекулой с изотипом IgG1m (▲ черный) или изотипом IgG1m + YTE (▲ серый). Все протестированные молекулы, как показано на этой фигуре, были сконструированы с линкером GGGGSGGGGSGGGGS между Fc и доменом IL-7.

Фиг. 8. Анализ передачи сигналов IL-7R анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулой, сконструированной с использованием изотипа IgG1N298A или IgG4. PBMC человека или PD1+ CD127+ клетки Jurkat инкубировали в течение 15 минут с анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулой. Затем клетки фиксировали, пермеабилizировали и окрашивали меченным AF647 анти-pSTAT5 (клон 47/Stat5 (pY694)). Данные были получены путем расчета % pSTAT5 в CD3 T-клетках. A. Передача сигнала pSTAT5 на PBMC человека после обработки анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулой, имеющей мутацию D74E с изотипом IgG4m (● серый) или изотипом IgG1m (▲ черный) B. Передача сигнала pSTAT5 на PBMC человека после обработки анти-PD-1 IL-7 SS2 с изотипом IgG4m (● серый) или анти-PD-1 IL-7 SS2 с IgG1m (▲ черный) C. Передача сигналов pSTAT5 на PBMC человека после обработки анти-PD-1 IL-7 SS3 с изотипом IgG4m (● серый) или IgG1m (▲ черный) D. (левая панель) Передача сигналов pSTAT5 на PD1+CD127+ клетках Jurkat после обработки анти-PD-1 IL-7 WT или анти-PD-1 IL7 SS2, сконструированных с помощью изотипа IgG4m (● серый) или IgG1m (▲ черный). D. (правая панель) Передача сигнала pSTAT5 после обработки анти-PD-1 IL-7 SS2 с изотипом IgG4m (● серый) или анти-PD-1 IL-7 SS2 с IgG1m (▲ черный).

Фиг. 9. Анти-PD-1 бифункциональные молекулы с мутированным IL-7 усиливают активацию T-клеток *in vitro*. Биоанализ Promega PD-1/PD-L1: (1) эффекторные T-клетки (Jurkat, стабильно экспрессирующие PD-1, NFAT-индуцированную люциферазу) и (2) активирующие клетки-мишени (клетки CHO K1, стабильно экспрессирующие PDL1 и поверхностный белок, предназначенные для активации когнатных TCR антигеннезависимым образом) культивировали совместно. После добавления люциферина BioGlo™ люминесценция оценивается количественно и отражает активацию T-клеток. Были протестированы серийные молярные концентрации анти-PD1 антитела +/- рекомбинантного IL-7 (rIL-7) или анти-PD1 IL-7 бифункциональных молекул. Каждая

точка представляет EC50 одного эксперимента А. Активация NFAT анти-PD-1 IL-7 WT бифункциональной молекулой с изотипом IgG4m (● серый) или анти-PD-1 (▲) или анти-PD-1 + rIL-7 (○). В. Активация NFAT анти-PD-1 IL-7 D74E IgG4m (●), PD-1 IL-7 D74E IgG1m (▲ пунктирная линия) и только анти-PD-1 (черный ▲) С. Активация NFAT анти-PD-1 IL-7 W142H бифункциональной молекулой с IgG4m (●), PD-1 IL-7 W142H бифункциональной молекулой с IgG1m (▲ пунктирная линия) и только анти-PD-1 (черный ▲) D. NFAT-активация анти-PD-1 IL-7 SS2 бифункциональной молекулой с IgG4m (●) и только анти-PD-1 (черный ▲)

Фиг. 10. Фармакокинетика анти-PD-1 IL-7 бифункциональных молекул, сконструированных с использованием изотипа IgG1m или IgG4m. Мышам внутривенно вводили одну дозу IgG, слитого с IL-7 дикого типа или с мутированным IL-7. Концентрацию лекарственного средства в сыворотке оценивали с помощью ELISA в несколько моментов времени после инъекции. А. Фармакокинетика анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулы дикого типа с IgG4m (● серая сплошная линия), анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулы дикого типа с IgG1m (● серая пунктирная линия), анти-PD-1 IL-7 D74E бифункциональной молекулы с IgG1m (▲ черная пунктирная линия), бифункциональной молекулы анти-PD-1 IL-7 W142H с IgG4m (○ черная сплошная линия), бифункциональной молекулы анти-PD-1 IL-7 W142H с IgG1m (● пунктирная черная сплошная линия), анти-PD-1 IL-7 SS3 с IgG4 (■ сплошная линия) и анти-PD-1 IL-7 SS3 с IgG1m (■ пунктирная линия). В. Фармакокинетика анти-PD-1 IL-7 D74E, D74Q, W142H, D74E+W142H мутантных бифункциональных молекул с IgG1m.

Фиг. 11. Фармакокинетика анти-PD-1 IL-7 бифункциональных молекул, сконструированных с использованием изотипа IgG1 N298A+K444A. Мышам внутривенно вводили одну дозу анти-PD-1 IL-7 D74E бифункциональной молекулы с изотипом IgG1N298A (■) или с мутантным изотипом IgG1m+ K444A (●). Концентрацию антитела оценивали с помощью ELISA в несколько моментов времени после инъекции.

Фиг. 12. Длина линкера не оказывает существенного влияния на фармакокинетику, но снижает стимуляцию передачи сигнала IL-7R. А. Фармакокинетика анти-PD-1 IL-7 WT бифункциональных молекул, сконструированных с использованием различных линкеров (GGGGS), (GGGGS)<sub>2</sub>, (GGGGS)<sub>3</sub>. В. Фармакокинетика анти-PD-1 IL-7 D74 бифункциональных молекул, сконструированных с использованием различных линкеров (GGGGS), (GGGGS)<sub>2</sub>, (GGGGS)<sub>3</sub>. С. Фармакокинетика анти-PD-1 IL-7 W142H бифункциональных молекул, сконструированных с использованием различных линкеров ((GGGGS)<sub>2</sub>, (GGGGS)<sub>3</sub>). Мышам внутривенно вводили одну дозу IgG, слитого с IL-7 дикого типа или с мутантным IL-7. Концентрацию IgG, слитого с IL-7, оценивали с

помощью ELISA в несколько моментов времени после инъекции. D. Передача сигнала pSTAT5 анти-PD-1 IL-7 бифункциональными молекулами, сконструированными без линкера или с линкерами GGGGS, (GGGGS)<sub>2</sub>, (GGGGS)<sub>3</sub>.

Фиг. 13. Анти-PD-1 бифункциональные молекулы с мутированным IL-7 предпочтительно нацелены на клетки PD-1<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> по сравнению с клетками PD-1<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup>.

Клетки Jurkat, экспрессирующие CD127<sup>+</sup> или совместно экспрессирующие CD127<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup>, окрашивали 45 нМ анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулой и выявляли с помощью анти-IgG-PE (Biolegend, клон HP6017). Данные представляют собой отношение медианной флуоресценции на PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> клетках Jurkat к медианной флуоресценции, полученной на PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> клетках Jurkat. В этом анализе были протестированы анти-PD-1 IL-7 WT бифункциональная молекула IgG1m, анти-PD-1 IL-7 D74E бифункциональная молекула IgG1m, анти-PD-1 IL-7 W142H бифункциональная молекула IgG1m, анти-PD-1 IL-7 SS2 бифункциональная молекула IgG4m и анти-PD-1 IL-7 SS3 бифункциональная молекула IgG1m.

Фиг. 14. Анти-PD-1 бифункциональные молекулы с мутированным IL-7 предпочтительно нацелены на PD-1<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> клетки по сравнению с PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> клетками в анализе совместного культивирования. А. Экспрессию CD127 человека и PD-1 человека анализировали с помощью проточной цитометрии на клетках CHO, трансдуцированных только рецепторами CD127 или одновременно рецепторами CD127 и PD-1. В. Связывание мутантов IL-7 против PD-1 на клетках CHO, экспрессирующих CD127<sup>+</sup> или коэкспрессирующих CD127<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup> в анализе совместного культивирования. Клетки окрашивали красителем для пролиферации клеток (CPDe450 или CPDe670), затем совместно культивировали в соотношении 1:1 перед инкубацией с различными концентрациями анти-PD-1 IL-7 бифункциональных молекул. Выявление осуществляли с помощью анти-IgG-PE (Biolegend, клон HP6017) и анализировали с помощью проточной цитометрии. EC<sub>50</sub> (нМ) связывания каждой конструкции с каждым типом клеток (CHO PD-1<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> (белая гистограмма) и CHO PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> (черная гистограмма)) рассчитывали и описывали. Гистограммы представляют среднее +/- стандартное отклонение 3 независимых экспериментов. В этом анализе протестировали молекулу нерелевантного mAb с IL-7 WT (изотипический контроль) IgG4m, анти-PD-1 IL-7 W142H бифункциональную молекулу IgG1m, анти-PD-1 IL-7 SS2 бифункциональную молекулу IgG4m, анти-PD-1 IL-7 SS3 бифункциональную молекулу IgG1m, которые содержат линкер GGGSGGGSGGGGS между Fc и доменом IL-7.

Фиг. 15. Анти-PD-1 бифункциональные молекулы с мутированным IL-7

предпочтительно активируют передачу сигналов pSTAT5 в PD-1+ CD127+ клетках по сравнению с PD-1-CD127+ клетками в анализе совместного культивирования. А. Анализ экспрессии CD127 человека, PD-1 человека и CD132 человека с помощью проточной цитометрии на клетках U937, трансдуцированных только рецепторами CD127 или рецепторами CD127 и PD-1 В. Активность pSTAT5 анти-PD-1 молекул, содержащих мутированный IL-7, в анализе совместного культивирования с клетками U937, экспрессирующими CD127+ или коэкспрессирующими CD127+ и PD-1+. Клетки окрашивали красителем пролиферации клеток (CPDe450 или CPDe670) и совместно культивировали в соотношении 1:1 перед инкубацией с различными концентрациями анти-PD-1 IL-7 бифункциональных молекул (15 мин 37°C). Затем клетки фиксировали, пермеабелизовали и окрашивали меченным AF647 анти-pSTAT5 (клон 47/Stat5 (pY694). EC50 активации pSTAT5 (нМ) рассчитывали для каждой конструкции и каждого типа клеток (CHO PD-1+ CD127+ (белая гистограмма) и CHO PD-1-CD127+ (черная гистограмма)). Гистограммы представляют среднее +/- стандартное отклонение 4 независимых экспериментов. В этом анализе протестировали rIL-7 (рекомбинантный человеческий цитокин IL-7), молекулу нерелевантного mAb IL7 WT (изотипический контроль) IgG4m, анти-PD-1 IL-7 D74E бифункциональную молекулу IgG1m, анти-PD-1 IL-7 W142H бифункциональную молекулу IgG1m, анти-PD-1 IL-7 SS2 бифункциональную молекулу IgG4m, анти-PD-1 IL-7 SS3 бифункциональную молекулу IgG1m, которые содержат линкер GGGGSGGGGSGGGGS между доменами Fc и IL-7.

Фиг. 16. Анти-PD-1 бифункциональные молекулы с мутированным IL-7 W142H предпочтительно активируют передачу сигналов pSTAT5 в PD-1+CD127+ Т-клетках человека и синергически усиливают пролиферацию истощенных PD-1+CD127+ Т-клеток человека. PBMC человека стимулировали на покрытии CD3/CD28 (3 мкг/мл ОК3 и CD28.2 антител) для индукции экспрессии PD-1, затем активность и пролиферацию pSTAT5 оценивали с помощью анти-PD-1 IL-7 W142H бифункциональных молекул IgG1m А. Левый график. Репрезентативная экспрессия CD127 человека, PD-1 человека на активированных Т-клетках человека (популяция CD3+), проанализированная с помощью проточной цитометрии; А. Правый график. Активированные Т-клетки человека предварительно инкубировали с изотипическим контролем или анти-PD-1 конкурентным антителом (200 мкг/мл) до инкубации с рекомбинантным IL-7 или с анти-PD-1 молекулами, содержащими мутированный IL-7 W142H. Передачу сигнала IL-7R, pSTAT5, количественно определяли с помощью проточной цитометрии после фиксации и окрашивания меченным AF647 анти-pSTAT5 (клон 47/Stat5 (pY694). Активацию pSTAT5 (EC50) рассчитывали в условиях с изотипическим контролем и в условиях с анти-PD-1

конкурентным антителом. Данные представляют собой кратное изменение разницы между этими двумя состояниями;  $n = 5$  разных доноров, протестированных в независимых экспериментах В. Пролиферация истощенных PD-1+ Т-клеток человека с изотипическим контролем, анти-PD-1 + изотипический IL7 W142H IgG1m или анти-PD-1 IL-7 W142H бифункциональной молекулой IgG1m (3 нМ). Пролиферацию измеряли на 5-й день после повторной стимуляции на планшете, покрытым рекомбинантным белком  $\alpha$ CD3/PD-L1. Пролиферацию количественно определяли с помощью проточной цитометрии с использованием анализа click-it EDU (геометрическое среднее и процент click-it EDU + клетки);  $n = 4$  независимых донора Т-клеток тестировали в независимых экспериментах. Все протестированные конструкции содержат линкер GGGGSGGGGSGGGGS между доменами Fc и IL-7.

Фиг. 17. Схематическое изображение различных молекул, использованных в примерах 8 и 9.

Фиг. 18. Анти-PD-1 биспецифические молекулы, содержащие мутированный IL-7 W142H, демонстрируют высокую эффективность связывания с PD-1 и противодействуют связыванию PDL1. А. Анализ ELISA на связывание PD-1. Иммуобилизовали человеческий рекомбинантный белок PD-1 (rPD1) и добавляли антитела в различных концентрациях. Выявление осуществляли с антителом против Fc человека, связанным с пероксидазой. Колориметрию определяли при 450 нм с использованием субстрата ТМВ. Анти-PD-1 с 1 плечом (анти-PD-1\*1 ▲ серый) или анти-PD-1 с 2 плечами (анти-PD-1\*2♦) тестировали в качестве контроля. Также тестировали бифункциональные молекулы, содержащие вариант IL7 (анти-PD-1\*2 IL7 W142H\*2 ● черный), (анти PD-1\*2 IL7 W142H\*1 ■ черный), (анти PD-1\*1 IL7 W142H\*2 ● серый), (анти-PD-1\*1 IL7 W142H\*1 ▼ серый). В. Антагонистическая способность блокировать PD-1/PD-L1, измеренная с помощью ELISA. Иммуобилизовали PD-L1 и добавляли комплекс антитела + биотинилированный рекомбинантный PD-1 человека. Этот комплекс был создан с фиксированной концентрацией PD1 (0,6 мкг/мл) и различными концентрациями анти-PD1\*2 IL7 W142H\*1 (■ сплошная линия), анти-PD1\*2 IL7 W142H\*2 (пунктирная линия), анти-PD1\*2 IL7 W142H\*2 (о штриховая линия). PD-1\*1 (серый ▲ пунктирная серая линия), анти-PD1\*1 IL7 W142H\*2 (серая ● сплошная серая линия) или анти-PD1\*1 IL7 W142H\*1 (серый ▼ сплошная серая линия). Все протестированные конструкции содержат линкер GGGGSGGGGSGGGGS между доменами Fc и IL-7.

Фиг. 19. Молекулы анти-PD-1 IL7 W142H, сконструированные с одной или двумя валентностями анти-PD-1 и одним вариантом цитокина IL-7 W142H, активируют pSTAT5 с высокой эффективностью. А. Связывание PD-1/CD127 с анти-PD-1 IL-7 W142H

бифункциональными молекулами. Рекомбинантный белок PD-1 иммобилизовали, затем добавляли различные концентрации бифункциональных молекул и фиксированное количество рекомбинантного белка CD127 (с гистиридиновой меткой, Sino ref 10975-H08H). Выявление проводили с помощью смеси антигистиридинового антитела, связанного с биотином, и стрептавидина, связанного с пероксидазой. Колориметрию определяли при 450 нм с использованием субстрата ТМВ. Были протестированы анти-PD1\*2 IL7 W142H1\*1 (■) или анти-PD1\*2 IL7 W142H\*2 (● серый). В. Анализ передачи сигнала pSTAT5 с анти-PD-1\*2 каркасом, слитым с IL-7 W142\*1 цитокином. PBMC человека, выделенные из периферической крови здоровых добровольцев, инкубировали в течение 15 минут с анти-PD1\*2 IL7 WT\*2 (▼) или анти-PD1\*2 IL7 W142H\*1 (■ пунктирная линия). Затем клетки фиксировали, пермеабилizировали и окрашивали анти-CD3-BV421 и анти-pSTAT5 AF647 (клон 47/Stat5 (pY694)). Данные были получены путем расчета MFI% pSTAT5+ клеток в популяции CD3+. С. Анализ передачи сигнала pSTAT5 после обработки анти-PD-1\*1 IL7 W142H\*1 (●), анти-PD-1\*2 IL7WT\*2 (■) или анти-PD1\*2 IL7 W142H\*1 (▲). Все протестированные конструкции W142H содержат IgG1m и линкер GGGGSGGGGSGGGGS между Fc и доменом IL-7.

Фиг. 20. Анти-PD-1 IL7 молекулы, сконструированные с одной или двумя валентностями, значительно способствуют пролиферации Т-клеток *in vivo*. Мышам внутрибрюшинно вводили одну дозу (34 нМ/кг) молекул анти-PD-1 IL-7 W142H (анти-PD-1\*2 IL7 W142H\*1, анти-PD-1\*1 IL7 W142H\*1, анти-PD-1 \*1 IL7 W142H\*2), или изотипический контроль. На 4-й день собирали кровь и Т-клетки окрашивали анти-CD3, анти-CD8, анти-CD4 и маркером пролиферации ki67. Процент KI67 определяли количественно в популяциях CD3 CD4+ и CD3 CD8+. Статистическую значимость (\* $p < 0,05$ ) рассчитывали с помощью одностороннего теста ANOVA для множественных сравнений с контрольными мышами,  $n=2$  по 8 мышей на группу из 2 независимых экспериментов.

Фиг. 21. Анти-PD-1\*2 IL7\*1, Анти-PD-1\*1 IL7\*1, Анти-PD-1\*1 IL7\*2 синергически активируют передачу сигналов TCR. Биоанализ Promega PD-1/PD-L1: (1) Эффекторные Т-клетки (Jurkat, стабильно экспрессирующие PD-1, NFAT-индуцированную люциферазу) и (2) активирующие клетки-мишени (клетки CHO K1, стабильно экспрессирующие PDL1 и поверхностный белок, предназначенные для активации когнатных TCR антигеннезависимым образом) культивировали совместно. После добавления люциферина BioGlo™ люминесценция оценивается количественно и отражает активацию Т-клеток. А. Анти-PD1\*2 (● черный), анти-PD-1\*2 IL7 W142H\*1 (○ белый) добавляли в последовательных концентрациях. Изотипическое антитело использовали в качестве

отрицательного контроля активации (■) В. Комбинация анти-PD1\*1 + изотипический контроль IL7 W142H\*2 (○ белая пунктирная линия), анти-PD-1\*1 IL7 W142H \*2 (● серый), анти- PD-1\*1 IL7 W142H\*1 (○ серый) добавляли в последовательных концентрациях. Все протестированные конструкции W142H содержат линкер IgG1m и GGGGSGGGGSGGGGS между доменами Fc и IL-7.

Фиг. 22. Мутированные анти-PD-1\*2 IL7\*1, анти-PD-1\*1 IL7\*1, анти-PD-1\*1 IL7\*2 W142H предпочтительно связывают и активируют передачу сигнала pSTAT5 в PD-1+ CD127+ клетках по сравнению с PD-1-CD127+ клетками. Клетки U937, экспрессирующие CD127+ или коэкспрессирующие клетки CD127+ и PD-1+, окрашивали красителем для пролиферации клеток (CPDe450 или CPDe670) и совместно культивировали в соотношении 1:1 перед инкубацией с различными концентрациями анти-PD-1 IL-7 бифункциональных молекул. Окрашивание анти-IgG человека PE и pSTAT5 количественно определяли после инкубации с помощью проточной цитометрии. А. Связывание EC50 (нМ) рассчитывали для каждого типа клеток и каждой конструкции. В. EC50 pSTAT5 (нМ) рассчитывали для каждого типа клеток и каждой конструкции. После обработки бифункциональными молекулами клетки затем фиксировали, пермеабелизовали и окрашивали меченным AF647 анти-pSTAT5 (клон 47/Stat5 (pY694)). Активация pSTAT5. EC50 (нМ) рассчитывали для каждой конструкции и каждого типа клеток U937 PD-1+ CD127+ (белая гистограмма) и U937 PD-1-CD127+ (черная гистограмма). n=2 независимых эксперимента. В этом анализе тестировали анти-PD-1\*2 IL7 W142\*1, анти-PD-1\*1 IL7 W142\*1 и анти-PD-1\*1 IL7 W142\*2, которые содержат изотип IgG1m и линкер GGGGSGGGGSGGGGS между доменами Fc и IL-7.

Фиг. 23. Фармакокинетика анти-PD-1\*2 IL7\*1, анти-PD-1\*1 IL7\*1, анти-PD-1\*1 IL7\*2 W142H мутированных молекул после внутрибрюшинной инъекции. Мышам с гуманизированным PD1 внутрибрюшинно вводили одну дозу (34 нМ/кг) анти-PD-1\*2 IL7 IL7\*2 IgG4m (Δ), анти-PD-1\*2 IL7 W142H\*1 IgG1m (▼), анти-PD-1 \*1 IL7 W142H\*1 IgG1m (● серый) или анти-PD-1\*1 IL7 W142H\*2 IgG1m (○ серый). Концентрацию лекарственных средств в сыворотке оценивали с помощью ELISA после инъекции до 48 часов.

Подробное описание изобретения

Введение

Молекулы по изобретению являются бифункциональными, поскольку они сочетают в себе специфический эффект варианта интерлейкина 7 человека, связанный с нацеливанием на специфическую мишень, экспрессируемую на иммунных клетках.

Как известно специалистам в данной области, опухолевые клетки не могут быть

элиминированы Т-клетками в достаточной степени из-за явления, называемого истощением Т-клеток, наблюдаемого при многих видах онкологических заболеваний. Как описано, например, Jiang, Y., Li, Y. и Zhu, B (Cell Death Dis 6, e1792 (2015)), истощение Т-клеток в микроокружении опухоли может привести к сверхэкспрессии ингибирующих рецепторов, снижению продуцирования эффекторных цитокинов и цитолитической активности, приводящих к неспособности элиминации злокачественной опухоли и, как правило, к ускользанию злокачественной опухоли от механизмов иммунологического надзора. Восстановление истощенных Т-клеток является клинической стратегией, предусмотренной для лечения онкологических заболеваний.

В данной области техники известны многочисленные факторы истощения, такие как белок 1 запрограммированной гибели клеток (PD1), белок 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4), белок Т-клеточной мембраны-3 (TIM3) и белок 3 гена активации лимфоцитов (LAG3), экспрессируемые на поверхности иммунных клеток, в частности Т-клеток. Иммуносупрессивная среда прежде всего индуцируется взаимодействием таких молекул и их аналогов, экспрессируемых на поверхности опухолевых клеток. В частности, PD-1 является одним из основных ингибирующих рецепторов, регулирующих истощение Т-клеток. Действительно, Т-клетки с высокой экспрессией PD-1 обладают пониженной способностью уничтожать злокачественные опухолевые клетки. Анти-PD1 терапевтические соединения, особенно анти-PD1 антитела, используются в клинической практике при лечении онкологических заболеваний для блокирования ингибирующего эффекта взаимодействия PD1-PDL1 (PD1 на Т-клетках и PDL1 на опухолевых клетках) и истощения Т-клеток. Однако анти-PD1 антитела не всегда достаточно эффективны, чтобы обеспечить «повторную» активацию истощенных Т-клеток.

Авторы изобретения продемонстрировали, что бифункциональная молекула, содержащая вариант IL-7 по настоящему изобретению и связывающий фрагмент, блокирующий иммуносупрессивное взаимодействие (ингибитор контрольной точки), неожиданно синергически активировать путь NFAT, основной путь, необходимый для активации Т-клеток. Действительно, наблюдалась синергетическая активация Т-клеток посредством передачи сигналов TCR. В частности, было показано, что бифункциональные анти-PD-1 молекулы, содержащие вариант IL-7, приводят к лучшей активации Т-клеток, в частности истощенных Т-клеток, по сравнению с анти-PD-1 молекулами самими по себе.

Авторы изобретения впервые показали, что взаимодействие бифункциональных молекул с i) фактором истощения, экспрессируемым на поверхности Т-клеток, таким как PD1, CTLA-4, BTLA, TIGIT, LAG3 и TIM3 (для связывающей части) и ii) рецептором IL-7

(для варианта IL-7) на той же самой Т-клетке приводит к этой неожиданной активации пути NFAT (передача сигналов TCR) с положительным эффектом активации Т-клеток и, в частности, истощенных Т-клеток, которые в противном случае не были бы способны уничтожать опухолевые клетки). Этот эффект никогда ранее не раскрывался.

Кроме того, применение бифункциональных молекул, содержащих вариант IL-7, важно для увеличения фармакокинетики *in vivo*. Кроме того, при уменьшении аффинности варианта IL-7 к своему рецептору, увеличивается способность бифункциональных молекул предпочтительно связываться с иммунными клетками-мишенями и оказывать специфическое действие на эти клетки по сравнению с другими клетками, а также использовать преимущество синергетического эффекта, ассоциированного с действием двух частей бифункциональной молекулы на одни и те же иммунные клетки. В частности, считается, что бифункциональные молекулы, содержащие вариант IL-7 и связывающий фрагмент, нацеленный на фактор истощения, будут способствовать накоплению IL-7 в инфильтратах Т-клеток и повторной локализации IL-7 на Т-клетках. Это накопление IL-7 рядом с указанными Т-клетками представляет особый интерес в контексте истощенных Т-клеток, которым требуется высокая доза IL-7 для активации или повторной активации.

Неожиданно авторы изобретения обнаружили, что бифункциональные молекулы, содержащие константный домен тяжелой цепи IgG1, обладают улучшенной активностью вариантов IL-7 (сигнал pStat5, синергический эффект и связывание CD127) по сравнению с той же молекулой с константным доменом тяжелой цепи IgG4. Это улучшение характерно для мутированного IL-7 и не наблюдалось для IL-7 дикого типа. Кроме того, использование линкера (GGGGS)<sub>3</sub> между антителом и IL-7 максимизирует активность вариантов IL-7 (сигнал pStat5 и связывание с CD127).

Бифункциональные молекулы по изобретению обладают, в частности, одним или несколькими из следующих преимуществ:

- Бифункциональные молекулы обеспечивают специфическую локализацию варианта IL-7 рядом с иммунными клетками, такими как Т-клетки или PD-1<sup>+</sup> клетки, в частности, в опухоли, нацеливаясь на клетки, которым требуется более высокая концентрация IL-7.

- Мутация в вариантах IL-7 снижает аффинность вариантов IL-7 к IL-7R без полной или значительной потери его собственной биологической активности по сравнению с IL-7 дикого типа.

- Мутация в вариантах IL-7 улучшает фармакокинетику и фармакодинамику *in vivo*, особенно по сравнению с бифункциональной молекулой, содержащей IL-7 дикого

типа. Более конкретно, улучшение фармакокинетики и фармакодинамики молекулы позволяет бифункциональной молекуле достигать клеток-мишеней и воздействовать на мишень, экспрессированную на поверхности иммунных клеток.

- Бифункциональные молекулы по изобретению проявляют синергетическую активность мутированного IL-7 (передача сигналов NFAT).

- Бифункциональные молекулы по изобретению обладают более высокой селективной активностью в отношении PD-1(+) клеток, чем PD-1(-) клеток, по сравнению с антителами, содержащими IL-7 дикого типа.

- Бифункциональные молекулы, содержащие мутированную молекулу IL-7 W142H, селективно и синергически цис-активируют PD-1(+) CD127(+) истощенные Т-клетки.

- Варианты IL-7 могут быть включены в несколько структур бифункциональных молекул, содержащих одну или две молекулы IL-7 и один или два антигенсвязывающих фрагмента, сохраняя при этом способность связывать свою мишень (например, PD-1) и активировать путь IL-7R. В частности, бифункциональные молекулы, содержащие 1 или 2 варианта IL-7 W142H, имеют хороший фармакокинетический профиль *in vivo*.

- Авторы изобретения неожиданно продемонстрировали улучшенные свойства конструкции, содержащей один вариант IL-7, по сравнению с конструкциями, содержащими два варианта IL-7, как с точки зрения активности, так и фармакокинетики.

#### Определения

Для более легкого понимания настоящего изобретения некоторые термины определены ниже. Дополнительные определения приведены в подробном описании.

Если не указано иное, все термины из области техники, обозначения и другая научная терминология, используемые в данном документе, имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области техники, к которой относится это изобретение. В некоторых случаях термины с общепринятыми значениями определены в данном описании для ясности и/или для ознакомления со ссылками, и включение таких определений в настоящее описание не обязательно должно толковаться как представляющее различие по сравнению с тем, что обычно понимается в данной области техники. Способы и процедуры, раскрытые или упомянутые в настоящем описании, в целом хорошо понятны и обычно применяются специалистами в данной области с использованием обычных методологий.

Используемые в данном документе термины «интерлейкин-7 дикого типа», «IL-7 дикого типа» и «IL7 дикого типа» относятся к эндогенному секреторному гликопротеину млекопитающих, в частности к полипептидам IL-7, его производным и аналогам, имеющим существенную идентичность по аминокислотной последовательности с

функциональным IL-7 млекопитающих дикого типа и по существу эквивалентную биологическую активность, например, в стандартных биологических анализах или анализах аффинности связывания с рецептором IL-7. Например, IL-7 дикого типа относится к аминокислотной последовательности рекомбинантного или нереккомбинантного полипептида, имеющего аминокислотную последовательность: i) нативного или встречающегося в природе полипептида IL-7, ii) биологически активного фрагмента полипептида IL-7, iii) биологически активного полипептидного аналога полипептида IL-7 или iv) биологически активного полипептида IL-7. IL-7 может содержать свой пептидный сигнал или не иметь его. Альтернативными обозначениями этой молекулы являются «фактор роста пре-B-клеток» и «лимфопоэтин-1». Предпочтительно термин «IL-7 дикого типа» относится к IL-7 человека (IL-7 дикого типа). Например, аминокислотная последовательность IL-7 человека дикого типа состоит из около 152 аминокислот (в отсутствие сигнального пептида) и имеет номер доступа Genbank NP\_000871.1, причем ген расположен на хромосоме 8q12-13. Человеческий IL-7, например, описан в UniProtKB-P13232.

Используемый в настоящем описании термин «антитело» относится к типу молекулы иммуноглобулина и используется в самом широком смысле. В частности, антитела представляют собой иммуноглобулиновые молекулы и иммунологически активные фрагменты иммуноглобулиновых молекул, то есть структуры, которые содержат антигенсвязывающий участок. Иммуноглобулиновые молекулы могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно. Если специально не указано иное, термин «антитело» включает интактные иммуноглобулины и «фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» (такой как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), одноцепочечный (scFv), их мутанты, молекулы, содержащие часть антитела, диатела, линейные антитела, одноцепочечные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая включает сайт распознавания антигена с требуемой специфичностью, включая варианты с различным гликозилированием и варианты с различными аминокислотными последовательностями. Предпочтительно термин «антитело» относится к гуманизованному антителу.

Используемый в данном описании термин «тяжелая цепь антитела» относится к большей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в конформациях антитела. CDRs тяжелой цепи антитела обычно обозначают как «HCDR1», «HCDR2» и

«HCDR3». Каркасные области тяжелой цепи антитела обычно обозначают как «HFR1», «HFR2», «HFR3» и «HFR4».

Используемый в данном описании термин «легкая цепь антитела» относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в конформациях антитела; легкие цепи  $\kappa$  и  $\lambda$  относятся к двум основным изотипам легкой цепи антитела. CDRs легкой цепи антитела обычно обозначают как «LCDR1», «LCDR2» и «LCDR3». Каркасные области легкой цепи антитела обычно обозначают как «LFR1», «LFR2», «LFR3» и «LFR4».

Используемый в данном описании термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела означает часть антитела, то есть молекулу, соответствующую части структуры антитела по изобретению, которая обладает антигенсвязывающей способностью в отношении определенного антигена, возможно в нативном виде; такой фрагмент, по существу, проявляет такую же или по существу такую же антигенсвязывающую специфичность для указанного антигена по сравнению с антигенсвязывающей специфичностью соответствующего четырехцепочечного антитела. Преимущественно антигенсвязывающие фрагменты обладают аффинностью связывания, аналогичной аффинности соответствующих 4-цепочечных антител. Однако антигенсвязывающий фрагмент, который имеет пониженную антигенсвязывающую аффинность по отношению к соответствующим 4-цепочечным антителам, также охватывается настоящим изобретением. Способность связывания антигена может быть определена путем измерения аффинности между антителом и фрагментом мишени. Эти антигенсвязывающие фрагменты также могут быть обозначены как «функциональные фрагменты» антител. Антигенсвязывающие фрагменты антител представляют собой фрагменты, которые содержат свои гипервариабельные домены, обозначенные как CDRs (области, определяющие комплементарность), или их часть(и).

Используемый в данном описании термин «гуманизованное антитело» предназначен для обозначения антител, в которых последовательности CDRs, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на каркасные последовательности антитела человека (например, химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из нечеловеческого антитела). «Гуманизованная форма» антитела, например, нечеловеческого антитела, также относится к антителу, которое подверглось гуманизации. Гуманизованное антитело обычно представляет собой иммуноглобулин человека (реципиентное антитело), в котором остатки из одной или нескольких CDRs заменены остатками по меньшей мере из одной CDR нечеловеческого антитела (донорного антитела) при сохранении желаемой

специфичности, аффинности и функциональной активности исходного антитела. Дополнительные модификации каркасной области могут быть сделаны в человеческих каркасных последовательностях. Предпочтительно гуманизованное антитело имеет балл гуманизованности T20 более 80%, 85% или 90%. Например, «гуманизованность» антитела может быть измерена с использованием анализатора балла T20 для количественной оценки гуманизованности вариабельной области антител, как описано в Gao S H, Huang K, Tu H, Adler A S. BMC Biotechnology. 2013: 13:55 или с помощью веб-инструмента для расчета балла T20 для последовательностей антител с использованием баз данных T20 Cutoff Human: <http://abAnalyzer.lakepharma.com>.

Под «химерным антителом» понимают антитело, полученное путем объединения генетического материала из источника, не являющегося человеком, предпочтительно такого, как мышь, с генетическим материалом человека. Такое антитело происходит как из человеческих, так и из нечеловеческих антител, связанных химерным участком. Химерные антитела обычно содержат константные домены человека и вариабельные домены другого вида млекопитающих, что снижает риск реакции на чужеродные антитела животного, отличного от человека, при их использовании в терапевтических целях.

Используемые в данном описании термины «область кристаллизующегося фрагмента», «Fc-область» или «Fc-домен» являются взаимозаменяемыми и относятся к хвостовой области антитела, которая взаимодействует с рецепторами клеточной поверхности, называемыми Fc-рецепторами. Fc-область или домен обычно состоит из двух идентичных доменов, происходящих из второго и третьего константных доменов двух тяжелых цепей антитела (т.е. доменов CH2 и CH3). Часть Fc-домена относится к домену CH2 или CH3. Необязательно Fc-область или домен могут необязательно включать всю или часть шарнирной области между CH1 и CH2. Необязательно Fc-домен представляет собой домен из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, необязательно с шарниром IgG1-CH2-CH3 и шарниром IgG4-CH2-CH3.

В контексте антител IgG каждый изотип IgG имеет три области CH., соответственно, домены «CH» в контексте IgG являются следующими: «CH1» относится к положениям 118-215 согласно индексу EU по Kabat. «Шарнир» относится к положениям 216-230 согласно индексу EU по Kabat. «CH2» относится к положениям 231-340 согласно индексу EU по Kabat, а «CH3» относится к положениям 341-447 согласно индексу EU по Kabat.

Под «заменой аминокислоты» или «модификацией аминокислоты» в данном описании подразумевается изменение аминокислотной последовательности полипептида. «Аминокислотные модификации» включают замену, вставку и/или делецию в

полипептидной последовательности. Под «заменой аминокислоты» или «заменой» в данном описании подразумевается замена аминокислоты в конкретном положении в последовательности исходного полипептида другой аминокислотой. Под «вставкой аминокислоты» или «вставкой» подразумевается добавление аминокислоты в определенном положении в исходной полипептидной последовательности. Под «делецией аминокислоты» или «делецией» подразумевается удаление аминокислоты в конкретном положении в последовательности исходного полипептида. Аминокислотные замены могут быть консервативными. Консервативная замена представляет собой замену данного аминокислотного остатка другим остатком, имеющим боковую цепь («R-группу») с аналогичными химическими свойствами (например, заряд, объем и/или гидрофобность). При использовании в данном описании понятия «положение аминокислоты» или «номер положения аминокислоты» используются взаимозаменяемо и относятся к положению конкретной аминокислоты в аминокислотной последовательности, обычно определяемой однобуквенными кодами для аминокислот. Первую аминокислоту в аминокислотной последовательности (т.е. начиная с N-конца) следует рассматривать как имеющую положение 1.

Консервативная замена представляет собой замену данного аминокислотного остатка другим остатком, имеющим боковую цепь («R-группу») с аналогичными химическими свойствами (например, заряд, объем и/или гидрофобность). В целом, консервативная аминокислотная замена, по существу, не изменит функциональных свойств белка. Консервативные замены и соответствующие правила их осуществления хорошо описаны в современном уровне техники. Например, консервативные замены могут быть определены заменами внутри групп аминокислот, отраженными в следующих таблицах:

Таблица А. Аминокислотный остаток

Аминокислотные группы	Аминокислотные остатки
Кислые остатки	ASP и GLU
Основные остатки	LYS, ARG и HIS
Гидрофильные незаряженные остатки	SER, THR, ASN и GLN
Алифатические незаряженные остатки	GLY, ALA, VAL, LEU и ILE
Неполярные незаряженные остатки	CYS, MET и PRO
Ароматические остатки	PHE, TYR и TRP

Таблица В. Альтернативные консервативные группы замен аминокислотных остатков

1	Аланин (A)	Серин (S)	Треонин (T)
2	Аспарагиновая кислота (D)	Глутаминовая кислота (E)	
3	Аспарагин (N)	Глутамин (Q)	
4	Аргинин (R)	Лизин (K)	

5	Изолейцин (I)	Лейцин (L)	Метионин (M)
6	Фенилаланин (F)	Тирозин (Y)	Триптофан (W)

Таблица С. Дополнительные альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков

Остатки, содержащие спиртовую группу	S и T
Алифатические остатки	I, L, V, и M
Циклоалкенил-ассоциированные остатки	F, H, W, и Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, и Y
Отрицательно заряженные остатки	D и E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, и T
Маленькие остатки	A, C, D, G, N, P, S, T, и V
Очень маленькие остатки	A, G, и S
Остатки, вовлеченные в образование поворота	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, и T
Гибкие остатки	E, Q, T, K, S, G, P, D, E и R

Используемый в данном описании термин «идентичность последовательностей» между двумя последовательностями описывается параметром «идентичность последовательностей», «сходство последовательностей» или «гомология последовательностей». Для целей настоящего изобретения «процентная идентичность» между двумя последовательностями (A) и (B) определяется путем сравнения двух последовательностей, выровненных оптимальным образом, через окно сравнения. Указанное выравнивание последовательностей можно проводить известными в данной области способами, например, с использованием алгоритма глобального выравнивания Needleman-Wunsch. Пакет программного обеспечения для анализа белков подразумевает нахождение близких последовательностей с использованием инструментов сходства, которые оценивают различные замены, делеции и другие модификации, включающие консервативные аминокислотные замены. После осуществления полного выравнивания можно получить процент идентичности путем деления общего числа выровненных идентичных аминокислотных остатков, на общее количество остатков, содержащихся в самой длинной, из последовательностей (A) и (B), последовательности. Идентичность последовательностей обычно определяют с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Для сравнения двух аминокислотных последовательностей можно использовать, например, инструмент «Emboss needle» для попарного выравнивания последовательностей белков, предоставляемый EMBL-EBI и доступный по адресу:

[www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=emboss\\_needle&context=protein](http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=emboss_needle&context=protein), например, с использованием настроек по умолчанию: (i) Матрица: BLOSUM62, (ii) Штраф за открытие разрыва: 10, (iii) штраф за продолжение разрыва: 0,5, (iv) формат вывода: пара, (v) концевой штраф за внесение разрыва: ложь, (vi) концевой штраф за открытие разрыва: 10, (vii) концевой штраф за продолжение разрыва: 0,5.

В качестве альтернативы, идентичность последовательностей также может быть

обычно определена с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей Clustal Omega с использованием алгоритма HAlign и его настроек по умолчанию в качестве основного механизма выравнивания. Алгоритм описан в Söding, J. (2005) 'Protein homology detection by HMM–HMM comparison'. *Bioinformatics* 21, 951-960, с настройками по умолчанию.

Термины «происходить из» и «происходящий из», используемые в данном описании, относятся к соединению, имеющему структуру, полученную из структуры исходного соединения или белка, и чья структура достаточно похожа на те, что раскрыты в настоящем описании, и, исходя из этого сходства, специалист в данной области может ожидать проявления тех же или подобных свойств, активности и полезности, что и заявленные соединения.

Используемый в данном описании термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату, содержащему один или нескольких активных агентов, таких, как бифункциональная молекула, согласно изобретению, а также необязательно другие химические компоненты, такие как физиологически подходящие носители и эксципиенты.

Назначение фармацевтической композиции - облегчить введение активного агента в организм. Композиции по настоящему изобретению могут быть в форме, подходящей для любого обычного пути введения или применения. В одном воплощении «композиция» обычно подразумевает комбинацию активного агента, например, соединения или композиции, и встречающегося в природе или неприродного носителя, инертного (например, детектируемого агента или метки) или активного, такого как адъювант, разбавитель, связующее, стабилизатор, буфер, соли, липофильные растворители, консервант, адъювант и т.п., и включает фармацевтически приемлемые носители. «Приемлемый переносчик» или «приемлемый носитель», при упоминании в данном описании, представляет собой любое известное соединение или комбинацию соединений, которые известны специалистам в данной области как полезные при составлении фармацевтических композиций.

«Эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» в контексте настоящего изобретения относится к количеству активного агента, необходимому для оказания у субъекта терапевтического эффекта, либо отдельно, либо в комбинации с одним или несколькими другими активными агентами, например, количество активного агента, которое необходимо для лечения целевого заболевания или расстройства или для достижения желаемого эффекта. «Эффективное количество» будет варьировать в зависимости от агента(ов), заболевания и его тяжести, характеристик субъекта, подлежащего лечению, включая возраст, физическое состояние, размер, пол и

массу, продолжительность лечения, характер сопутствующей терапии (если таковая имеется), конкретный путь введения и подобные факторы в пределах знаний и опыта практикующего врача. Эти факторы хорошо известны рядовым специалистам в данной области техники, и их можно привести в соответствие с помощью обычных экспериментов. Обычно предпочтительно использовать максимальную дозу отдельных компонентов или их комбинаций, то есть наивысшую безопасную дозу в соответствии со здравым медицинским заключением.

Используемый в данном описании термин «лекарственное средство» (медикамент) относится к любому веществу или композиции с лечебными или профилактическими свойствами против расстройств или заболеваний.

Термин «лечение» относится к любому действию, направленному на улучшение состояния здоровья пациентов, такому как терапия, предотвращение, профилактика и замедление заболевания или симптомов заболевания. Термин обозначает как лечебное, так и/или профилактическое лечение заболевания. Лечебное воздействие определяется как лечение, приводящее к излечению от заболевания или воздействию, облегчающему, улучшающему и/или устраняющему, уменьшающему и/или стабилизирующему заболевание или симптомы заболевания или страдания, которые вызваны заболеванием, прямо или косвенно. Профилактическое лечение включает как лечение, приводящее к предотвращению заболевания, так и лечение, снижающее и/или замедляющее прогрессирование и/или частоту заболевания или риск его возникновения. В некоторых воплощениях такой термин относится к улучшению или устранению заболевания, расстройства, инфекции или симптомов, связанных с ними. В других воплощениях этот термин относится к минимизации распространения или обострения онкологических заболеваний. Лечение, согласно настоящему изобретению, не обязательно подразумевает 100% или полное лечение. Скорее, существуют различные степени лечения, которые обычный специалист в данной области признает имеющими потенциальную пользу или терапевтический эффект. Предпочтительно термин «лечение» относится к применению или введению композиции, включающей один или несколько активных агентов, субъекту, страдающему расстройством/заболеванием.

В контексте настоящего описания термины «расстройство» или «заболевание» относятся к неправильно функционирующему органу, части, структуре или системе организма в результате воздействия генетических ошибок или ошибок развития, инфекции, ядов, дефицита или дисбаланса питания, токсичности, или неблагоприятных факторов окружающей среды. Предпочтительно эти термины относятся к расстройству здоровья или заболеванию, например, болезни, которая нарушает нормальные физические

или умственные функции. Более предпочтительно, термин «расстройство» относится к иммунным и/или воспалительным заболеваниям, которые поражают животных и/или людей, таким как онкологическое заболевание.

Используемый в данном описании термин «иммунные клетки» относится к клеткам, участвующим во врожденном и адаптивном иммунитете, например, таким как белые кровяные клетки (лейкоциты), которые происходят из гемопоэтических стволовых клеток (HSC), продуцируемых в костном мозге; лимфоциты (Т-клетки, В-клетки, естественные киллеры (NK) и естественные киллерные Т-клетки (NKT)) и клетки миелоидного происхождения (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки). В частности, иммунная клетка может быть выбрана из неполного списка, включающего В-клетки, Т-клетки, в частности CD4<sup>+</sup> Т-клетки и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, NK-клетки, NKT-клетки, APC-клетки, дендритные клетки и моноциты. Используемый в данном описании термин «Т-клетка» включает, например, CD4<sup>+</sup> Т-клетки, CD8<sup>+</sup> Т-клетки, Т-хелперные Т-клетки 1-го типа, Т-хелперные Т-клетки 2-го типа, Т-хелперные Т-клетки 17-го типа и ингибирующие Т-клетки.

Используемый в данном описании термин «эффекторная Т-клетка», «Т eff» или «эффекторная клетка» описывает группу иммунных клеток, которая включает несколько типов Т-клеток, которые активно реагируют на стимул, такой как костимуляция. В частности, термин включает Т-клетки, функция которых заключается в элиминации антигена (например, за счет продуцирования цитокинов, которые модулируют активацию других клеток, или за счет цитотоксической активности). В частности, термин включает CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, цитотоксические Т-клетки и хелперные Т-клетки (Th1 и Th2).

Используемый в данном описании термин «регуляторные Т-клетки», Treg-клетки или «Treg» относится к субпопуляции Т-клеток, которые модулируют иммунную систему, поддерживают толерантность к аутоантигенам и предотвращают аутоиммунное заболевание. Treg являются иммуносупрессивными и обычно супрессируют или отрицательно регулируют индукцию и пролиферацию эффекторных Т-клеток. Treg экспрессируют биомаркеры CD4, FOXP3 и CD25 и, как полагают, происходят из той же линии, что и наивные клетки CD4.

Термин «истощенные Т-клетки» относится к популяции Т-клеток в состоянии дисфункции (т.е. «истощение»). Истощение Т-клеток характеризуется прогрессирующей потерей функции, изменениями профилей транскрипции и устойчивой экспрессией ингибирующих рецепторов. Истощенные Т-клетки теряют способность продуцировать цитокины, высокую пролиферативную способность и цитотоксический потенциал, что в конечном итоге приводит к их делеции. Истощенные Т-клетки обычно показывают более

высокие уровни CD43, CD69 и ингибирующих рецепторов в сочетании с более низкой экспрессией CD62L и CD127.

Термин «иммунный ответ» относится к действию, например, лимфоцитов, антигенпрезентирующих клеток, фагоцитарных клеток, гранулоцитов и растворимых макромолекул, продуцируемых указанными выше клетками или печенью (включая антитела, цитокины и компоненты комплемента), что приводит к селективному повреждению, разрушению или удалению из организма человека вторгающихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, злокачественных опухолевых клеток или, в случае аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека.

Используемый в данном описании термин «антагонист» относится к веществу, которое блокирует или снижает активность или функциональность другого вещества. В частности, этот термин относится к антителу, которое связывается с клеточным рецептором (например, PD-1) в качестве референсного вещества (например, PD-L1 и/или PD-L2), не позволяя ему полностью или частично генерировать свои обычные биологические эффекты (например, создание иммуносупрессивной микросреды). Антагонистическая активность гуманизованного антитела по изобретению может быть оценена с помощью конкурентного ELISA.

Используемый в данном описании термин «агонист» относится к веществу, которое активирует функцию активирующего рецептора. В частности, этот термин относится к антителу, которое связывается с клеточным активирующим рецептором в качестве эталонного вещества и оказывает по меньшей мере частично такое же действие, что и биологически природный лиганд (например, индуцирует активирующее действие рецептора).

Фармакокинетика (ФК) относится к перемещению лекарственных средств в организме, тогда как фармакодинамика (ФД) относится к биологической реакции организма на лекарственные средства. ФК описывает воздействие лекарственного средства, характеризуя абсорбцию, распределение, биодоступность, метаболизм и экскрецию в зависимости от времени. ФД описывает реакцию на лекарственное средство с точки зрения биохимических или молекулярных взаимодействий. Анализы ФК и ФД используются для характеристики воздействия лекарственного средства, прогнозирования и оценки изменений дозировки, оценки скорости элиминации и скорости абсорбции, оценки относительной биодоступности/биоэквивалентности препарата, характеристике внутри- и межсубъектной изменчивости, понимания взаимосвязей концентрации-эффекта и установления границ безопасности и характеристик эффективности. Под «улучшением

ФК» подразумевается, что улучшается одна из вышеуказанных характеристик, например, такая как увеличенный период полувыведения молекулы, в частности, более длительный сывороточный период полувыведения молекулы при инъекции субъекту.

Используемый в данном описании термин «выделенный» указывает на то, что данный материал (например, антитело, полипептид, нуклеиновая кислота и т.д.) по существу отделен от других материалов, вместе с которыми он находится в природе, или обогащен по отношению к ним. В частности, «выделенное» антитело - это антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено из его естественного окружения.

Союз «и/или», используемый в данном описании, следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без другого. Например, «А и/или В» следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из признаков (i) А, (ii) В и (iii) А и В, как если бы каждый из них был указан индивидуально.

Формы единственного числа могут относиться к одному из или множеству элементов (например, «реагент» может означать один или несколько реагентов), если здесь не указано иное или это явно не противоречит контексту (описан как один элемент, так и более одного элементов).

Термин «около», используемый в данном описании в связи с любыми и всеми значениями (включая нижний и верхний пределы числовых диапазонов), означает любое значение, имеющее допустимый диапазон отклонения вплоть до +/- 10% (например, +/- 0,5%, +/- 1%, +/- 1,5%, +/- 2%, +/- 2,5%, +/- 3%, +/- 3,5%, +/- 4%, +/- 4,5%, +/- 5%, +/- 5,5%, +/- 6%, +/- 6,5%, +/- 7%, +/- 7,5%, +/- 8%, +/- 8,5%, +/- 9%, +/- 9,5%). Использование термина «около» в начале строки значений изменяет каждое из значений (т.е. «около 1, 2 и 3» относятся к около 1, около 2 и около 3). Кроме того, когда в данном описании приводится список значений (например, около 50%, 60%, 70%, 80%, 85% или 86%), он включает все промежуточные и дробные значения (например, 54%, 85,4%).

### Мутанты IL-7

В настоящем изобретении предлагаются мутанты интерлейкина 7 (IL-7m) и бифункциональные молекулы, содержащие первый компонент, содержащий мутант интерлейкина 7 (IL-7m), и второй компонент, содержащий связывающий фрагмент.

Термины «мутант интерлейкина-7», «мутированный IL-7», «мутант IL-7», «вариант IL-7», «IL-7m» или «IL-7v» используются в настоящем описании взаимозаменяемо. «Вариант» или «мутант» белка IL-7 определяется как аминокислотная последовательность, в которой изменены одна или несколько аминокислот. Вариант

может иметь «консервативные» модификации или «неконсервативные» модификации. Такие модификации могут включать аминокислотные замены, делеции и/или вставки. Предпочтительно модификации представляют собой замены, в частности консервативные замены. Варианты белков IL-7, включенные в изобретение, конкретно относятся к белкам IL-7, которые не сохраняют, по существу, эквивалентные биологические свойства (например, активность, связывающую способность и/или структуру) по сравнению с IL-7 дикого типа. Мутант или вариант IL-7 содержит по меньшей мере одну мутацию. В частности, по меньшей мере одна мутация снижает аффинность IL-7m к IL-7R, но не приводит к потере узнавания IL-7R., соответственно, мутант IL-7 или его вариант сохраняет способность активировать IL-7R, например, при измерении с помощью сигнала pStat5, например, как раскрыто в Bitar et al., *Front. Immunol.*, 2019, volume 10). Биологическую активность белка IL-7 можно измерить с помощью анализов клеточной пролиферации *in vitro* или путем измерения P-Stat5 в Т-клетках с помощью ELISA или FACS. Предпочтительно варианты IL-7 по изобретению обладают редуцированными биологическими свойствами (например, активностью, связывающей способностью и/или структурой) по меньшей мере в 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000 или 8000 раз по сравнению с IL-7 дикого типа, предпочтительно wth-IL7. Более предпочтительно варианты IL-7 имеют пониженное связывание с рецептором IL-7, но сохраняют способность активировать IL-7R. Например, связывание с рецептором IL-7 может быть снижено по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% по сравнению с IL-7 дикого типа и при этом сохраняется способность активировать IL-7R по меньшей мере на 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30% или 20% по сравнению с IL-7 дикого типа. Предпочтительно IL-7m представляет собой вариант человеческого IL-7 дикого типа, например такой, как представленный SEQ ID NO:1.

В одном воплощении варианты IL-7 по изобретению сохраняют биологическую активность по меньшей мере на 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% по сравнению с IL-7 человека дикого типа, предпочтительно по меньшей мере на 80%, 90%, 95% и еще более предпочтительно на 99% по сравнению с IL-7 дикого типа.

В одном аспекте вариант или мутант IL-7 отличается от IL-7 дикого типа по меньшей мере одной аминокислотной мутацией, которая i) снижает аффинность варианта IL-7 к рецептору IL-7 (IL-7R) по сравнению со средством IL-7 дикого типа к IL-7R, и ii) улучшает фармакокинетику варианта IL7 по сравнению с IL7 дикого типа. Более конкретно, вариант или мутант IL-7 дополнительно сохраняет способность активировать IL-7R, в частности, посредством передачи сигнала pStat5.

В другом аспекте бифункциональная молекула, содержащая вариант или

мутированный IL-7, отличается от IL-7 дикого типа по меньшей мере одной аминокислотной мутацией, которая i) снижает аффинность бифункциональной молекулы к рецептору IL-7 (IL-7R) в сравнении с аффинностью к IL-7R бифункциональной молекулы, содержащей IL-7 дикого типа, и ii) улучшает фармакокинетику бифункциональной молекулы, содержащей вариант или мутированный IL-7, по сравнению с бифункциональной молекулой, содержащей IL-7 дикого типа. Более конкретно, бифункциональная молекула, содержащая вариант или мутированный IL-7, дополнительно сохраняет способность активировать IL-7R, в частности, посредством передачи сигнала pStat5. Например, связывающая бифункциональная молекула, содержащая вариант IL-7 или мутированный IL-7 к IL-7R, может быть уменьшена по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% по сравнению с бифункциональной молекулой, содержащей IL-7 дикого типа, и сохраняет способность активировать IL-7R по меньшей мере на 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30% или 20% по сравнению с бифункциональной молекулой, содержащей IL-7 дикого типа.

Согласно изобретению IL-7m проявляет пониженную аффинность к рецептору IL-7 (IL-7R) по сравнению с аффинностью wt-IL-7 к IL-7R. В частности, IL-7m проявляет пониженную аффинность к CD127 и/или CD132 по сравнению с аффинностью wt-IL-7 к CD127 и/или CD132, соответственно. Предпочтительно IL-7m проявляет пониженную аффинность к CD127 по сравнению с аффинностью wt-IL-7 к CD127.

Предпочтительно по меньшей мере одна аминокислотная мутация снижает аффинность IL-7m к IL-7R, в частности к CD132 или CD127, по меньшей мере в 10, 100, 1000, 10 000 или 100 000 раз по сравнению с аффинностью wt-IL-7 к IL-7R. Такое сравнение аффинности может быть выполнено любыми способами, известными специалистам в данной области, такими как ELISA или Biacore.

Предпочтительно по меньшей мере одна аминокислотная мутация снижает аффинность IL-7m к IL-7R, но не снижает биологическую активность IL-7m по сравнению с IL-7 дикого типа, в частности, при измерении посредством передачи сигнала pStat5.

Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная мутация снижает аффинность IL-7m к IL-7R, но не снижает значительно биологическую активность IL-7m по сравнению с IL-7 дикого типа, в частности, при измерении посредством передачи сигнала pStat5.

Дополнительно или альтернативно, IL-7m улучшает фармакокинетику варианта или мутанта IL-7 или бифункциональной молекулы, содержащей вариант IL-7, по сравнению с IL-7 дикого типа или бифункциональной молекулой, содержащей IL-7 дикого типа, соответственно. В частности, IL-7m по изобретению улучшает фармакокинетику

варианта IL-7 по меньшей мере в 10, 100 или 1000 раз по сравнению с wth-IL-7. В частности, IL-7m согласно изобретению улучшает фармакокинетику бифункциональной молекулы, содержащей вариант или мутированный IL-7, по меньшей мере в 10, 100 или 1000 раз по сравнению с бифункциональной молекулой, содержащей wth-IL-7. Сравнение фармакокинетического профиля может быть выполнено любыми способами, известными специалистам в данной области, такими как инъекция лекарственного средства *in vivo* и ELISA дозировки лекарственного средства в сыворотке в несколько моментов времени, например, как показано в Примере 2.

Используемые в данном описании термины «фармакокинетика» и «ФК» используются взаимозаменяемо и относятся к «поведению» соединений, веществ или лекарственных средств, вводимых в живой организм. Фармакокинетика, в частности, включает схему ADME или LADME, которая обозначает высвобождение (т.е. высвобождение вещества из композиции), абсорбцию (т.е. поступление вещества в кровоток), распределение (т.е. дисперсию или распространение вещества по организму), метаболизм (т.е. преобразование или деградацию вещества) и экскрецию (т.е. удаление или клиренс вещества из организма). Две фазы метаболизма и экскреции также могут быть объединены под общим названием «элиминация». Специалист в данной области может контролировать различные параметры фармакокинетики, такие как период полувыведения, постоянная скорость выведения, клиренс (т.е. объем плазмы, очищенной от лекарственного средства за единицу времени), *C<sub>max</sub>* (максимальная сывороточная концентрация), экспозиция лекарственного средства (определяется площадью под кривой, см. Scheff et al., *Pharm Res.* 2011 May; 28(5):1081-9) среди прочего.

При этом улучшение фармакокинетики при применении IL-7m, в частности, в бифункциональной молекуле, относится к улучшению по меньшей мере одного из вышеупомянутых параметров. Предпочтительно такое улучшение относится к улучшению периода полувыведения бифункциональной молекулы, т.е. увеличению продолжительности периода полувыведения или *C<sub>max</sub>*.

В конкретном воплощении по меньшей мере одна мутация IL-7m улучшает период полувыведения бифункциональной молекулы, содержащей IL-7m, по сравнению с бифункциональной молекулой, содержащей IL-7 wt.

В одном воплощении IL-7m имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с белком IL-7 человека (wth-IL-7) дикого типа, состоящим из 152 аминокислот, как описано посредством SEQ ID NO: 1. Предпочтительно IL-7m имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по

меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID No: 1.

В частности, по меньшей мере одна мутация происходит в аминокислотном положении 74 и/или 142 в IL-7. Дополнительно или альтернативно по меньшей мере одна мутация происходит в положениях аминокислот 2 и 141, 34 и 129 и/или 47 и 92. Эти положения относятся к положениям аминокислот, указанным в SEQ ID NO: 1.

В частности, по меньшей мере одна мутация представляет собой аминокислотную замену или группу аминокислотных замен, выбранную из группы, состоящей из C2S-C141S и C47S-C92S, C2S-C141S и C34S-C129S, C47S-C92S и C34S-C129S, W142H, W142F, W142Y, Q11E, Y12F, M17L, Q22E, K81R, D74E, D74Q и D74N или любых их комбинаций. Эти мутации относятся к положению аминокислот, указанному в SEQ ID NO: 1. Например, мутация W142H означает замену триптофана wth-IL7 на гистидин с получением IL-7m, содержащего гистидин в аминокислотном положении 142. Такой мутант, например, описан посредством SEQ ID NO: 5.

В одном воплощении IL-7m содержит наборы замен для разрушения дисульфидных связей между C2 и C141, C47 и C92 и C34-C129. В частности, IL-7m содержит два набора замен, чтобы разрушить дисульфидные связи между C2 и C141, C47 и C92; C2 и C141, и C34-C129; или C47 и C92, и C34-C129. Например, остатки цистеина могут быть заменены серином, чтобы предотвратить образование дисульфидных связей., соответственно, аминокислотные замены могут быть выбраны из группы, состоящей из C2S-C141S и C47S-C92S (обозначаемых как «SS2»), C2S-C141S и C34S-C129S (обозначаемых как «SS1») и C47S-C92S и C34S-C129S (обозначается как «SS3»). Эти мутации относятся к положению аминокислот, указанному в SEQ ID NO:1. Такие IL-7m, в частности, описаны для последовательности, представленной SEQ ID NO: 2-4 (SS1, SS2 и SS3, соответственно). Предпочтительно IL-7m содержит замены аминокислот C2S-C141S и C47S-C92S. Еще более предпочтительно IL-7m представлен последовательностью SEQ ID NO: 3.

В другом воплощении IL-7m содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из W142H, W142F и W142Y. Такие IL-7m, в частности, описаны посредством последовательности SEQ ID NO: 5-7, соответственно. Предпочтительно IL-7m содержит мутацию W142H. Еще более предпочтительно IL-7m представлен последовательностью SEQ ID NO: 5.

В другом воплощении IL-7m содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из D74E, D74Q и D74N, предпочтительно D74E и D74Q. Такие IL-7m, в частности, описаны посредством последовательностей SEQ ID NO: 12-14,

соответственно. Предпочтительно IL-7m содержит мутацию D74E. Еще более предпочтительно IL-7m представлен последовательностью SEQ ID NO: 12.

В другом воплощении IL-7m содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из Q11E, Y12F, M17L, Q22E и/или K81R. Эти мутации относятся к положению аминокислот, указанному в SEQ ID NO:1. Такие IL-7m, в частности, представлены последовательностями SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 и 15, соответственно.

В одном воплощении IL-7m содержит по меньшей мере одну мутацию, состоящую из i) W142H, W142F или W142Y и/или ii) D74E, D74Q или D74N, предпочтительно D74E или D74Q, и/или iii) C2S-C141S и C47S-C92S, C2S-C141S и C34S-C129S или C47S-C92S и C34S-C129S.

В одном воплощении IL-7m содержит замену W142H и по меньшей мере одну мутацию, состоящую из i) D74E, D74Q или D74N, предпочтительно D74E или D74Q, и/или ii) C2S-C141S и C47S-C92S, C2S-C141S и C34S-C129S или C47S-C92S и C34S-C129S.

В одном воплощении IL-7m содержит замену D74E и по меньшей мере одну мутацию, состоящую из i) W142H, W142F или W142Y и/или ii) C2S-C141S и C47S-C92S, C2S-C141S и C34S-C129S или C47S-C92S и C34S-C129S.

В одном воплощении IL-7m содержит мутации C2S-C141S и C47S-C92S и по меньшей мере одну замену, состоящую из i) W142H, W142F или W142Y и/или ii) D74E, D74Q или D74N, предпочтительно D74E или D74Q.

В одном воплощении IL-7m содержит i) замены D74E и W142H и ii) мутации C2S-C141S и C47S-C92S, C2S-C141S и C34S-C129S или C47S-C92S и C34S-C129S.

Белки IL-7m могут включать свой пептидный сигнал или не содержать его. Вариант IL-7 может также включать полипептиды с измененной последовательностью IL-7 (например, окисленные, восстановленные, дезаминированные или укороченные формы).

В одном аспекте вариант или мутант IL-7, используемый в настоящем изобретении, представляет собой рекомбинантный IL-7. Термин «рекомбинантный», используемый в данном описании, означает, что полипептид получен или происходит из рекомбинантной экспрессирующей системы, т.е. из культуры клеток-хозяев (например, микробных или клеток насекомых, растений или млекопитающих) или из трансгенных растений или животных, сконструированных так, чтобы они содержали молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид IL-7m. Предпочтительно, рекомбинантный IL-7 представляет собой рекомбинантный IL-7m человека (например, IL-7m человека, продуцируемый в рекомбинантной экспрессирующей системе).

В одном воплощении IL-7m представлен последовательностью SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15. Предпочтительно бифункциональная молекула по изобретению содержит вариант IL-7, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 2-15. Еще более предпочтительно, бифункциональная молекула по изобретению включает вариант IL-7, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3, 5 или 12.

В одном воплощении изобретение относится к вариантам IL-7 и бифункциональным молекулам, содержащим варианты IL-7, которые обладают пониженной иммуногенностью по сравнению с белками IL-7 дикого типа, в частности, за счет удаления Т-клеточных эпитопов в IL-7, которые могут стимулировать иммунный ответ. Примеры такого IL-7 описаны в WO 2006061219.

Настоящее изобретение также относится к любому слитому белку, содержащему варианты или мутанты IL-7, как раскрыто в настоящем описании, и к любому конъюгату, содержащему варианты или мутанты IL-7, как раскрыто в настоящем описании. Варианты или мутанты IL-7 могут быть слиты по их N-концу или их C-концу. Варианты или мутанты IL-7 могут быть слиты или конъюгированы с пептидом, белком (например, антителом, его фрагментом и производным, миметиком антитела, цитокином или рецептором цитокина, опухолевым или вирусным антигеном, альбумином или белком, связывающим альбумин), полимером (например, PEG), химическим соединением, таким как лекарственное средство (например, противоопухолевое или противовирусное средство), углеводом и молекулой нуклеиновой кислоты (например, siRNA, shRNA, антисмысловой последовательностью, химерным олигонуклеотидом).

Неисчерпывающий список молекул, которые могут быть конъюгированы или слиты с вариантами или мутантами IL-7, включает антитело, такое как анти-CD19, антикалретикулин, противоопухолевый антиген; цитокин или рецептор цитокина, такой как IL-15 или IL-15R; домен, который продлевает время полувыведения варианта IL-7, такой как Fc-область иммуноглобулина или его части, альбумин, альбуминсвязывающий полипептид, Pro/Ala/Ser (PAS), C-концевой пептид (СТР) бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека, полиэтиленгликоль (PEG), длинные неструктурированные гидрофильные последовательности аминокислот (XTEN), гидроксипропилкрахмал (HES), низкомолекулярное вещество, связывающее альбумин, и их комбинации; и пептид, связывающий фибронектин.

Особые примеры гибридных белков и конъюгатов, включающих IL-7, раскрыты, например, в заявках WO19222294, WO19215510, WO19178362, WO19178364,

WO19144309, WO19046313, WO18215937, WO18201047, WO18064611, WO17216223, US2018319858, WO17158436, WO16200219, WO05063820.

В конкретном аспекте вариант или мутант IL-7 может быть включен в бифункциональную молекулу, содержащую связывающий фрагмент.

#### Связывающий фрагмент

Бифункциональная молекула согласно изобретению, содержит мутированный вариант IL-7, раскрытый в настоящем описании, и дополнительную или вторую часть, которая содержит связывающий фрагмент.

Понятно, что связывающий фрагмент, содержащийся в бифункциональной молекуле, не является интерлейкином, в частности, IL-7 или IL-7R.

Используемое в данном описании понятие «связывающий фрагмент» относится к любой части бифункциональной молекулы, обладающей способностью связываться с мишенью, такой как пептид, полипептид, белок, гибридный белок и антитело. В частности, связывающие фрагменты включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и миметики или миметики антитела. Мишени связывающих фрагментов конкретнее определены ниже.

В одном воплощении связывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента и миметика антитела или миметика. Специалисты в области биохимии знакомы с миметиками антител или миметиками, как описано в Gebauer and Skerra, 2009, *Curr Opin Chem Biol* 13(3): 245-255. Примеры миметиков антител включают: аффитела (также называемые тринектинами; Nygren, 2008, *FEBS J*, 275, 2668-2676); CTLD (также называемые тетранектинами; *Innovations Pharmac. Technol.* (2006), 27-30); аднектины (также называемые монотелами; *Meth. Mol. Biol.*, 352 (2007), 95-109); антикарины (*Drug Discovery Today* (2005), 10, 23-33); DARPins (анкирины; *Nat. Biotechnol.* (2004), 22, 575-582); авимеры (*Nat. Biotechnol.* (2005), 23, 1556-1561); микротела (*FEBS J*, (2007), 274, 86-95); аптамеры (*Expert. Opin. Biol. Ther.* (2005), 5, 783-797); домены Куница (*J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2006) 318, 803-809); аффилины (*Trends. Biotechnol.* (2005), 23, 514-522); аффитины (Krehenbrink et al, 2008, *J. Mol. Biol.* 383 (5): 1058-68), альфатела (Desmet, J.; et al, 2014, *Nature Communications*. 5: 5237), финомеры (Grabulovski D; et al., 2007, *J Biol Chem*. 282 (5): 3196-3204) и аффимеры (Avacta Life Sciences, Уэзерби, Великобритания).

Соответственно, связывающий фрагмент может быть выбрана из группы, состоящей из антитела или фрагмента антитела, предпочтительно таких, как иммуноглобулины, scFv или VHH, Fab, однодоменные антитела и миметики антитела, предпочтительно такие как аффитела, CTLD, аднектины, антикарины, DARPins, авимеры,

микротела, аптамеры, домены Куница, аффилины, аффитины, альфатела, финомеры и аффимеры.

Предпочтительно связывающий фрагмент представляет собой антитело или фрагмент этого антитела. Еще более предпочтительно связывающий фрагмент представляет собой человеческое, гуманизированное или химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

#### Мишень связывающего фрагмента

Согласно изобретению, связывающий фрагмент специфически связывается с мишенью, экспрессируемой на поверхности иммунных клеток, в частности с мишенями, которые экспрессируются только или специфически на иммунных клетках. В частности, связывающий фрагмент не направлен на мишень, экспрессируемую на опухолевых клетках.

Что касается «связывающей» способности связывающего фрагмента, термины «связывать» или «связывание» относятся к пептидам, полипептидам, белкам, гибридным белкам, молекулам и антителам (включая фрагменты антител и миметики антител), которые распознают и связываются с другим пептидом, полипептидом, белком или молекулой. В одном воплощении это относится к взаимодействию типа антиген-антитело. Термины «специфическое связывание», «специфически связывается с», «специфический по отношению к», «избирательно связывает» и «селективно в отношении» конкретной мишени означают, что связывающий фрагмент распознает и связывает конкретную мишень, но, по существу, не распознает или не связывает другие молекулы в образце. Например, антитело, которое специфически (или предпочтительно) связывается с антигеном, представляет собой антитело, которое связывает антиген, например, с большей аффинностью, авидностью, с большей вероятностью и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими молекулами. Предпочтительно термин «специфическое связывание» означает контакт между антителом и антигеном с аффинностью связывания, равной или ниже  $10^{-7}$  М. В некоторых аспектах антитела связываются с аффинностями, равными или ниже  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М или  $10^{-10}$  М.

Используемый в данном описании термин «мишень» относится к углеводу, липиду, пептиду, полипептиду, белку, антигену или эпитопу, который специфически распознается или является мишенью связывающего фрагмента по изобретению и экспрессируется на внешней поверхности иммунных клеток. Что касается экспрессии мишени на поверхности иммунных клеток, термин «экспрессированный» относится к мишени, такой как углеводы, липиды, пептиды, полипептиды, белки, антигены или эпитопы, которые презентуются или были презентированы на внешней поверхности клетки. Термин

«специфически экспрессируемый» означает, что мишень экспрессируется на иммунных клетках, но практически не экспрессируется другими типами клеток, в частности такими, как опухолевые клетки.

В одном воплощении мишень специфически экспрессируется иммунными клетками у здорового субъекта или у объекта, страдающего заболеванием, в частности, таким как онкологическое заболевание. Это означает, что мишень имеет более высокий уровень экспрессии в иммунных клетках, чем в других клетках, или что отношение иммунных клеток, экспрессирующих мишень, к общему количеству иммунных клеток выше, чем отношение других клеток, экспрессирующих мишень, к общему количеству других клеток. Предпочтительно уровень или коэффициент экспрессии выше в 2, 5, 10, 20, 50 или 100 раз. Более конкретно, это можно определить для данного типа иммунных клеток, например Т-клеток, более конкретно CD8<sup>+</sup> Т-клеток, эффекторных Т-клеток или истощенных Т-клеток, или в конкретном контексте, например, у объекта, страдающего таким заболеванием, как онкологическое заболевание или инфекция.

Используемый в данном описании термин «иммунные клетки» относится к клеткам, участвующим во врожденном и адаптивном иммунитете, например, таким как белые кровяные клетки (лейкоциты), которые происходят из гемопоэтических стволовых клеток (HSC), продуцируемых в костном мозге, лимфоциты (Т-клетки, В-клетки, естественные киллеры (NK) и естественные киллерные Т-клетки (NKT)) и клетки миелоидного происхождения (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки). В частности, иммунная клетка может быть выбрана из неполного списка, включающего В-клетки, Т-клетки, в частности CD4<sup>+</sup> Т-клетки и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, NK-клетки, NKT-клетки, APC-клетки (антигенпредставляющие клетки), макрофаги, дендритные клетки и моноциты.

Предпочтительно связывающий фрагмент специфически связывается с экспрессированными на иммунных клетках мишенями, выбранными из группы, состоящей из В-клеток, Т-клеток, естественных киллеров, дендритных клеток, моноцитов и врожденных лимфоидных клеток (ILC).

Еще более предпочтительно, иммунная клетка представляет собой Т-клетку. Термины «Т-клетка» или «Т-лимфоциты» в контексте настоящего описания включают, например, CD4<sup>+</sup> Т-клетки, CD8<sup>+</sup> Т-клетки, Т-клетки Т-хелперы 1 типа, Т-клетки Т-хелперы 2 типа, Т-регуляторные клетки, Т-клетки Т-хелперы 17 типа и ингибирующие Т-клетки. В очень конкретном воплощении иммунная клетка представляет собой истощенную Т-клетку.

Мишенью может быть рецептор, экспрессируемый на поверхности иммунных

клеток, особенно Т-клеток. Рецептор может представлять собой рецептор-ингибитор. Альтернативно, рецептор может быть активирующим рецептором.

В одном аспекте мишень выбрана из группы, состоящей из PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 и CD8. Такие мишени более подробно описаны в Таблице D ниже.

Таблица D. Пример представляющей интерес мишени

Название	Официальное название	Название Uniprot
2B4	Рецептор 2B4 естественных клеток-киллеров (рецепторный белок 2B4 NK-клеток I типа, NKR2B4) (ассоциированный с уничтожением без MHC-рестрикции) (представитель 4 семейства SLAM, SLAMF4) (сигнальная молекула 4 активации лимфоцитов) (CD антиген CD244)	Q07763
4-1BB	Представитель 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (рецептор-лиганд 4-1BB, CD137)	Q07011
BTLA	Аттенюатор В- и Т-лимфоцитов (белок, ассоциированный с В- и Т-лимфоцитами) (CD антиген CD272)	Q7Z6A9
CD101	Представитель 2 суперсемейства иммуноглобулинов, IgSF2 (гликопротеин V7 клеточной поверхности) (белок 101, содержащий мотив Glu-Trp-Ile EWI, EWI-101) (CD антиген CD101)	Q93033
CD160	Антиген CD160 (рецептор естественных клеток-киллеров BY55)	O95971
CD27	Антиген CD27 (рецептор CD27L) (антиген активации Т-клеток CD27) (T14) (представитель 7 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли) (CD антиген CD27)	P26842
CD28	Специфичный для Т-клеток поверхностный гликопротеин CD28 (TR44)	P10747
CD28H	Белок 2, содержащий трансмембранный домен и домен иммуноглобулина (гомолог CD28) (рецептор 1, богатый иммуноглобулином и пролином, IGPR-1)	Q96BF3
CD3	Поверхностный гликопротеин Т-клеток CD3	P07766 (CD3e) P04234 (CD3d) P09693 (CD3g)
CD30	Представитель 8 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (CD30-лиганд, CD30-L) (CD антиген CD153)	P32971
CD38	АДФ-рибозилциклаза/циклическая АДФ-рибоза гидролаза 1 (ADPRC 1, cADPr гидролаза 1)	P28907
CD39	Эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза-1 (NTPDase 1, Ecto-aryugase, ATPDase 1 или антиген активации лимфоидных клеток)	P49961
CD4	Поверхностный гликопротеин CD4 Т-клеток (поверхностный антиген Т-клеток T4/Leu-3)	P01730
CD40L	Лиганд CD40 (антиген Т-клеток Gr39, белок активации, связанный с TNF, представитель 5 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли, CD154)	P29965
CD44	Антиген CD44 (Ericsan, рецептор внеклеточного матрикса III, рецептор самонаведения/адгезии лимфоцитов GP90, HUTCH-I, гепарансульфатпротеогликан, антиген Hermes, гиалуронатный рецептор, фагоцитарный гликопротеин I, фагоцитарный гликопротеин I)	P16070
CD8	Поверхностный гликопротеин Т-клеток CD8	P01732 (CD8a)

		P10966 (CD8b)
CD80	Антиген активации Т-лимфоцитов CD80 (антиген активации В7-1, ВВ1, контррецептор CTLA-4 В7.1, В7)	P33681
CTLA-4	Цитотоксический белок 4 Т-лимфоцитов (цитотоксический антиген 4, ассоциированный с Т-лимфоцитами, CTLA-4) (CD антиген CD152)	P16410
CXCR5	Хемокиновый рецептор С-Х-С типа 5 (рецептор 1 лимфомы Беркитта, рецептор 15, полученный из моноцитов, CD185)	P32302
DR3	Рецептор смерти 3 (представитель 25 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, WSL, Аро-3, LARD)	Q93038
GITR	Представитель 18 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (рецептор семейства TNFR, индуцируемый активацией, TNFR-родственный белок, индуцированный глюкокортикоидами, CD357)	Q9Y5U5
HVEM	Представитель 14 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (медиатор проникновения вируса герпеса А, медиатор проникновения вируса герпеса А, HveA) (рецептор, подобный 2 фактору некроза опухоли, TR2) (CD антиген CD270)	Q92956
ICOS	Индукцибельный костимулятор Т-клеток (иммуномедиаторная молекула лимфоцитов, индуцируемая активацией, CD278)	Q9Y6W8
LAG3	Белок 3 гена активации лимфоцитов, LAG-3 (белок FDC) (CD антиген CD223)	P18627
LFA-1	Цель альфа-цепи гликопротеина адгезии лейкоцитов LFA-1 (интегрин альфа-L, представитель А семейства антигенподобных CD11)	P20701
NKG2D	Интегральный мембранный белок NKG2-D типа II (представитель 1 подсемейства К рецептора, подобного лектину клеток-киллеров, рецептор D NK-клеток, NKG2-D-активирующий NK-рецептор, CD314)	P26718
OX40	Представитель 4 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (антиген АСТ35, рецептор транскрипционноактивируемого гликопротеина 1 АХ)	P43489
PD-1	Белок запрограммированной гибели клеток 1 (CD279)	Q15116
PDL2	Лиганд 2 запрограммированной гибели клеток 1, лиганд 2 PD-1, PD-L2, лиганд 2 PDCD1, лиганд 2 запрограммированной гибели клеток (бутирофилин В7-DC, В7-DC) (CD антиген CD273)	Q9BQ51
SIRPG	Сигнально-регуляторный белок гамма, SIRP-гамма (представитель В семейства CD172-антиген-подобных белков) (сигнально-регуляторный белок бета-2, SIRP-b2, SIRP-бета-2) (CD антиген CD172g)	Q9P1W8
TIGIT	Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (белок 9, содержащий V-набор и домен иммуноглобулина) (белок 3, содержащий V-набор и трансмембранный домен)	Q495A1
Tim-1	Клеточный рецептор 1 вируса гепатита А (белок 1, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и домен муцина, молекула 1 повреждения почек, KIM-1, муциновый рецептор 1 Т-клеточного иммуноглобулина, белок 1 Т-клеточной мембраны, CD365)	Q96D42
TIM3	Клеточный рецептор 2 вируса гепатита А, HAVcr-2 (белок 3, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и муциновый домен, TIMD-3) (муциновый рецептор 3 Т-клеточного иммуноглобулина, TIM-3) (белок 3 Т-клеточной мембраны)	Q8TDQ0

Соответственно, связывающий фрагмент специфически связывается с мишенью, выбранной из группы, состоящей из PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30,

NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 и CD8.

В конкретном аспекте иммунная клетка представляет собой истощенную Т-клетку, а мишенью связывающего фрагмента является фактор истощения, экспрессируемый на поверхности истощенных Т-клеток. Истощение Т-клеток представляет собой состояние прогрессирующей потери Т-клетками функции, способности к пролиферации и цитотоксического потенциала, что в конечном итоге приводит к их делеции. Истощение Т-клеток может быть вызвано несколькими факторами, такими как постоянное воздействие антигена или ингибирующие рецепторы, включая PD-1, TIM3, CD244, CTLA-4, LAG-3, BTLA, TIGIT и CD160. Предпочтительно такой фактор истощения выбирают из группы, состоящей из PD-1, TIM3, CD244, CTLA-4, LAG-3, BTLA, TIGIT и CD160.

В предпочтительном воплощении связывающий фрагмент обладает антагонистической активностью в отношении мишени.

В данной области уже описаны многочисленные антитела, направленные против PD-1, TIM3, CD244, CTLA-4, LAG-3, BTLA, TIGIT и CD160.

Некоторые анти-PD-1 уже клинически одобрены, а другие все еще находятся в стадии клинических разработок. Например, антитело против PD1 может быть выбрано из группы, состоящей из пембролизумаба (также известного как ламбролизумаб Keytruda, МК-3475), ниволумаба (Opdivo, MDX-1106, BMS-936558, ONO-4538), пидилизумаба (CT-4538. 011), цемиплимаба (Libtayo), камрелизумаба, AUNP12, AMP-224, AGEN-2034, BGB-A317 (тислейзумаб), PDR001 (спартализумаб), МК-3477, SCH-900475, PF-06801591, JNJ-63723283, генолимзумаба (CBT-501), LZM-009, BCD-100, SHR-1201, BAT-1306, AK-103 (HX-008), MEDI-0680 (также известного как AMP-514) MEDI0608, JS001 (см. Si-Yang Liu et al., J. Hematol. Oncol.10:136 (2017)), BI-754091, CBT-501, INCSHR1210 (также известного как SHR-1210), TSR-042 (также известного как ANB011), GLS-010 (также известного как WBP3055), AM-0001 (Armo), STI-1110 (см. WO 2014/194302), AGEN2034 (см. WO 2017/040790), MGA012 (см. WO 2017/19846) или IBI308 (см. WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017). /132825 и WO 2017/133540), моноклональных антител 5C4, 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 и 5F4, описанных в заявке WO 2006/121168. Также известны бифункциональные или биспецифические молекулы, нацеленные на PD-1, такие как RG7769 (Roche), XmAb20717 (Xencor), MEDI5752 (AstraZeneca), FS118 (F-star), SL-279252 (Takeda) и XmAb23104 (Xencor).

В конкретном воплощении антитело против PD1 может представлять собой пембролизумаб (также известный как ламбролизумаб Keytruda, МК-3475) или ниволумаб (Opdivo, MDX-1106, BMS-936558, ONO-4538).

Также известны антитела, направленные против TIM3 и бифункциональные или биспецифические молекулы, нацеленные на TIM3, такие как Sym023, TSR-022, MBG453, LY3321367, INCAGN02390, BGTB-A425, LY3321367, RG7769 (Roche). В некоторых воплощениях антитело TFM-3 раскрыто в опубликованных международных патентных заявках WO2013006490, WO2016161270, WO 2018085469, WO 2018129553 или WO 2011/155607, а также в документах US 8552156, EP 2581113 и US 2014/044728.

Также известны антитела, направленные против CTLA-4 и бифункциональные или биспецифические молекулы, нацеленные на CTLA-4, такие как ипилимумаб, тремелимумаб, МК-1308, AGEN-1884, XmAb20717 (Xencor), MEDI5752 (AstraZeneca). Анти-CTLA-4 антитела также раскрыты в заявках WO18025178, WO19179388, WO19179391, WO19174603, WO19148444, WO19120232, WO19056281, WO19023482, WO18209701, WO18165895, WO18160536, WO18156250, WO18106862, WO18106864, WO18068182, WO18035710, WO18025178, WO17194265, WO17106372, WO17084078, WO17087588, WO16196237, WO16130898, WO16015675, WO12120125, WO09100140 и WO07008463.

Также известны антитела, направленные против LAG-3 и бифункциональные или биспецифические молекулы, нацеленные на LAG-3, такие как BMS-986016, IMP701, MGD012 или MGD013 (биспецифические антитела PD-1 и LAG-3). Анти-LAG-3 антитела также раскрыты в документах WO2008132601, EP2320940, WO19152574.

Антитела, направленные против BTLA, также известны в данной области, такие как hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7 или hu Mab4C7. Антитело TAB004 против BTLA в настоящее время проходит клинические испытания на субъектах с запущенными злокачественными новообразованиями. Анти-BTLA антитела также описаны в заявках WO 08076560, WO 10106051 (например, BTLA8.2), WO 11014438 (например, 4C7), WO 17096017 и WO 17144668 (например, 629.3).

Антитела, направленные против TIGIT, также известны в данной области, такие как BMS-986207 или AB154, BMS-986207 CPA.9.086, CHA.9.547.18, CPA.9.018, CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.057, CPA.9.059, CPA.9.083, CPA.9.089, CPA.9.093, CPA.9.101, CPA.9.103, CHA.9.536.1, CHA.9.536.3, CHA.9.536.4, CHA.9.536.5, CHA.9.536.6, CHA.9.536.7, CHA.9.536.8, CHA.9.560.1, CHA.9.560.3, CHA.9.560.4, CHA.9.560.5, CHA.9.560.6, CHA.9.560.7, CHA.9.560.8, CHA.9.546.1, CHA.9.547.1, CHA.9.547.2, CHA.9.547.3, CHA.9.547.4, CHA.9.547.6, CHA.9.547.7, CHA.9.547.8, CHA.9.547.9, CHA.9.547.13, CHA.9.541.1, CHA.9.541.3, CHA.9.541.4, CHA.9.541.5, CHA.9.541.6, CHA.9.541.7 и CHA.9.541.8, как раскрыто в заявке WO 19232484. Анти-TIGIT антитела также раскрыты в заявках WO16028656, WO16106302, WO16191643, WO17030823,

WO17037707, WO17053748, WO17152088, WO18033798, WO18102536, WO18102746, WO18160704, WO18200430, WO18204363, WO19023504, WO19062832, WO19129221, WO19129261, WO19137548, WO19152574, WO19154415, WO19168382 и WO19215728.

Антитела, направленные против CD160, также известны в данной области, такие как CL1-R2 CNCM I-3204, раскрытые в заявке WO 06015886, или другие, раскрытые в заявках WO 10006071, WO 10084158, WO 18077926.

В предпочтительном аспекте связывающий фрагмент бифункциональной молекулы представляет собой антитело, его фрагмент или производное или миметик антитела, специфичный в отношении PD-1, CTLA-4, BTLA, TIGIT, LAG3 и TIM3.

В другом конкретном аспекте мишенью является PD-1, а связывающий фрагмент бифункциональной молекулы представляет собой антитело, его фрагмент или производное или миметик антитела, специфичный к PD-1. Соответственно, в конкретном воплощении, связывающая группа, содержащаяся в бифункциональной молекуле согласно изобретению, представляет собой анти-TIM3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно человеческое, гуманизованное или химерное анти-TIM3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Предпочтительно связывающий фрагмент представляет собой антагонист PD-1. Следовательно, бифункциональная молекула сочетает в себе действие варианта или мутанта IL-7 на рецептор IL-7 и блокаду ингибирующего действия PD-1 и может оказывать синергетическое действие на активацию Т-клеток, особенно истощенных Т-клеток, в частности, на передачу сигналов посредством TCR.

В другом конкретном аспекте мишенью является CTLA-4, а связывающий фрагмент бифункциональной молекулы представляет собой антитело, его фрагмент или производное, или миметик антитела, специфичный к CTLA-4. Соответственно, в конкретном воплощении, связывающая группа, содержащаяся в бифункциональной молекуле согласно изобретению, представляет собой анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно человеческое, гуманизованное или химерное анти-CTLA-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Предпочтительно связывающий фрагмент представляет собой антагонист CTLA-4. Следовательно, бифункциональная молекула сочетает в себе действие варианта или мутанта IL-7 на рецептор IL-7 и блокаду ингибирующего действия CTLA-4 и может оказывать синергетическое действие на активацию Т-клеток, особенно истощенных Т-клеток, в частности, на передачу сигналов посредством TCR.

В другом конкретном аспекте мишенью является BTLA, а связывающий фрагмент бифункциональной молекулы представляет собой антитело, его фрагмент или

производное или миметик антитела, специфичный к BTLA. При этом, в конкретном воплощении, связывающий фрагмент, содержащийся в бифункциональной молекуле согласно изобретению, представляет собой анти-BTLA антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно человеческое, гуманизованное или химерное анти-BTLA антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Предпочтительно связывающий фрагмент представляет собой антагонист BTLA. Следовательно, бифункциональная молекула сочетает в себе действие варианта или мутанта IL-7 на рецептор IL-7 и блокаду ингибирующего действия BTLA и может оказывать синергетическое действие на активацию Т-клеток, особенно истощенных Т-клеток, более конкретно на передачу сигналов посредством TCR.

В другом конкретном аспекте мишенью является TIGIT, а связывающий фрагмент бифункциональной молекулы представляет собой антитело, его фрагмент или производное или миметик антитела, специфичный к TIGIT. Соответственно, в конкретном воплощении, связывающая группа, содержащаяся в бифункциональной молекуле по изобретению, представляет собой антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно человеческое, гуманизованное или химерное антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент. Предпочтительно связывающий фрагмент представляет собой антагонист TIGIT. Следовательно, бифункциональная молекула сочетает в себе действие варианта или мутанта IL-7 на рецептор IL-7 и блокаду ингибирующего действия TIGIT и может оказывать синергетическое действие на активацию Т-клеток, особенно истощенных Т-клеток. более конкретно на передачу сигналов посредством TCR.

В другом конкретном аспекте мишенью является LAG-3, а связывающий фрагмент бифункциональной молекулы представляет собой антитело, его фрагмент или производное или миметик антитела, специфичный к LAG-3. Соответственно, в конкретном воплощении, связывающий фрагмент, содержащийся в бифункциональной молекуле по изобретению, представляет собой антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно человеческое, гуманизованное или химерное антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающий фрагмент. Предпочтительно связывающий фрагмент представляет собой антагонист LAG-3. Следовательно, бифункциональная молекула сочетает в себе действие варианта или мутанта IL-7 на рецептор IL-7 и блокаду ингибирующего действия LAG-3 и может оказывать синергетическое действие на активацию Т-клеток, особенно истощенных Т-клеток, в частности, на передачу сигналов посредством TCR.

В другом конкретном аспекте мишенью является TIM3, а связывающий фрагмент

бифункциональной молекулы представляет собой антитело, его фрагмент или производное или миметик антитела, специфичный к TIM3. Соответственно, в конкретном воплощении, связывающий фрагмент, содержащийся в бифункциональной молекуле согласно изобретению, представляет собой антитело против TIM3 или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно человеческое, гуманизованное или химерное антитело против TIM3 или его антигенсвязывающий фрагмент. Предпочтительно связывающий фрагмент представляет собой антагонист TIM3. Следовательно, бифункциональная молекула сочетает в себе действие варианта или мутанта IL-7 на рецептор IL-7 и блокаду ингибирующего действия TIM3 и может оказывать синергетическое действие на активацию Т-клеток, особенно истощенных Т-клеток, более конкретно на передачу сигналов посредством TCR.

#### Fc-домен

В конкретном аспекте настоящего изобретения бифункциональная молекула содержит вариант или мутант IL-7, связывающий фрагмент и Fc-домен. Fc-домен может быть частью связывающего фрагмента, когда этот связывающий фрагмент представляет собой антитело, особенно иммуноглобулин IgG. Однако бифункциональная молекула может иметь другие структуры, включая Fc-домен. Например, она может содержать Fc-домен, связанный с производным антитела, таким как scFv или диатело.

Одним из подходов к улучшению фармакокинетики бифункциональной молекулы по изобретению является увеличение ее периода полувыведения из сыворотки, тем самым обеспечивая более высокие уровни в кровотоке, менее частое введение и сниженные дозы. Эта потребность может быть удовлетворена, например, включением Fc-домена или его части в бифункциональную молекулу по изобретению.

Далее, в одном воплощении бифункциональная молекула по изобретению, в частности, ее связывающий фрагмент, содержит Fc-домен или его часть.

В частности, связывающий фрагмент, согласно изобретению, содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина млекопитающего, еще более предпочтительно химерного иммуноглобулина человека или гуманизованного иммуноглобулина. Связывающий фрагмент может включать константную область иммуноглобулина или фрагмент, аналог, вариант, мутант или производное константной области. Как хорошо известно специалистам в данной области, выбор изоформ IgG константного домена тяжелой цепи зависит от того, требуются ли конкретные функции и от необходимости подходящего периода полувыведения *in vivo*.

В предпочтительных воплощениях Fc-домен или его фрагмент, содержащийся в связывающем фрагменте, включает константный домен тяжелой цепи, полученный из

тяжелой цепи иммуноглобулина человека, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или других классов иммуноглобулина. В еще одном аспекте константный домен человека выбран из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG2, IgG3 и IgG4. Предпочтительно связывающий фрагмент содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 или IgG4.

В одном воплощении связывающий фрагмент содержит укороченную Fc-область или фрагмент Fc-области. В таком фрагменте Fc константная область включает домен CH2 или CH3. В другом воплощении константная область включает домены CH2 и CH3. Альтернативно, константная область может включать всю или часть шарнирной области, домен CH2 и/или домен CH3. В некоторых воплощениях константная область содержит домен CH2 и/или CH3, полученный из тяжелой цепи IgG4 или IgG1 человека.

Предпочтительно константная область включает всю или часть шарнирной области. Шарнирная область может происходить из тяжелой цепи иммуноглобулина, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или других классов. Предпочтительно шарнирная область происходит от IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека. Более предпочтительно шарнирная область получена из тяжелой цепи человеческого или гуманизированного IgG1 или IgG4.

Шарнирная область IgG1 содержит три цистеина, два из которых вовлечены в образование дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями иммуноглобулина. Эти же цистеины обеспечивают эффективное и устойчивое образование дисульфидной связи между частями Fc. Следовательно, предпочтительная шарнирная область по настоящему изобретению происходит из IgG1, более предпочтительно из человеческого IgG1. В некоторых воплощениях изобретения первый цистеин в шарнирной области человеческого IgG1 мутирован на другую аминокислоту, предпочтительно серин.

Известно, что шарнирная область IgG4 неэффективно образует межцепочечные дисульфидные связи. Однако подходящая шарнирная область для настоящего изобретения может происходить из шарнирной области IgG4, предпочтительно содержащей мутацию, которая усиливает правильное образование дисульфидных связей между фрагментами, производными тяжелой цепи (Angal S, et al. (1993) *Mol. Immunol.*, 30:105-8). Более предпочтительно, шарнирная область происходит из тяжелой цепи человеческого IgG4.

Для бифункциональной молекулы, которая нацелена на молекулы клеточной поверхности, особенно на иммунные клетки, требуется отмена эффекторных функций. Сконструированные Fc-области также могут быть желательны либо для уменьшения, либо для увеличения эффекторной функции антитела.

В некоторых воплощениях аминокислотные модификации могут быть введены в Fc-область для получения варианта Fc-области. В некоторых воплощениях вариант Fc-

области обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями. Такие антитела могут быть полезны, например, в применениях, когда важен период полувыведения антитела *in vivo*, но некоторые эффекторные функции не нужны или вредны. В данной области известны многочисленные замены или делеции с измененной эффекторной функцией.

В одном воплощении константная область содержит мутацию, которая снижает сродство к рецептору Fc или снижает эффекторную функцию Fc. Например, константная область может содержать мутацию, которая устраняет сайт гликозилирования в константной области тяжелой цепи IgG. Предпочтительно домен CH2 содержит мутацию, которая устраняет сайт гликозилирования в домене CH2.

В конкретном аспекте Fc-домен модифицируют для увеличения связывания с FcRn, тем самым увеличивая период полувыведения бифункциональной молекулы. В другом аспекте или дополнительном аспекте Fc-домен модифицируют для уменьшения связывания с FcγR, тем самым уменьшая ADCC или CDC, или для увеличения связывания с FcγR, тем самым увеличивая ADCC или CDC.

Изменение аминокислот вблизи места соединения Fc-фрагмента и не-Fc-фрагмента может резко увеличить время полувыведения из сыворотки Fc-гибридного белка, как показано в заявке WO 200158957. Соответственно, место соединения белка или полипептида по настоящему изобретению может содержать изменения, которые, по сравнению с встречающимися в природе последовательностями тяжелой цепи иммуноглобулина и эритропоэтина, предпочтительно лежат в пределах около 10 аминокислот от точки соединения. Эти изменения аминокислот могут вызвать увеличение гидрофобности. В одном воплощении константная область происходит из последовательности IgG, в которой заменен С-концевой остаток лизина. Предпочтительно, чтобы С-концевой лизин последовательности IgG был заменен аминокислотой, не являющейся лизином, такой как аланин или лейцин, для дальнейшего увеличения периода полувыведения из сыворотки.

В одном воплощении константная область может содержать CH2 и/или CH3 имеет одну из мутаций, описанных в Таблице E ниже, или любую их комбинацию.

Таблица E. Подходящий сконструированный Fc-домен антитела человека. Нумерация остатков в константной области тяжелой цепи соответствует нумерации EU (Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969); [www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu\\_IGHGnber.html#refs](http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html#refs))

Сконструированный Fc	Изотип	Мутации	Связывание FcR/C1q	Эффекторная функция
hIgG1e1-Fc	IgG1	T250Q/M428L	Увеличенное	Увеличенный

			связывание FcRn	с	период полувыведения
hIgG1e2-Fc	IgG1	M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F	Увеличенное связывание FcRn	с	Увеличенный период полувыведения
hIgG1e3-Fc	IgG1	E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S	Сниженное связывание FcγRI	с	Сниженные ADCC и CDC
hIgG1e4-Fc	IgG1	E333A	Повышенное связывание FcγRIIIa	с	Повышенные ADCC и CDC
hIgG1e5-Fc	IgG1	S239D/A330L/I332E	Повышенное связывание FcγRIIIa	с	Повышенная ADCC
hIgG1e6-Fc	IgG1	P257I/Q311	Увеличенное связывание FcRn	с	Неизменный период полувыведения
hIgG1e7-Fc	IgG1	K326W/E333S	Повышенное связывание C1q	с	Повышенная CDC
hIgG1e9-Fc	IgG1	S239D/I332E/G236A	Повышенное соотношение FcγRIIIa/FcγRIIIb		Повышенный фагоцитоз макрофагов
hIgG1e9-Fc	IgG1	N297A	Сниженное связывание FcγRI	с	Сниженные ADCC и CDC
hIgG1e9-Fc	IgG1	LALA (L234A/L235A)	Сниженное связывание FcγRI	с	Сниженные ADCC и CDC
hIgG1e10-Fc	IgG1	N297A + YTE (N298A M252Y/S254T/T256E) +	Сниженное связывание FcγRI Увеличенное связывание FcRn	с	Сниженные ADCC и CDC Увеличенный период полувыведения
hIgG1e11-Fc	IgG1	K322A	Сниженное связывание C1q	с	Сниженное CDC
hIgG1e12-Fc	IgG1	N297A + YTE (N298A M252Y/S254T/T256E) + K444A +			Сниженные ADCC и CDC Увеличенный период полувыведения Отмена расщепления С-концевого лизина антитела
hIgG4e1-Fc	IgG4	S228P	-		Сниженная замена Fab-плечей
hIgG4e1-Fc	IgG4	LALA (L234A/L235A)	Увеличенное связывание FcRn	с	Увеличенный период полувыведения
hIgG4e2-Fc	IgG4	S228P+ YTE (S228P + M252Y/S254T/T256E)	- Увеличенное		Сниженная замена Fab-

			связывание с FcRn	плечей Увеличенный период полувыведения
hIgG4e3-Fc	IgG4	N297A + YTE (N298A M252Y/S254T/T256E) K444A	+ +	Сниженные ADCC и CDC Увеличенный период полувыведения Отмена расщепления С-концевого лизина антитела

В конкретном аспекте бифункциональная молекула, предпочтительно ее связывающий фрагмент, содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека или Fc-домен из IgG1, необязательно с заменой или комбинацией замен, выбранных из группы, состоящей из T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E, K322A и K444A, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из N297A, необязательно в сочетании с M252Y/S254T/T256E и L234A/L235A.

В другом аспекте связывающий фрагмент содержит константный домен тяжелой цепи IgG4 человека или Fc-домен из IgG4 человека, необязательно с заменой или комбинацией замен, выбранных из группы, состоящей из S228P; L234A/L235A, S228P + M252Y/S254T/T256E и K444A. Еще более предпочтительно бифункциональная молекула, предпочтительно ее связывающий фрагмент, содержит Fc-область IgG4 с S228P, которая стабилизирует IgG4.

Все подклассы IgG человека имеют С-концевой лизиновый остаток тяжелой цепи антитела (K444), который может отщепляться в кровотоке. Это расщепление в крови может нарушить или снизить биологическую активность бифункциональной молекулы за счет высвобождения связанного с IgG IL-7. Чтобы обойти эту проблему, аминокислота K444 в домене IgG может быть заменена аланином для уменьшения протеолитического расщепления, мутация, обычно используемая для антител. При этом, в одном воплощении, когда связывающий фрагмент представляет собой антитело, то антитело содержит по меньшей мере одну дополнительную аминокислотную замену, состоящую из K444A.

В одном воплощении, когда связывающий фрагмент представляет собой антитело, то антитело содержит дополнительный остаток цистеина в С-концевом домене IgG для создания дополнительной дисульфидной связи и потенциального ограничения гибкости

бифункциональной молекулы.

В одном воплощении связывающий фрагмент содержит антитело. В таком воплощении указанное антитело имеет константный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 39 или 52 и/или константный домен легкой цепи SEQ ID NO: 40, в частности константный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 39 или 52 и константный домен легкой цепи SEQ ID NO: 40, в частности такой, который раскрыт в таблице F ниже.

В предпочтительном воплощении связывающий фрагмент содержит анти-hPD1 антитело, имеющее константный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 52 и/или константный домен легкой цепи SEQ ID. 40, в частности константный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:52 и константный домен легкой цепи SEQ ID. 40.

Таблица F. Пример константного домена тяжелой цепи и константного домена легкой цепи, подходящих для гуманизированных антител по изобретению

Константный домен тяжелой цепи (IgG4m-S228P) SEQ ID NO: 39	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
Константный домен легкой цепи (CLkappa) SEQ ID NO: 40	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
Константный домен тяжелой цепи (IgG1m-N298A) SEQ ID NO: 52	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK

Пептидный линкер

В конкретном аспекте бифункциональная молекула по изобретению дополнительно содержит пептидный линкер, соединяющий связывающий фрагмент и IL-7m. Длина и гибкость пептидного линкера обычно достаточны для обеспечения того, чтобы IL-7m и связывающий фрагмент, связанные между собой линкером, имели достаточную свободу в пространстве для выполнения своих функций.

В одном из аспектов изобретения связывающий фрагмент предпочтительно связан с IL-7 через пептидный линкер. Используемый в данном описании термин «линкер» относится, по меньшей мере, к одной аминокислоте, которая связывает IL-7m и связывающий фрагмент. Такой линкер может быть полезен для предотвращения стерических затруднений. Длина линкера обычно составляет 3-44 аминокислотных

остатка. Предпочтительно линкер имеет 3-30 аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях линкер имеет 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30 аминокислотных остатков.

Линкерная последовательность может быть природной последовательностью или не встречающейся в природе последовательностью. При использовании в терапевтических целях линкер предпочтительно не является иммуногенным для объекта, которому вводят бифункциональную молекулу. Одной из полезных групп линкерных последовательностей являются линкеры, полученные из шарнирной области антител тяжелой цепи, как описано в заявках WO 9634103 и WO 9404678. Другими примерами являются полиаланиновые линкерные последовательности. Другими предпочтительными примерами линкерных последовательностей являются линкеры Gly/Ser различной длины, включая (Gly4Ser)<sub>4</sub>, (Gly4Ser)<sub>3</sub>, (Gly4Ser)<sub>2</sub>, Gly4Ser, Gly3Ser, Gly3, Gly2ser и (Gly3Ser2)<sub>3</sub>, в частности (Gly4Ser)<sub>3</sub>. Предпочтительно линкер выбирают из группы, состоящей из (Gly4Ser)<sub>4</sub>, (Gly4Ser)<sub>3</sub> и (Gly3Ser2)<sub>3</sub>. Еще более предпочтительно линкер представляет собой (GGGGS)<sub>3</sub>.

В одном воплощении линкер, содержащийся в бифункциональной молекуле, выбран из группы, состоящей из (Gly4Ser)<sub>4</sub>, (Gly4Ser)<sub>3</sub>, (Gly4Ser)<sub>2</sub>, Gly4Ser, Gly3Ser, Gly3, Gly2ser и (Gly3Ser2)<sub>3</sub>, предпочтительно представляет собой (Gly4Ser)<sub>3</sub>. Предпочтительно линкер выбирают из группы, состоящей из (Gly4Ser)<sub>4</sub>, (Gly4Ser)<sub>3</sub> и (Gly3Ser2)<sub>3</sub>.

#### Бифункциональная молекула

Изобретение, в частности, относится к бифункциональной молекуле, которая содержит IL-7 $\alpha$ , связывающий фрагмент, необязательно содержащую Fc-фрагмент, и необязательно пептидный линкер, такой как описанный выше.

В частности, бифункциональная молекула содержит или состоит из связывающего фрагмента и IL-7 $\alpha$ , как описано выше, причем связывающий фрагмент ковалентно конъюгирован (например, посредством генетического слияния или химического связывания) с IL-7, предпочтительно с помощью пептидного линкера, как описано выше.

В частности, конъюгация IL-7 $\alpha$  со связывающим фрагментом является ковалентной, прямой или нет (т.е. через линкер) и/или химической, ферментативной или генетической. Конъюгацию можно осуществлять любыми приемлемыми способами связывания, известными в данной области техники, принимая во внимание химическую природу связывающего фрагмента. Таким образом, связывание может осуществляться посредством одной или нескольких ковалентных, ионных, водородных, гидрофобных или ван-дер-ваальсовых связей, расщепляемых или нерасщепляемых в физиологической среде

или внутри клеток.

В частности, химическая конъюгация может быть осуществлена за счет открытой сульфгидрильной группы (Cys), присоединения аффинной метки (например, б-гистидиновой, флаговой метки, стрептококковой метки, SpyCatcher и т.д.) либо к связывающему фрагменту, либо к IL-7m, или путем включения неприродных аминокислот или соединения для клик-химической конъюгации.

В предпочтительном воплощении конъюгацию обеспечивают путем генетического слияния (т.е. путем экспрессии в подходящей системе конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей связывающий фрагмент, и IL-7 в виде генетического слияния).

В одном аспекте изобретение относится к слитому белку, включающему первую часть, содержащую цепь иммуноглобулина (Ig), в частности Fc-домен, и вторую часть, содержащую интерлейкин-7 (IL-7).

В одном воплощении изобретение относится к бифункциональной молекуле, содержащей связывающий фрагмент, слитый с IL-7m. В частности, в такой слитой молекуле связывающим фрагментом является антитело, где цепь антитела, например, легкая или тяжелая цепь, предпочтительно тяжелая цепь, еще более предпочтительно С-конец тяжелой или легкой цепи, представляет собой связанный с IL-7m, предпочтительно с N-концом IL-7m, необязательно с помощью пептидного линкера.

В конкретном аспекте изобретение относится к бифункциональной молекуле, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и IL-7m, где IL-7m связан с С-концом тяжелой цепи указанного антитела (например, С-концом константного домена тяжелой цепи), предпочтительно пептидным линкером.

Предпочтительно тяжелая цепь, предпочтительно С-конец тяжелой цепи антитела, генетически слита посредством гибкого линкера (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> с N-концом IL-7m. В месте объединения С-концевой лизиновый остаток тяжелой цепи антитела может быть мутирован в аланин для уменьшения протеолитического расщепления (т.е. мутация К444А).

В одном воплощении бифункциональная молекула по изобретению содержит одну или несколько молекул IL-7m. В частности, бифункциональная молекула по изобретению может содержать одну, две, три или четыре молекулы IL-7m. В частности, бифункциональная молекула может содержать только одну молекулу IL-7, связанную только с одной легкой цепью или тяжелой цепью антитела. Предпочтительно бифункциональная молекула может содержать только одну молекулу IL-7m, предпочтительно связанную только с одной тяжелой цепью антитела, более предпочтительно связанную с С-концом Fc-домена антитела. Бифункциональная молекула

может также содержать две молекулы IL-7m, связанные либо с легкой, либо с тяжелой цепью антитела. Бифункциональная молекула может также содержать две молекулы IL-7m, первая из которых связана с легкой цепью антитела, а вторая связана с тяжелой цепью антитела.

В одном воплощении бифункциональная молекула, согласно изобретению, содержит или состоит из:

(a) связывающего фрагмента, который специфически связывается с мишенью, экспрессируемой на поверхности иммунных клеток, такой как описанный выше, конъюгированного с

(b) IL-7m, который обладает по меньшей мере 75% идентичностью с человеческим IL-7 дикого типа (wth-IL-7), содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, такой IL-7 вариант, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную мутацию, которая i) снижает аффинность варианта IL-7 к рецептору IL-7 (IL-7R) по сравнению с аффинностью wth-IL-7 к IL-7R, и ii) улучшает фармакокинетику бифункциональной молекулы, содержащей вариант IL-7, по сравнению с бифункциональной молекулой, содержащей wth-IL-7.

В частности, по меньшей мере одна аминокислотная мутация описана выше в абзаце «мутанты IL-7».

Предпочтительно бифункциональная молекула по изобретению содержит или состоит из:

(a) связывающего фрагмента, который специфически связывается с мишенью, экспрессируемой на поверхности иммунных клеток, такой как описанный выше, конъюгированного с

(b) IL-7m, который обладает по меньшей мере 75% идентичностью с человеческим IL-7 дикого типа (wth-IL-7), содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, причем такой IL-7 вариант содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из: (i) C2S-C141S и C47S-C92S, C2S-C141S и C34S-C129S или C47S-C92S и C34S-C129S, (ii) W142H, W142F или W142Y, (iii) D74E, D74Q или D74N, предпочтительно D74E или D74Q; iv) Q11E, Y12F, M17L, Q22E и/или K81R; или любой их комбинации.

Предпочтительно такие мутации i) снижают аффинность варианта IL-7 к рецептору IL-7 (IL-7R) по сравнению с аффинностью wth-IL-7 к IL-7R, и ii) улучшают фармакокинетику бифункциональной молекулы, содержащей вариант IL-7 по сравнению с бифункциональной молекулой, содержащей wth-IL-7. Более предпочтительно такие мутации i) снижают аффинность варианта IL-7 к рецептору IL-7 (IL-7R) по сравнению с

аффинностью wth-IL-7 к IL-7R, ii) сохраняют способность активировать IL-7R. 7P и iii) улучшают фармакокинетику бифункциональной молекулы, содержащей вариант IL-7, по сравнению с бифункциональной молекулой, содержащей wth-IL-7.

В конкретном аспекте мишенью, экспрессируемой на поверхности иммунных клеток, является фактор истощения, экспрессируемый на поверхности Т-клеток.

Предпочтительно связывающий фрагмент представляет собой антитело или его фрагмент антитела.

Предпочтительно связывающий фрагмент конъюгирован с IL-7m путем генетического слияния, и бифункциональная молекула необязательно содержит по меньшей мере один пептидный линкер, соединяющий N-конец IL-7m с C-концом тяжелой цепи антитела, причем пептидный линкер предпочтительно выбирают из группы, состоящей из (GGGGGS)<sub>3</sub>, (GGGGGS)<sub>4</sub>, (GGGGGS)<sub>2</sub>, GGGGS, GGGS, GGG, GGS и (GGGS)<sub>3</sub>, еще более предпочтительно линкер представляет собой (GGGGGS)<sub>3</sub>.

Предпочтительно бифункциональная молекула по изобретению представляет собой слитый белок, который содержит или состоит из:

(a) антитела или его фрагмента антитела, как описано выше, которое специфически связывается с мишенью, экспрессируемой на поверхности иммунных клеток, предпочтительно Т-клеток,

(b) IL-7m, который демонстрирует по меньшей мере 75% идентичности с человеческим IL-7 дикого типа (wth-IL-7), содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, причем такой IL-7 вариант включает аминокислотные замены (i) C2S-C141S и C47S-C92S, C2S-C141S и C34S-C129S или C47S-C92S и C34S-C129S, (ii) W142H, W142F или W142Y, (iii) D74E, D74Q или D74N, предпочтительно D74E или D74Q; iv) Q11E, Y12F, M17L, Q22E и/или K81R; или любую их комбинацию, и

(c) необязательно пептидного линкера, выбранного из группы, состоящей из (GGGGGS)<sub>3</sub>, (GGGGGS)<sub>4</sub>, (GGGGGS)<sub>2</sub>, GGGGS, GGGS, GGG, GGS и (GGGS)<sub>3</sub>, предпочтительно (GGGGGS)<sub>3</sub>.

Предпочтительно антитело представляет собой антитело, направленное против мишени, выбранной из группы, состоящей из PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 и CD8, предпочтительно PD-1, TIM3, CD244, LAG-3, BTLA, TIGIT и CD160.

Предпочтительно антитело или его фрагмент антитела имеют Fc-домен из IgG1 или IgG4.

В одном аспекте антитело или его фрагмент антитела имеют Fc-домен из IgG1, необязательно с заменой или комбинацией замен, выбранных из группы, состоящей из K444A, T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E и K322A, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из N297A, необязательно в комбинации с M252Y/S254T/T256E и L234A/L235, еще более предпочтительно Fc-домен из IgG1, имеет мутацию N297A, как описано выше.

Неожиданно авторы изобретения обнаружили, что бифункциональные молекулы, имеющие константный домен тяжелой цепи IgG1, обладают улучшенной активностью вариантов IL-7 (сигнал pStat5, синергический эффект и связывание CD127) по сравнению с той же молекулой с константным доменом тяжелой цепи IgG4. Это улучшение характерно для мутантов IL-7 и не наблюдалось для IL-7 дикого типа. Кроме того, использование длинного линкера, такого как (GGGGS)<sub>3</sub>, между антителом и IL-7 максимизирует активность вариантов IL-7 (сигнал pStat5 и связывание с CD127).

Соответственно, настоящее изобретение более конкретно относится к бифункциональной молекуле, в которой антитело или его фрагмент антитела, как описано выше, специфически связывается с мишенью, экспрессируемой на поверхности иммунных клеток, предпочтительно Т-клеток, более предпочтительно с мишенью, выбранной из группы состоящий из PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 и CD8, предпочтительно из PD-1, TIM3, CD244, LAG-3, BTLA, TIGIT и CD160; причем антитело или фрагмент антитела имеют Fc-домен из IgG1, необязательно с заменой или комбинацией замен, выбранных из группы, состоящей из T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E; K322A и K444A, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из N297A, необязательно в комбинации с M252Y/S254T/T256E и L234A/L235, еще более предпочтительно Fc-домен из IgG1 имеет мутацию N297A, как описано выше. Предпочтительно антитело или его фрагмент связаны с IL-7 или его вариантом с помощью линкера, выбранного из группы, состоящей из (GGGGS)<sub>3</sub>, (GGGGS)<sub>4</sub> и (GGGS)<sub>3</sub>, более предпочтительно с помощью (GGGGS)<sub>3</sub>. Предпочтительно вариант IL-7 содержит группу аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из C2S-C141S и C47S-C92S, C2S-C141S и C34S-C129S,

C47S-C92S и C34S-C129S, W142H, W142F, W142Y, D74E, D74Q и D74N. Более предпочтительно вариант IL-7 содержит группу аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из C2S-C141S и C47S-C92S, C2S-C141S и C34S-C129S, W142H, W142F, W142Y, D74E, D74Q и D74N. Еще более предпочтительно вариант IL-7 содержит группу аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из C2S-C141S и C47S-C92S, C2S-C141S и C34S-C129S, W142H и D74E.

В другом аспекте антитело или его фрагмент антитела имеют Fc-домен из IgG4, необязательно с заменой или комбинацией замен, выбранных из группы, состоящей из K444A, S228P; L234A/L235A, S228P + M252Y/S254T/T256E, еще более предпочтительно Fc-домен из IgG4 имеет мутацию S228P, как описано выше.

В конкретном аспекте бифункциональная молекула по изобретению представляет собой слитый белок, который содержит или состоит из:

(a) антитела или фрагмента этого антитела, как описано выше, которое специфически связывается с мишенью, экспрессируемой на поверхности иммунных клеток, предпочтительно Т-клеток, более предпочтительно мишенью, выбранной из группы, состоящей из PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 and CD8, предпочтительно из PD-1, TIM3, CD244, LAG-3, BTLA, TIGIT и CD160;

(b) IL-7m, который демонстрирует по меньшей мере 75% идентичности с человеческим IL-7 дикого типа (wth-IL-7), содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, причем такой IL-7 вариант включает аминокислотные замены (i) C2S-C141S и C47S-C92S, C2S-C141S и C34S-C129S или C47S-C92S и C34S-C129S, (ii) W142H, W142F или W142Y, (iii) D74E, D74Q или D74N, предпочтительно D74E или D74Q; iv) Q11E, Y12F, M17L, Q22E и/или K81R; или любую их комбинацию, и

(c) необязательно пептидного линкера, выбранного из группы, состоящей из (GGGGS)<sub>3</sub>, (GGGGS)<sub>4</sub>, (GGGGS)<sub>2</sub>, GGGGS, GGG, GGS и (GGGS)<sub>3</sub>, предпочтительно (GGGGS)<sub>3</sub>.

В предпочтительном воплощении этого аспекта антитело или его фрагмент антитела имеют Fc-домен из IgG1, необязательно с заменой или комбинацией замен, выбранных из группы, состоящей из T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E; K322A и K444A, предпочтительно выбранных из группы,

состоящей из N297A, необязательно в комбинации с M252Y/S254T/T256E и L234A/L235, еще более предпочтительно Fc-домен из IgG1 имеет мутацию N297A, как описано выше.

Альтернативно, бифункциональная молекула, согласно изобретению, представляет собой слитый белок, который содержит или состоит из:

(a) антитела или фрагмента этого антитела, как описано выше, которое специфически связывается с мишенью, экспрессируемой на поверхности иммунных клеток, предпочтительно Т-клеток, более предпочтительно мишенью, выбранной из группы, состоящей из PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 и CD8, предпочтительно из PD-1, TIM3, CD244, LAG-3, BTLA, TIGIT и CD160;

(b) IL-7m, который демонстрирует по меньшей мере 75% идентичности с человеческим IL-7 дикого типа (wth-IL-7), содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, причем такой вариант IL-7 включает аминокислотную замену W142H, W142F или W142Y, предпочтительно W142H; и

(c) необязательно пептидного линкера, выбранного из группы, состоящей из (GGGGS)<sub>3</sub>, (GGGGS)<sub>4</sub>, (GGGGS)<sub>2</sub>, GGGGS, GGGS, GGG, GGS и (GGGS)<sub>3</sub>, предпочтительно (GGGGS)<sub>3</sub>.

Предпочтительно антитело или его фрагмент антитела имеют Fc-домен из IgG1 или IgG4, необязательно с заменами, как подробно описано выше.

В предпочтительном воплощении антитело или фрагмент антитела имеют Fc-домен из IgG1, необязательно с заменой или комбинацией замен, выбранных из группы, состоящей из T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E; K322A и K444A, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из N297A, необязательно в комбинации с M252Y/S254T/T256E и L234A/L235, еще более предпочтительно Fc-домен из IgG1 имеет мутацию N297A, как описано выше.

Альтернативно, бифункциональная молекула, согласно изобретению, содержит или состоит из:

(a) антитела или фрагмента этого антитела, как описано выше, которое специфически связывается с мишенью, экспрессируемой на поверхности иммунных клеток, предпочтительно Т-клеток, более предпочтительно мишенью, выбранной из группы, состоящей из PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS,

CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 и CD8, предпочтительно из PD-1, TIM3, CD244, LAG-3, BTLA, TIGIT и CD160;

(b) IL-7m, который демонстрирует по меньшей мере 75% идентичности с человеческим IL-7 дикого типа (wth-IL-7), содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, причем такой IL-7 вариант включает аминокислотную замену D74E, D74Q или D74N, предпочтительно D74E; и

(c) необязательно пептидного линкера, выбранного из группы, состоящей из (GGGGS)<sub>3</sub>, (GGGGS)<sub>4</sub>, (GGGGS)<sub>2</sub>, GGGGS, GGGS, GGG, GGS и (GGGS)<sub>3</sub>, предпочтительно (GGGGS)<sub>3</sub>.

Предпочтительно антитело или его фрагмент антитела имеют Fc-домен из IgG1 или IgG4, необязательно с заменами, как подробно описано выше.

В предпочтительном воплощении антитело или фрагмент антитела имеют Fc-домен из IgG1, необязательно с заменой или комбинацией замен, выбранных из группы, состоящей из T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E; K322A и K444A, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из N297A, необязательно в комбинации с M252Y/S254T/T256E и L234A/L235, еще более предпочтительно Fc-домен из IgG1 имеет мутацию N297A, как описано выше.

Альтернативно, бифункциональная молекула, согласно изобретению, содержит или состоит из:

(a) анти-PD1 антитела или фрагмента такого антитела, которое специфически связывает PD-1,

(b) IL-7m, обладающего по меньшей мере 75% идентичности с человеческим IL-7 дикого типа (wth-IL-7), содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, причем такой вариант IL-7 содержит аминокислотную замену D74E, W142H и/или C2S-C141S + C47S-C92S, и

(c) необязательно пептидного линкера, выбранного из группы, состоящей из (GGGGS)<sub>3</sub>, (GGGGS)<sub>4</sub>, (GGGGS)<sub>2</sub>, GGGGS, GGGS, GGG, GGS и (GGGS)<sub>3</sub>, предпочтительно (GGGGS)<sub>3</sub>.

Предпочтительно антитело или его фрагмент антитела имеют Fc-домен из IgG1 или IgG4, необязательно с заменами, как подробно описано выше.

Предпочтительно С-конец тяжелой цепи антитела генетически слит посредством

гибкого линкера, предпочтительно (Gly4Ser)<sub>3</sub>, с N-концом IL-7m. В месте соединения C-концевой лизиновый остаток (т.е. K444) тяжелой цепи антитела может быть заменен аланином для снижения протеолитического расщепления.

Необязательно бифункциональная молекула может дополнительно содержать дополнительный фрагмент, такой как другие цитокины или другие связывающие фрагменты.

В конкретном аспекте молекула имеет димерный Fc-домен, с которым связаны один вариант IL-7 и один антигенсвязывающий домен. В другом конкретном аспекте молекула имеет димерный Fc-домен, с которым связаны один вариант IL-7 и два антигенсвязывающих домена. Антигенсвязывающий домен связывается с любой мишенью, специфически экспрессируемой на поверхности иммунных клеток, как описано в настоящем изобретении. Более конкретно, мишень может быть выбрана из группы, состоящей из PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 и CD8, более конкретно из группы, состоящей из PD-1, CTLA-4, BTLA, TIGIT, LAG3 и TIM3. В очень конкретном воплощении антигенсвязывающий домен связывается с PD-1.

В конкретном воплощении молекула содержит первый мономер, содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный с первой цепью Fc, необязательно через пептидный линкер, причем указанная первая Fc-цепь ковалентно связана с вариантом IL-7, необязательно через пептидный линкер, и второй мономер, содержащий комплементарную вторую Fc-цепь, предпочтительно лишенную антигенсвязывающего домена и/или варианта IL-7, при этом указанные первая и вторая цепи Fc образуют димерный Fc-домен. Необязательно, димерный Fc-домен представляет собой гетеродимерный Fc-домен. Более конкретно, молекула содержит первый мономер, содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный с N-концом первой гетеродимерной Fc-цепи, необязательно через пептидный линкер, при этом указанная первая гетеродимерная Fc-цепь ковалентно связана своим C-концом с вариантом IL-7, необязательно через пептидный линкер, и второй мономер, содержащий комплементарную вторую гетеродимерную Fc-цепь, лишенную антигенсвязывающего домена. Необязательно указанный второй мономер содержит комплементарную вторую гетеродимерную Fc-цепь, не содержащую вариант IL-7, предпочтительно не содержащую какой-либо другой молекулы. Необязательно указанный второй мономер содержит комплементарную вторую гетеродимерную Fc-цепь, ковалентно связанную с вариантом IL-7, необязательно на N-конце C-конца цепи Fc, необязательно через пептидный линкер.

Еще более конкретно, молекула содержит первый мономер, содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный через С-конец с N-концом первой гетеродимерной Fc-цепи, необязательно через пептидный линкер, при этом указанная первая гетеродимерная Fc-цепь ковалентно связана своим С-концом с N-концом варианта IL-7, необязательно через пептидный линкер, и второй мономер, содержащий комплементарную вторую гетеродимерную Fc-цепь, лишенную антигенсвязывающего домена и варианта IL-7, предпочтительно лишенную любой другой молекулы. Такая молекула показана, например, как «конструкция 3» на фиг. 17.

В другом конкретном воплощении молекула содержит первый мономер, содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный через его С-конец с N-концом первой гетеродимерной Fc-цепи, необязательно через пептидный линкер, при этом указанная первая гетеродимерная Fc-цепь ковалентно связана через С-конец с N-концом варианта IL-7, необязательно через пептидный линкер, и второй мономер, содержащий комплементарную вторую гетеродимерную Fc-цепь, лишенную антигенсвязывающего домена и ковалентно связанную с вариантом IL-7, необязательно через N-конец с С-концом Fc-цепи, необязательно через пептидный линкер. Такая молекула показана, например, как «конструкция 4» на фиг. 17.

Необязательно комплементарная вторая гетеродимерная Fc-цепь ковалентно связана своим С-концом с N-концом варианта IL-7, необязательно через пептидный линкер.

В дополнительном аспекте молекула содержит первый мономер, содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный с первой цепью Fc, необязательно через пептидный линкер, причем указанная первая Fc-цепь необязательно не содержит варианта IL-7, и второй мономер, содержащий комплементарная вторая Fc-цепь, лишенная антигенсвязывающего домена, причем указанная вторая Fc-цепь ковалентно связана с вариантом IL-7, необязательно через пептидный линкер, причем указанные первая и вторая цепи Fc образуют димерный Fc-домен. Необязательно, димерный Fc-домен представляет собой гетеродимерный Fc-домен. Более конкретно, молекула содержит первый мономер, содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный с N-концом первой гетеродимерной Fc-цепи, необязательно через пептидный линкер, причем указанная первая гетеродимерная Fc-цепь не содержит варианта IL-7, и второй мономер, содержащий комплементарную вторую гетеродимерную Fc-цепь, лишенную антигенсвязывающего домена, при этом указанная вторая гетеродимерная Fc-цепь ковалентно связана через С-конец с вариантом IL-7, необязательно через пептидный линкер. Еще более конкретно, молекула содержит первый мономер, содержащий

антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный через С-конец с N-концом первой гетеродимерной Fc-цепи, необязательно через пептидный линкер, причем указанная первая гетеродимерная Fc-цепь не содержит IL-7, и второй мономер, содержащий комплементарную вторую гетеродимерную Fc-цепь, лишенную антигенсвязывающего домена, причем указанная вторая гетеродимерная Fc-цепь ковалентно связана через С-конец с N-концом варианта IL-7, необязательно через пептидный линкер.

В другом конкретном аспекте молекула содержит первый мономер, содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный с первой цепью Fc, необязательно через пептидный линкер, причем указанная первая Fc-цепь ковалентно связана с вариантом IL-7, необязательно через пептидный линкер, и второй мономер, содержащий комплементарную вторую Fc-цепь, лишенную варианта IL-7 и связанную с антигенсвязывающим доменом, при этом указанные первая и вторая цепи Fc образуют димерный Fc-домен. Такая молекула показана, например, как «конструкция 2» на фиг. 17. Необязательно, димерный Fc-домен представляет собой гетеродимерный Fc-домен. Более конкретно, молекула содержит первый мономер, содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный с N-концом первой гетеродимерной Fc-цепи, необязательно через пептидный линкер, при этом указанная первая гетеродимерная Fc-цепь ковалентно связана через свой С-конец с вариантом IL-7, необязательно через пептидный линкер, и второй мономер, содержащий комплементарную вторую гетеродимерную Fc-цепь, лишенную варианта IL-7, и содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный с N-концом второй гетеродимерной Fc-цепи необязательно через пептидный линкер. Более конкретно, молекула содержит первый мономер, содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный через С-конец с N-концом первой гетеродимерной Fc-цепи, необязательно через пептидный линкер, причем указанная первая гетеродимерная Fc-цепь ковалентно связана через свой С-конец с N-концом варианта IL-7, необязательно через пептидный линкер, и второй мономер, содержащий комплементарную вторую гетеродимерную Fc-цепь, не содержащую вариант IL-7, и содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный через С-конец с N-концом указанной второй гетеродимерной Fc-цепи, необязательно, через пептидный линкер.

Линкер, если присутствует, может быть выбран среди линкеров, раскрытых в настоящем описании.

Предпочтительно каждый из двух мономеров содержит Fc-цепь, причем цепи Fc способны образовывать димерный Fc-домен.

В одном аспекте димерный Fc-гибридный белок представляет собой гомодимерный

Fc-гибридный белок. В другом аспекте димерный Fc-гибридный белок представляет собой гетеродимерный Fc-гибридный белок.

Более конкретно, Fc-домен представляет собой гетеродимерный Fc-домен. Гетеродимерные Fc-домены получают путем изменения аминокислотной последовательности каждого мономера. Гетеродимерные Fc-домены основаны на аминокислотных вариантах в константных областях, которые различны в каждой цепи, чтобы стимулировать образование гетеродимеров и/или облегчить очистку гетеродимеров по сравнению с гомодимерами. Существует ряд механизмов, которые можно использовать для получения гетеродимеров по настоящему изобретению. Кроме того, как будет понятно специалистам в данной области, эти механизмы можно комбинировать для обеспечения высокой степени гетеродимеризации. Таким образом, варианты аминокислот, которые приводят к образованию гетеродимеров, называются «вариантами гетеродимеризации». Варианты гетеродимеризации могут включать стерические варианты (например, варианты «выступы-во-впадину» или «смещенные», описанные ниже, и варианты «пар заряда», описанные ниже), а также « $\rho$ 1-варианты», которые позволяют очищать гомодимеры от гетеродимеров. Заявка WO 2014/145806, полностью включенная в настоящее описание в качестве ссылки, раскрывает полезные механизмы гетеродимеризации, включая «выступы-во-впадины», «электростатическое взаимодействие» или «пары заряда»,  $\rho$ 1-варианты и общие дополнительные варианты Fc. См. также Ridgway et al., Protein Engineering 9(7):617 (1996); Atwell et al., J. Mol. Biol. 1997 270:26; Патент США № 8216805, Merchant et al., Nature Biotech. 16:677 (1998), все из которых полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки. По поводу «электростатического взаимодействия» см. Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285(25): 19637 (2010) (полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки).  $\rho$ 1-варианты см. в заявке US 2012/0149876, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Далее, в предпочтительном аспекте, гетеродимерный Fc-домен содержит первую Fc-цепь и комплементарную вторую Fc-цепь на основе технологии «выступы-во-впадины». Например, первая Fc-цепь представляет собой «выступ» или К-цепь, что означает, что она содержит замену, характеризующую цепь с выступом, а вторая Fc-цепь представляет собой «впадину» или Н-цепь, что означает, что она содержит замену, характеризующую цепь со впадиной. И наоборот, первая Fc-цепь представляет собой «впадину» или Н-цепь, что означает, что она содержит замену, характеризующую цепь со впадиной, а вторая Fc-цепь представляет собой «выступ» или К-цепь, что означает, что она содержит замену, характеризующую цепь с выступом. В предпочтительном аспекте

первая Fc-цепь представляет собой «впадину» или H-цепь, а вторая Fc-цепь представляет собой «выступ» или K-цепь.

Примеры структур бифункциональных молекул согласно изобретению представлены на фиг. 17.

Необязательно, гетеродимерный Fc-домен может содержать одну гетеродимерную Fc-цепь, содержащую замены, как показано в следующей таблице, и другую гетеродимерную Fc-цепь, содержащую замены, как показано в таблице ниже.

Таблица G (нумерация согласно индексу EU)

Fc-цепь, имеющая следующие замены (цепь с впадиной или H-цепь)	Комплементарная Fc-цепь, имеющая следующие замены (цепь с выступом или K-цепь)
D221E/P228E/L368E	D221R/P228R/K409R
C220E/P228E/368E	C220R/E224R/P228R/K409R
S364K/E357Q	L368D/K370S
L368D/K370S	S364K
L368E/K370S	S364K
T411T/E360E/Q362E	D401K
L368D/K370S	S364K/E357L
K370S	S364K/E357Q
T366S/L368A/Y407V	T366W
T366S/L368A/Y407V/Y349C	T366W/S354C
F368D/K370S	S364K
F368D/K370S	S364K/E357F
F368D/K370S	S364K/E357Q
T411E/K360E/Q362E	D401K
F368E/K370S	S364K
K370S	S364K/E357Q
T366S/F368A/Y407V	T366W
T366S/L368A/Y407V/Y349C	T366W/S354C

В предпочтительном аспекте первая Fc-цепь представляет собой «впадину» или H-цепь и содержит замены T366S/L368A/Y407V/Y349C, а вторая Fc-цепь представляет собой «выступ» или K-цепь и содержит замены T366W/S354C.

Необязательно, Fc-цепь может дополнительно содержать дополнительные замены.

В одном аспекте бифункциональная молекула, согласно изобретению, содержит гетеродимер Fc-доменов, который включает модификации «выступ-во-впадину», такие как описанные выше. Предпочтительно такие Fc-домены представляют собой Fc-домен из IgG1 или IgG4, как описано выше, еще более предпочтительно Fc-домен из IgG1, содержащий мутацию N297A, как описано выше.

Например, первая Fc-цепь представляет собой «впадину» или H-цепь и содержит замены T366S/L368A/Y407V/Y349C и N297A, а вторая Fc-цепь представляет собой «выступ» или K-цепь и содержит замены T366W/S354C и N297A. В частности, вторая Fc-цепь может содержать или состоять из SEQ ID NO: 75 и/или первая Fc-цепь может содержать или состоять из SEQ ID NO: 77.

Более конкретно, вариант IL7 по изобретению связан с цепью с выступом и/или цепью с впадиной гетеродимерного Fc-домена. Таким образом, бифункциональная молекула по изобретению может содержать i) один вариант IL7, связанный либо с цепью с впадиной, либо с цепью с выступом Fc-домена, или ii) два варианта IL7, один связан с цепью с впадиной и один связан с цепью с выступом Fc-домена. Предпочтительно бифункциональная молекула по изобретению содержит один вариант IL7, связанный с цепью с впадиной Fc-домена.

В первом аспекте бифункциональная молекула содержит вариант IL7, связанный с С-концом или N-концом Fc-домена с цепью с выступом. Необязательно, такой Fc-домен не связан с антигенсвязывающим доменом. Альтернативно, такой Fc-домен связан с антигенсвязывающим доменом.

Во втором аспекте бифункциональная молекула содержит вариант IL7, связанный с С-концом Fc-домена с цепью с впадиной. Предпочтительно такой Fc-домен связан с антигенсвязывающим доменом на его N-конце.

Необязательно, бифункциональная молекула содержит один вариант IL7, связанный с С-концом цепи с впадиной Fc-домена, при этом бифункциональная молекула содержит только один антигенсвязывающий домен, связанный с N-концом цепи с впадиной Fc-домена. В таком аспекте домен цепи с выступом не содержит варианта IL7 и содержит или не содержит антигенсвязывающий домен.

Более конкретно, бифункциональная молекула содержит один вариант IL7, связанный с С-концом цепи с впадиной Fc-домена, предпочтительно через свой N-конец, необязательно с помощью линкера, при этом бифункциональная молекула содержит только один антигенсвязывающий домен, связанный на N-конце цепи с впадиной Fc-домена, и цепь с выступом, лишенный варианта IL7 и антигенсвязывающего домена.

Соответственно, объект настоящего изобретения относится к полипептиду, содержащему от N-конца к С-концу антигенсвязывающий домен (или, по меньшей мере, его часть, соответствующую тяжелой цепи), Fc-цепь (Fc-цепь с выступом или впадиной), предпочтительно цепь с впадиной Fc-домена и вариант IL7. Комплементарная цепь содержит комплементарную Fc-цепь, лишенную варианта IL7 и антигенсвязывающего домена, предпочтительно цепь с выступом Fc-домена.

В другом конкретном аспекте бифункциональная молекула содержит один вариант IL7, связанный с С-концом цепи с впадиной Fc-домена своим N-концом, необязательно с помощью линкера, при этом бифункциональная молекула содержит антигенсвязывающий домен, связанный на N-конце цепи с впадиной Fc-домена, и цепь с выступом, лишенную варианта IL7 и содержащую антигенсвязывающий домен, связанный с N-концом цепи с

выступом своим С-концом.

Соответственно, объект настоящего изобретения относится к полипептиду, содержащему от N-конца к С-концу антигенсвязывающий домен (или, по меньшей мере, его часть, соответствующую тяжелой цепи), Fc-цепь (Fc-цепь с выступом или впадиной), предпочтительно цепь с впадиной Fc-домена и вариант IL7. Комплементарная цепь содержит от N-конца к С-концу антигенсвязывающий домен (или, по меньшей мере, его часть, соответствующую тяжелой цепи) и комплементарную Fc-цепь, не содержащую вариант IL7, предпочтительно цепь с выступом Fc-домена.

В другом конкретном аспекте бифункциональная молекула содержит один вариант IL7, связанный с N- или С-концом цепи с выступом, необязательно с помощью линкера, и бифункциональная молекула содержит антигенсвязывающий домен, связанный с N-концом цепи с впадиной Fc-домена своим С-концом, причем цепь с впадиной лишена варианта IL7.

Необязательно антигенсвязывающий домен может представлять собой домен Fab, Fab', одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFV) или однодоменное антитело (sdAb). Антигенсвязывающий домен предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL). Когда антигенсвязывающий домен представляет собой Fab или Fab', молекула дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи и легкой цепи (т.е. CH и CL).

Когда антигенсвязывающий домен представляет собой Fab или Fab', бифункциональная молекула может дополнительно содержать вариант IL-7, связанный с С-концом домена VL антигенсвязывающего домена.

Бифункциональная молекула по изобретению может содержать один или два антигенсвязывающих домена. Необязательно, один антигенсвязывающий домен может быть связан с N-концом Fc-цепи с выступом, а один антигенсвязывающий домен может быть связан с N-концом Fc-цепи с впадиной. Альтернативно, один антигенсвязывающий домен связан с N-концом либо Fc-цепи с выступом, либо Fc-цепи с впадиной. Предпочтительно вариант IL-7 связан с Fc-цепью, связанной с антигенсвязывающим доменом. В конкретном аспекте антигенсвязывающий домен нацелен на PD-1.

Например, антигенсвязывающий домен, нацеленный на PD-1, может быть получен из анти-PD1 антитела, выбранного из группы, состоящей из пембролизумаба (также известного как Keytruda lambrolizumab, MK-3475), ниволумаба (Opdivo, MDX-1106, BMS-936558, ONO-4538), пидилизумаба (CT-011), цемиплимаба (Libtayo), камрелизумаба, AUNP12, AMP-224, AGEN-2034, BGB-A317 (тислейзумаба), PDR001 (спартализумаба), MK-3477, SCH-900475, PF-06801591, JNJ-63723283, генолимзумаба (CBT-501), LZM-009,

BCD-100, SHR-1201, BAT-1306, AK-103 (HX-008), MEDI-0680 (также известного как AMP- 514) MEDI0608, JS001 (см. Si-Yang Liu et al., J. Hematol. Oncol.10:136 (2017)), BI-754091, CBT-501, INCSHR1210 (также известного как SHR-1210), TSR-042 (также известного как ANB011), GLS-010 (также известного как WBP3055), AM- 0001 (Armo), STI-1110 (см. WO 2014/194302), AGEN2034 (см. WO 2017/040790), MGA012 (см. WO 2017/19846) или IBI308 (см. WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/132825 и WO 2017/133540), моноклональных антител 5C4, 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 и 5F4, описанных в заявке WO 2006/121168. Также известны бифункциональные или биспецифические молекулы, нацеленные на PD-1, такие как RG7769 (Roche), XmAb20717 (Xencor), MEDI5752 (AstraZeneca), FS118 (F-star), SL-279252 (Takeda) и XmAb23104 (Xencor). В частности, антигенсвязывающий домен, нацеленный на PD-1, содержит 6 CDR или VH и VL анти-PD1 антитела, выбранного из этого списка. Такой антигенсвязывающий домен может, в частности, представлять собой домен Fab или svFc, полученный из этого антитела. В предпочтительном аспекте антигенсвязывающий домен, нацеленный на PD-1, содержит 6 CDR или VH и VL анти-PD1 антитела, выбранного из пембролизумаба (также известного как Китруда ламбролизумаб, МК-3475) или ниволумаба (Opdivo, MDX-1106, BMS-936558, ONO-4538) и может быть, например, доменом Fab или scFc.

В конкретном аспекте антигенсвязывающий домен, нацеленный на PD-1, получен из антитела, раскрытого в заявке WO2020127366, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

При этом антигенсвязывающий домен содержит:

- (i) Вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и
- (ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий LCDR1, LCDR2 и LCDR3,

причем:

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положения 3 SEQ ID NO: 51;

- CDR2 тяжелой цепи (HCDR1) содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положения 16 SEQ ID NO: 53;

- CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) содержит или состоит из аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 54, где X1 представляет собой D или E, а X2 выбран из группы, состоящей из T, H, A, Y, N, E и S, предпочтительно из группы, состоящей из H, A, Y, N, E; необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положений 2, 3, 7 и 8 SEQ ID NO: 54;

- CDR1 легкой цепи (LCDR1) содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63, где X представляет собой G или T, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положений 5, 6, 10, 11 и 16 SEQ ID NO: 63;

- CDR2 легкой цепи (LCDR2) содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации; и

- CDR3 легкой цепи (LCDR3) содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положений 1, 4 и 6 SEQ ID NO: 16.

В одном аспекте антигенсвязывающий домен содержит:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и

(ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий LCDR1, LCDR2 и LCDR3,

где:

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положения 3 SEQ ID NO: 51;

- CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положения 16 SEQ ID NO: 53;

- CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54, где либо X1 представляет собой D, либо X2 выбран

из группы, состоящей из T, H, A, Y, N, E и S. предпочтительно в группе, состоящей из H, A, Y, N, E; или X1 представляет собой E, а X2 выбран из группы, состоящей из T, H, A, Y, N, E и S, предпочтительно из группы, состоящей из H, A, Y, N, E и S; необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положений 2, 3, 7 и 8 SEQ ID NO: 54;

- CDR1 легкой цепи (LCDR1) содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63, где X представляет собой G или T, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положений 5, 6, 10, 11 и 16 SEQ ID NO: 63;

- CDR2 легкой цепи (LCDR2) содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации; и

- CDR3 легкой цепи (LCDR3) содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положений 1, 4 и 6 SEQ ID NO: 16.

В другом воплощении антигенсвязывающий домен содержит или по существу состоит из: (i) тяжелой цепи, содержащей CDR1 с SEQ ID NO: 51, CDR2 с SEQ ID NO: 53 и CDR3 с SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 или 62; и (ii) легкой цепи, содержащей CDR1 с SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 65, CDR2 с SEQ ID NO: 66 и CDR3 с SEQ ID NO: 16.

В другом аспекте антигенсвязывающий домен содержит или, по существу, состоит из:

(i) тяжелой цепи, содержащей CDR1 с SEQ ID NO: 51, CDR2 с SEQ ID NO: 53 и CDR3 с SEQ ID NO: 55; и (ii) легкой цепи, содержащей CDR1 с SEQ ID NO: 64, CDR2 с SEQ ID NO: 66 и CDR3 с SEQ ID NO: 16; или

(i) тяжелой цепи, содержащей CDR1 с SEQ ID NO: 51, CDR2 с SEQ ID NO: 53 и CDR3 с SEQ ID NO: 56; и (ii) легкой цепи, содержащей CDR1 с SEQ ID NO: 64, CDR2 с SEQ ID NO: 66 и CDR3 с SEQ ID NO: 16, или

(i) тяжелой цепи, содержащей CDR1 с SEQ ID NO: 51, CDR2 с SEQ ID NO: 53 и CDR3 с SEQ ID NO: 57; и (ii) легкой цепи, содержащей CDR1 с SEQ ID NO: 64, CDR2 с



CDR3 с SEQ ID NO: 61; и (ii) легкой цепи, содержащей CDR1 с SEQ ID NO: 64, CDR2 с SEQ ID NO: 66 и CDR3 с SEQ ID NO: 16; или

(i) тяжелой цепи, содержащей CDR1 с SEQ ID NO: 51, CDR2 с SEQ ID NO: 53 и CDR3 с SEQ ID NO: 62; и (ii) легкую цепь, содержащую CDR1 с SEQ ID NO: 65, CDR2 с SEQ ID NO: 66 и CDR3 с SEQ ID NO: 16.

В одном воплощении анти-PD1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит каркасные области, в частности каркасные области переменной области тяжелой цепи (HFR) HFR1, HFR2, HFR3 и HFR4 и каркасные области переменной области легкой цепи (LFR) LFR1, LFR2, LFR3 и LFR4.

Предпочтительно, анти-PD1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит человеческие или гуманизированные каркасные области. «Человеческий акцепторный каркас» для целей настоящего изобретения представляет собой каркас, содержащий аминокислотную последовательность каркаса переменной домена легкой цепи (VL) или каркаса переменной домена тяжелой цепи (VH), полученную из каркаса иммуноглобулина человека или консенсусного каркаса человека, как определено ниже. Человеческий акцепторный каркас, полученный из человеческого иммуноглобулинового каркаса или человеческого консенсусного каркаса, может содержать такую же аминокислотную последовательность, или он может содержать изменения аминокислотной последовательности. В некоторых воплощениях количество замен аминокислот составляет 10 или меньше, 9 или меньше, 8 или меньше, 7 или меньше, 6 или меньше, 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше или 2 или меньше. В некоторых воплощениях акцепторная каркасная область VL человека идентична по последовательности каркасной области VL человеческого иммуноглобулина или консенсусной последовательности каркасной области человека. «Человеческий консенсусный каркас» представляет собой каркас, который является наиболее часто встречающимися аминокислотными остатками при выборе последовательностей VL или VH каркасного участка человеческого иммуноглобулина.

В частности, анти-PD1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области переменной области тяжелой цепи (HFR) HFR1, HFR2, HFR3 и HFR4, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, 42, 43 и 44, соответственно, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положений 27, 29 и 32 HFR3, т.е. SEQ ID NO: 43. Предпочтительно анти-PD1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит HFR1 из SEQ ID NO: 41, HFR2 из SEQ ID NO: 42, HFR3 из SEQ ID NO: 43 и HFR4 из SEQ ID

NO: 44.

Альтернативно или дополнительно, анти-PD1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области переменной области легкой цепи (LFR) LFR1, LFR2, LFR3 и LFR4, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, 46, 47 и 48, соответственно, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации. Предпочтительно гуманизованное анти-PD1 антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит LFR1 из SEQ ID NO: 45, LFR2 из SEQ ID NO: 46, LFR3 из SEQ ID NO: 47 и LFR4 из SEQ ID NO: 48.

Домен VL и VH антитела против hPD1, содержащегося в бифункциональной молекуле согласно изобретению, может содержать четыре каркасных участка, прерванных тремя определяющими комплементарность участками, предпочтительно функционально связанными в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (от аминоконца к карбоксиконцу).

В одном аспекте антигенсвязывающий домен содержит или, по существу, состоит из:

(a) переменной области тяжелой цепи (VH), содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, где X1 представляет собой D или E, а X2 выбран из группы, состоящей из T, H, A, Y, N, E и S предпочтительно в группе, состоящей из H, A, Y, N, E; необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положений 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 и 112 SEQ ID NO: 17;

(b) переменной области легкой цепи (VL), содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26, где X представляет собой G или T, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положений 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 и 105 SEQ ID NO: 26.

В другом аспекте антигенсвязывающий домен содержит или, по существу, состоит из:

(a) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положений 7, 16, 17, 20, 33,

38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 и 112 SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25, соответственно;

(b) переменную область легкой цепи (VL), содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 и 105 из SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28.

В другом аспекте антигенсвязывающий домен содержит или, по существу, состоит из:

(a) переменной области тяжелой цепи (VH), содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25;

(b) переменной области легкой цепи (VL), содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28.

В другом аспекте антигенсвязывающий домен содержит или, по существу, состоит из любой из следующих комбинаций переменной области тяжелой цепи (VH) и переменной области легкой цепи (VL):

VH (SEQ ID NO:), необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены(замен), добавления(добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положений 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 и 112 SEQ ID NO:	VL (SEQ ID NO:), необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены(замен), добавления(добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положений 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 и 105 SEQ ID NO:
18	27
18	28
19	27
19	28
20	27
20	28
21	27
21	28
22	27
22	28
23	27
23	28
24	27
24	28
25	27
25	28

В особом воплощении антигенсвязывающий домен содержит или, по существу, состоит из переменной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 24 и переменной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 28.

В конкретном воплощении бифункциональная молекула содержит:

(а) тяжелую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положений 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 и 112 SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36, соответственно, и замен, соответствующих цепи со впадиной или выступом, предпочтительно цепи со впадиной, более конкретно, как раскрыто в таблице G, в частности, в SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36, либо T363S/L365A/Y4047V/Y346C, либо T363W/S351C, предпочтительно T363S/L365A/Y4047V/Y346C, и необязательно N294A в любой из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36;

(b) легкую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38, необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления (добавлений), делеции (делеций) и любой их комбинации в любом положении, кроме положений 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 и 105 из SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

В другом аспекте бифункциональная молекула содержит или состоит из любой из следующих комбинаций тяжелой цепи (CH) и легкой цепи (CL):

CH (SEQ ID NO:), необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления(добавлений), делеции (делеций) в любом положении, кроме положений 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 и 112 из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 SEQ ID NO:	CL (SEQ ID NO:), необязательно с одной, двумя или тремя модификациями, выбранными из замены (замен), добавления(добавлений), делеции (делеций) в любом положении, кроме положений 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 и 105 SEQ ID NO:
27	37
27	38
28	37
28	38
29	37
29	38
30	37
30	38
31	37
31	38
32	37
32	38
33	37
33	38

34	37
34	38
35	37
35	38
36	37
36	38

С тяжелой цепью, содержащей замены, соответствующие цепи со впадиной или выступом, предпочтительно цепи со впадиной, более конкретно, как описано в таблице G, в частности, в SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36, в частности либо T366S/L368A/Y407V/Y349C, либо T366W/S354C, предпочтительно T366S/L368A/Y407V/Y349C, и необязательно N297A в любой из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 (положения замен определяются в соответствии с нумерацией EU).

Соответственно, в одном аспекте бифункциональная молекула по изобретению содержит или состоит из:

(а) антигенсвязывающего домена против PD-1 человека, который содержит (i) одну тяжелую цепь с первой Fc-цепью и (ii) одну легкую цепь,

(б) варианта IL-7, и

(с) комплементарной второй Fc-цепи,

где вариант IL-7 ковалентно связан, необязательно через пептидный линкер, предпочтительно своим N-концом с C-концом первой цепи Fc и/или с N- или C-концом второй Fc-цепи.

Вариант IL-7 может представлять собой любой вариант IL-7, как описано выше.

Первая и вторая Fc-цепи могут быть такими, как описано выше. Предпочтительно, Fc-цепи предпочтительно представляют собой Fc-цепи из антитела IgG1 или IgG4.

Антигенсвязывающий домен против PD-1 человека описан выше.

В одном воплощении бифункциональная молекула содержит один антигенсвязывающий домен против PD-1 человека (только один). Предпочтительно бифункциональная молекула содержит один антигенсвязывающий домен против PD-1 человека, выбранный из группы, состоящей из Fab против PD-1 человека, Fab' против PD-1 человека, scFV против PD-1 человека и sdAb против PD-1 человека.

Бифункциональная молекула содержит один или два варианта IL-7, предпочтительно один вариант IL-7.

Бифункциональная молекула может содержать легкую цепь, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 37 или 38.

Бифункциональная молекула может содержать тяжелую цепь, содержащую или состоящую из любой из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 и 36, причем Fc-цепь необязательно модифицирована для стимулирования гетеродимеризации Fc-цепей для

образования гетеродимерного Fc-домена. Более конкретно, тяжелая цепь содержит замены, соответствующие цепи со впадиной или с выступом, предпочтительно цепи со впадиной, более конкретно, как указано в таблице G, в частности либо T366S/L368A/Y407V/Y349C, либо T366W/S354C, предпочтительно T366S/L368A/Y407V/Y349C и необязательно N297A в любой из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36, причем положения замен определены в соответствии с нумерацией EU.

В особом воплощении бифункциональная молекула содержит легкую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 38, и тяжелую цепь, включающую или состоящую из SEQ ID NO: 35, причем Fc-цепь необязательно модифицирована для стимуляции гетеродимеризации Fc-цепей для формирования гетеродимерного Fc-домена.

В особом аспекте бифункциональная молекула может содержать первый мономер SEQ ID NO: 75 и второй мономер, содержащий Fc-цепь SEQ ID NO: 77, которая связана на N-конце, необязательно с помощью линкера, с антигенсвязывающим доменом (в частности, SEQ ID NO: 79) и на C-конце, необязательно с помощью линкера, с любым вариантом IL-7, как раскрыто в настоящем описании. Более конкретно, бифункциональная молекула содержит первый мономер SEQ ID NO: 75, второй мономер SEQ ID NO: 83 и третий мономер SEQ ID NO: 37, 38 или 80, предпочтительно SEQ ID NO: 38 или 80.

В другом особом воплощении бифункциональная молекула может содержать первый мономер SEQ ID NO: 77 и второй мономер, содержащий Fc-цепь SEQ ID NO: 75, которая связана на N-конце, необязательно с помощью линкера, с антигенсвязывающим доменом (в частности, SEQ ID NO: 79) и на C-конце, необязательно с помощью линкера, с любым вариантом IL-7, как раскрыто в настоящем описании. Более конкретно, бифункциональная молекула содержит первый мономер SEQ ID NO: 77, второй мономер SEQ ID NO: 82 и третий мономер SEQ ID NO: 37, 38 или 80, предпочтительно SEQ ID NO: 38 или 80.

В другом особом воплощении бифункциональная молекула может содержать первый мономер SEQ ID NO: 75, который связан на N-конце, необязательно с помощью линкера, с антигенсвязывающим доменом (в частности, SEQ ID NO: 79), и второй мономер, содержащий Fc-цепь с SEQ ID NO: 77, которая связана на N-конце, необязательно с помощью линкера, с антигенсвязывающим доменом (в частности, SEQ ID NO: 79), и на C-конце, необязательно с помощью линкера, с любым вариантом IL-7, как раскрыто в настоящем описании. Более конкретно, бифункциональная молекула содержит первый мономер SEQ ID NO: 81, второй мономер SEQ ID NO: 83 и третий мономер SEQ ID NO: 37, 38 или 80, предпочтительно SEQ ID NO: 38 или 80.

В другом очень конкретном воплощении бифункциональная молекула может

содержать первый мономер SEQ ID NO: 77, который связан на N-конце, необязательно с помощью линкера, с антигенсвязывающим доменом (в частности, SEQ ID NO: 79), и второй мономер, содержащий Fc-цепь с SEQ ID NO: 75, которая связана на N-конце, необязательно с помощью линкера, с антигенсвязывающим доменом (в частности, SEQ ID NO: 79), и на C-конце, необязательно с помощью линкера, с любым вариантом ПЛ-7, как раскрыто в настоящем документе.

Получение бифункциональной молекулы, молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих варианты или мутированные ПЛ-7 или слитые белки и содержащие их бифункциональные молекулы, рекомбинантные экспрессирующие векторы и клетки-хозяева

Для получения варианта или мутированного ПЛ-7, слитого белка или бифункциональной молекулы по изобретению, в частности, в клетках млекопитающих, последовательности нуклеиновой кислоты или последовательности группы нуклеиновых кислот, кодирующих вариант или мутированный ПЛ-7, слитый белок или бифункциональную молекулу, субклонируют в один или несколько экспрессирующих векторов. Такие векторы обычно используют для трансфекции клеток млекопитающих. Общие методы получения молекул, содержащих последовательности антител, описаны в работе Coligan et al. (eds.), *Current protocols in immunology*, at pp. 10.19.1-10.19.11 (Wiley Interscience 1992), содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки, и в «Antibody engineering: a practical guide» от W.H. Freeman and Company (1992), где комментарии, относящиеся к получению молекул, распределены по соответствующим текстам.

Как правило, такой способ включает следующие стадии:

- (1) трансфекцию или трансформацию соответствующих клеток-хозяев полинуклеотидом(ами) или его (их) вариантами, кодирующими вариант или мутированный ПЛ-7, слитый белок или рекомбинантную бифункциональную молекулу по изобретению, или вектором, содержащим полинуклеотид(ы);
- (2) культивирование клеток-хозяев в подходящей среде; и
- (3) необязательно выделение или очистку белка из среды или клеток-хозяев.

Изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей вариант или мутированный ПЛ-7, слитому белку или бифункциональной молекуле, как описано выше, вектору, предпочтительно вектору экспрессии, содержащему нуклеиновую кислоту по изобретению, генетически сконструированной клетке-хозяину, трансформированной с помощью вектора по изобретению или непосредственно последовательностью, кодирующей вариант или мутированный ПЛ-7, слитый белок или рекомбинантную

бифункциональную молекулу, и способу получения белка по изобретению рекомбинантными методами.

Нуклеиновая кислота, вектор и клетки-хозяева более подробно описаны ниже.

Последовательность нуклеиновой кислоты

Изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант или мутированный IL-7, слитый белок или бифункциональную молекулу, как определено выше, или к группе молекул нуклеиновых кислот, кодирующих вариант или мутированный IL-7, слитый белок или бифункциональную молекулу, как определено выше. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариант или мутированный IL-7, слитый белок или бифункциональную молекулу, раскрытые в настоящем описании, может быть амплифицирована любыми методами, известными в данной области, такими как ПЦР. Такую нуклеиновую кислоту можно легко выделить и секвенировать с использованием обычных процедур.

В частности, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие бифункциональную молекулу, как определено в настоящем описании, включают:

- первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую связывающий фрагмент, как раскрыто в настоящем описании, и
- вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую IL-7m, предпочтительно человеческий IL-7m.

В самом конкретном воплощении молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая связывающий фрагмент, содержит переменный домен тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO: 73, и/или переменный домен легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO: 74.

В одном воплощении вторая молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с первой нуклеиновой кислотой, необязательно через нуклеиновую кислоту, кодирующую пептидный линкер. Под функциональным связыванием подразумевается, что нуклеиновая кислота кодирует слитый белок. Также, в конкретном воплощении, нуклеиновая кислота кодирует слитый белок, содержащий связывающий фрагмент, необязательно пептидный линкер и вариант IL-7, раскрытый в настоящем описании. Предпочтительно в такой молекуле нуклеиновой кислоты, когда связывающий фрагмент содержит Fc-домен, N-конец варианта IL-7 объединен с C-концом константного домена тяжелой цепи, предпочтительно через пептидный линкер.

В одном воплощении молекула нуклеиновой кислоты представляет собой выделенную, особенно неприродную молекулу нуклеиновой кислоты.

В одном аспекте нуклеиновая кислота кодирует IL-7m, имеющий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 2-15.

### Векторы

В другом аспекте изобретение относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты или группу молекул нуклеиновых кислот, как определено выше.

Используемый в данном описании термин «вектор» характеризует молекулу нуклеиновой кислоты, используемую в качестве носителя для переноса генетического материала в клетку. Термин «вектор» включает плазмиды, вирусы, космиды и искусственные хромосомы. Как правило, сконструированные векторы включают точку начала репликации, сайт множественного клонирования и селективный маркер. Сам вектор обычно представляет собой нуклеотидную последовательность, обычно последовательность ДНК, которая содержит вставку (трансген) и более крупную последовательность, которая служит «каркасом» вектора. Современные векторы могут включать дополнительные элементы, помимо трансгенной вставки и каркаса: промотор, генетический маркер, ген устойчивости к антибиотикам, репортерный ген, нацеливающую последовательность, метку для очистки белка. Векторы, называемые экспрессирующими векторами (экспрессирующими конструкциями), специально предназначены для экспрессии трансгена в клетке-мишени и обычно имеют контрольные последовательности.

Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая бифункциональную молекулу, слитый белок, связывающий фрагмент или вариант IL-7, может быть клонирована в вектор специалистами в данной области, а затем трансформирована в клетки-хозяева. Эти способы включают методы рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза ДНК, методы рекомбинантной ДНК *in vivo* и т.д. Способы, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы для конструирования экспрессирующего вектора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты бифункциональной молекулы, слитого белка, связывающего фрагмента или варианта IL-7, описанных в настоящей заявке, и соответствующие регуляторные элементы для транскрипции/трансляции.

Соответственно, настоящее изобретение также относится к рекомбинантному вектору, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бифункциональную молекулу, слитый белок, связывающий фрагмент или вариант IL-7 согласно настоящему изобретению. В одном предпочтительном воплощении экспрессирующий вектор дополнительно содержит промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептид сигнала секреции, и, необязательно, по меньшей мере, один ген устойчивости к лекарственным средствам для скрининга. Экспрессирующий вектор может дополнительно содержать сайт связывания рибосомы

для инициации трансляции, терминатор транскрипции и т.п.

Подходящие экспрессирующие векторы обычно содержат (1) элементы прокариотической ДНК, кодирующие начало репликации бактерий и маркер устойчивости к антибиотикам, чтобы обеспечить рост и селекцию экспрессирующего вектора в бактериальном хозяине; (2) элементы ДНК эукариот, которые контролируют инициацию транскрипции, такие как промотор; и (3) элементы ДНК, которые контролируют процессинг транскриптов, такие как последовательность терминации транскрипции/полиаденилирования.

Экспрессирующий вектор может быть введен в клетки-хозяева с использованием различных методов, включая трансфекцию фосфатом кальция, трансфекцию, опосредованную липосомами, электропорацию и т.п. Предпочтительно отбирают и размножают трансфицированные клетки, при этом экспрессирующий вектор стабильно интегрирован в геном клетки-хозяина для получения стабильных трансформантов.

#### Клетки-хозяева

В другом аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор, или молекулу нуклеиновой кислоты, или группу молекул нуклеиновых кислот, как определено выше, например, для целей получения бифункциональных молекул.

Используемый в данном описании термин «клетка-хозяин» включает любую индивидуальную клетку или клеточную культуру, которая может быть или была реципиентом векторов, экзогенных молекул нуклеиновой кислоты и полинуклеотидов, кодирующих бифункциональную молекулу, слитый белок, связывающий фрагмент или вариант IL-7 по настоящему изобретению. Термин «клетка-хозяин» также включает потомство или потенциальное потомство одной клетки. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические или эукариотические клетки, и также включают, без ограничения указанным, бактерии, дрожжевые клетки, клетки грибов, клетки растений и клетки животных, такие как клетки насекомых и клетки млекопитающих, например, мыши, крысы, кролика, макаки или человека.

Подходящими клетками-хозяевами являются, в частности, эукариотические клетки-хозяева, которые обеспечивают нужные посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование. Предпочтительно такими подходящими эукариотическими клетками-хозяевами могут быть клетки грибов, таких как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*; клетки насекомых, таких как *Mythimna separate*; растительные клетки, такие как клетки табака, и клетки млекопитающих, такие как клетки ВНК, клетки 293, клетки CHO, клетки NSO и клетки COS.

Клетка-хозяин по настоящему изобретению предпочтительно выбрана из группы,

состоящей из клетки CHO, клетки COS, клетки NSO и клетки НЕК.

Клетки-хозяева стабильно или временно экспрессируют бифункциональную молекулу, слитый белок, связывающий фрагмент и/или вариант П-7 по настоящему изобретению. Такие способы экспрессии известны специалистам в данной области.

В настоящем изобретении также предлагается способ получения варианта или мутанта П-7, слитого белка или бифункциональной молекулы. Способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую бифункциональную молекулу, слитый белок, связывающий фрагмент и/или вариант П-7, как указано выше, в условиях, подходящих для его экспрессии, и необязательно выделение бифункциональной молекулы, слитого белка, связывающего фрагмента и/или варианта П-7 из клетки-хозяина (или среды для культивирования клеток-хозяев). В частности, для рекомбинантного получения бифункциональной молекулы нуклеиновую кислоту, кодирующую бифункциональную молекулу, например, как описано выше, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Варианты или мутанты П-7, слитые белки бифункциональные молекулы затем выделяют и/или очищают любыми способами, известными в данной области. Эти способы включают, без ограничения указанным, обычную обработку для ренатурации, обработку осадителем белков (например, осаждение солью), центрифугирование, лизис клеток путем осмоса, обработку ультразвуком, суперцентрифугирование, хроматографию на молекулярных ситах или гель-хроматографию, адсорбционную хроматографию, ионообменную хроматографию, ВЭЖХ, любую другую жидкостную хроматографию и их комбинацию. Как описано, например, Coligan, методы выделения бифункциональных молекул могут, в частности, включать аффинную хроматографию с протеином-А-сефарозой, эксклюзионную хроматографию и ионообменную хроматографию. Предпочтительно для выделения бифункциональных молекул по изобретению используют протеин А.

#### Фармацевтическая композиция и способ ее введения

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей любой из вариантов или мутированных П-7, слитые белки или бифункциональные молекулы, описанные в настоящей заявке, молекулу нуклеиновой кислоты, группу молекул нуклеиновых кислот, вектор и/или клетки-хозяева, как описано выше, предпочтительно в качестве активного ингредиента или соединения. Составы можно стерилизовать и, при желании, смешивать со вспомогательными агентами, такими как фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты, соли, антиоксиданты и/или стабилизаторы, которые не взаимодействуют ненужным образом с бифункциональной

молекулой по изобретению, нуклеиновой кислотой, вектором и/или клеткой-хозяином по изобретению и не оказывают каких-либо нежелательных токсикологических эффектов. Необязательно фармацевтическая композиция может также содержать дополнительный терапевтический агент.

В частности, фармацевтическая композиция по изобретению может быть приготовлена для осуществления обычного способа введения, включая местное, энтеральное, пероральное, парентеральное, интраназальное, внутривенное, внутримышечное, подкожное или внутриглазное введение и т.п. Для облегчения введения описанная в данной заявке бифункциональная молекула может быть преобразована в фармацевтическую композицию для введения *in vivo*. Способы создания такой композиции описаны в данной области техники (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, 21st edition (2005).

Фармацевтическую композицию можно приготовить путем смешивания бифункциональной молекулы, имеющей желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами, антиоксидантами и/или стабилизаторами в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Такие подходящие носители, эксципиенты, антиоксиданты и/или стабилизаторы хорошо известны в данной области и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Для облегчения доставки любая бифункциональная молекула или кодирующая ее нуклеиновая кислота могут быть конъюгированы с агентом-шапероном. Шаперонный агент может быть природным веществом, таким как белок (например, сывороточный альбумин человека, липопротеин низкой плотности или глобулин), углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновая кислота) или липид. Это также может быть рекомбинантная или синтетическая молекула, такая как синтетический полимер, например, синтетический полипептид.

Фармацевтические композиции, согласно изобретению, могут быть приготовлены таким образом, чтобы активные ингредиенты (например, бифункциональная молекула согласно изобретению) высвобождались практически сразу же после введения или в любое заданное время или период времени после введения. Фармацевтическая композиция в некоторых аспектах может использовать системы доставки с медленным высвобождением, с отсроченным высвобождением и с замедленным высвобождением, так что доставка композиции происходит непосредственно перед тем, как индуцируется сенсбилизация участка, подлежащего лечению, или с достаточным запасом времени для того, чтобы осуществить это. Средства, известные в данной области, можно использовать

для предотвращения или минимизации высвобождения и абсорбции композиции до тех пор, пока она не достигнет ткани-мишени или органа-мишени, или для обеспечения высвобождения композиции во времени. Такие системы могут избежать повторного введения композиции, тем самым увеличивая удобство для пациента и врача.

Специалисту в данной области будет понятно, что препараты по настоящему изобретению могут быть изотоничными человеческой крови, то есть препараты по настоящему изобретению имеют по существу такое же осмотическое давление, что и человеческая кровь. Такие изотонические составы обычно имеют осмотическое давление от около 250 мОсм до около 350 мОсм. Изотоничность может быть измерена, например, с помощью осмометра давления пара или осмометра по точке замерзания.

Фармацевтическая композиция обычно должна быть стерильной и стабильной в условиях производства и хранения. Предотвращение присутствия микроорганизмов может быть обеспечено как процедурами стерилизации (например, микрофильтрацией), так и/или включением различных антибактериальных и фунгицидных средств.

Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом носителя для получения одиночной лекарственной формы будет варьировать в зависимости от объекта, подвергаемого лечению и от конкретного пути введения. Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом носителя для получения одиночной лекарственной формы будет в общем, тем количеством композиции, которое производит терапевтический эффект.

#### Субъект, режим и способ применения

Настоящее изобретение относится к варианту или мутированному IL-7, слитому белку или бифункциональной молекуле, как раскрыто в настоящем описании; нуклеиновой кислоте или вектору, кодирующему такую молекулу, клетке-хозяину или фармацевтической композиции, нуклеиновой кислоте, вектору или клетке-хозяину для применения в качестве лекарственного средства или для применения при лечении заболевания, или для введения субъекту, или для применения в качестве медикамента. Изобретение также относится к способу лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции или бифункциональной молекулы. Примеры лечения более подробно описаны ниже в разделе «Способы и применения».

Субъектом лечения может быть человек, в частности человек на пренатальной стадии, новорожденный, ребенок, младенец, подросток или взрослый, в частности взрослый в возрасте не менее 30 лет, 40 лет, предпочтительно взрослый в возрасте не менее 50 лет, еще более предпочтительно взрослый в возрасте не менее 60 лет, еще более

предпочтительно взрослый в возрасте не менее 70 лет.

В конкретном воплощении субъект может иметь иммуносупрессию или иммунодефицит.

Обычные способы, известные специалистам в области медицины, могут быть использованы для введения субъекту бифункциональной молекулы или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, в зависимости от типа заболевания, подлежащего лечению, или локализации заболевания, например, указанные средства вводят перорально, парентерально, энтерально, с помощью ингаляционного спрея, местно, ректально, назально, трансбуккально, вагинально или через имплантированный резервуар. Предпочтительно бифункциональную молекулу или фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутрисуставно, внутриартериально, интрасиновиально, внутриопухолево, интрастернально, подоболочечно, внутрь очага поражения и внутрочерепной инъекцией или методами инфузии.

Форма фармацевтических композиций, способ введения и доза введения фармацевтической композиции или бифункциональной молекулы по изобретению могут быть подобраны специалистом в данной области в соответствии с типом и тяжестью инфекции, а также характеристиками пациента, в частности его возрастом, массой, ростом, полом и/или общим физическим состоянием. Композиции по настоящему изобретению можно вводить несколькими способами в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение.

#### Применение при лечении заболевания

Бифункциональные молекулы, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева, композиции и способы по настоящему изобретению находят многочисленные приложения и применения *in vitro* и *in vivo*. В частности, любой из вариантов или мутированных ПЛ-7, слитых белков или бифункциональных молекул, молекул нуклеиновых кислот, групп молекул нуклеиновых кислот, векторов, клеток-хозяев или фармацевтических композиций, предложенных в настоящей заявке, можно использовать в терапевтических способах и/или в терапевтических целях.

Настоящее изобретение также относится к варианту или мутированному ПЛ-7, слитому белку или бифункциональной молекуле, нуклеиновой кислоте или вектору, кодирующему их, или к фармацевтической композиции, содержащей их, для применения при лечении расстройства и/или заболевания у субъекта и/или для применения в качестве лекарственного средства или вакцины. Изобретение также относится к применению варианта или мутированного ПЛ-7, слитого белка или бифункциональной молекулы, как

описано в данной заявке; нуклеиновой кислоте или вектору, кодирующим ее, или фармацевтической композиции, содержащей их, для лечения заболевания и/или нарушения у субъекта. Наконец, изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции или варианта или мутированного ПЛ-7, слитого белка или бифункциональной молекулы, или нуклеиновой кислоты или вектора, кодирующего их.

В одном воплощении изобретение относится к способу лечения заболевания и/или расстройства, выбранного из группы, состоящей из онкологического заболевания, инфекционного заболевания и хронической вирусной инфекции, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение указанному субъекту эффективного количества варианта или мутированного ПЛ-7, слитого белка или бифункциональной молекулы или фармацевтической композиции, как определено выше. Примеры таких заболеваний более подробно описаны ниже.

В одном аспекте способ лечения включает: (a) идентификацию пациента, нуждающегося в лечении; и (b) введение пациенту терапевтически эффективного количества любого варианта или мутированного ПЛ-7, слитого белка или бифункциональной молекулы, нуклеиновой кислоты, вектора или фармацевтической композиции, описанных в настоящей заявке.

Субъектом, нуждающимся в лечении, может быть человек, имеющий заболевание, подверженный риску или подозреваемый в наличии заболевания. Такого пациента можно определить при плановом медицинском осмотре.

В другом аспекте раскрытые в данном описании бифункциональные молекулы можно вводить субъекту, например, *in vivo*, для повышения иммунитета, предпочтительно для лечения расстройства и/или заболевания. Соответственно, в одном воплощении изобретение относится к способу модификации иммунного ответа у субъекта, включающему введение субъекту бифункциональной молекулы, нуклеиновой кислоты, вектора или фармацевтической композиции по изобретению таким образом, чтобы модифицировать иммунный ответ у субъекта. Предпочтительно иммунный ответ увеличивается, усиливается, стимулируется или активируется. Бифункциональную молекулу или фармацевтическую композицию можно использовать для усиления иммунных ответов, таких как активация Т-клеток, у субъекта, нуждающегося в лечении. В конкретном воплощении бифункциональную молекулу или фармацевтическую композицию можно использовать для уменьшения истощения Т-клеток или для реактивации истощенных Т-клеток.

Изобретение, в частности, относится к способу усиления иммунного ответа у субъекта, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества любой бифункциональной молекулы, нуклеиновой кислоты, вектора или фармацевтической композиции, описанных в настоящей заявке, таким образом, чтобы иммунный ответ у субъекта усиливался. В конкретном воплощении бифункциональную молекулу или фармацевтическую композицию можно использовать для уменьшения истощения Т-клеток или для реактивации истощенных Т-клеток.

Бифункциональные молекулы по изобретению нацелены на CD127+ иммунные клетки, особенно на CD127+ Т-клетки. Такие клетки могут быть обнаружены в следующих участках, представляющих особый интерес: резидентные лимфоидные клетки в лимфатических узлах (в основном в паракортексе, с редкими клетками в фолликулах), в миндалинах (интерфолликулярные области), селезенке ((в основном в лимфатическом периартериальном влагалище (PALS) белой пульпы и некоторые рассеянные клетки в красной пульпе)), тимусе (преимущественно в мозговом веществе, а также в корковом веществе), костном мозге (рассеянное распределение), в GALT (кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань, преимущественно в интерфолликулярной области и lamina propria) по всему пищеварительному тракту (желудок, двенадцатиперстная кишка, тощая кишка, подвздошная кишка, слепая кишка, ободочная кишка, прямая кишка), в MALT (слизисто-ассоциированная лимфоидная ткань) желчного пузыря. Таким образом, бифункциональные молекулы по изобретению представляют особый интерес для лечения заболеваний, локализованных или затрагивающих эти области, в частности онкологических заболеваний.

#### Раковые заболевания

В другом воплощении изобретение относится к применению варианта или мутированного IL-7, слитого белка или бифункциональной молекулы, или фармацевтической композиции, как раскрыто в настоящем описании, в производстве лекарственного средства для лечения онкологического заболевания, например, для ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта.

Используемый в данном описании термин «раковое заболевание» относится к заболеванию, характеризующемуся быстрым и неконтролируемым ростом aberrantных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела.

Соответственно, в одном воплощении изобретение относится к способу лечения рака, например, для ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества бифункциональной

молекулы или фармацевтической композиции согласно изобретению. В частности, настоящее изобретение относится к лечению субъекта с использованием бифункциональной молекулы, которая подавляет рост раковых клеток.

В одном из аспектов изобретения раковое заболевание, который необходимо лечить, связано с истощенными Т-клетками.

Любое подходящее раковое заболевание, которое можно лечить с помощью представленных в данной заявке способов, может представлять собой гематопозитический рак или солидную раковую опухоль. К таким видам раковых заболеваний относятся карцинома, рак шейки матки, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак головы и шеи, рак почки, рак печени, рак легких, лимфома, глиома, мезотелиома, меланома, рак желудка, рак уретры, вызванный экологическими факторами, и любые комбинации указанных видов раковых заболеваний. Кроме того, изобретение включает рефрактерные или рецидивирующие злокачественные новообразования. Предпочтительно рак, подлежащий лечению или профилактике, выбирают из группы, состоящей из метастатического или неметастатического рака, меланомы, злокачественной мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, почечно-клеточного рака, лимфомы Ходжкина, рака головы и шеи, уротелиального рака, колоректального рака, гепатоцеллюлярной карциномы, мелкоклеточного рака легкого, метастатической карциномы из клеток Меркеля, рака желудка или гастроэзофагального рака и рака шейки матки.

В конкретном воплощении раковое заболевание представляет собой гематологическое злокачественное новообразование или солидную опухоль. Такой рак может быть выбран из группы, состоящей из гематолимфоидных новообразований, ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы, миелодиспластического синдрома, острого миелоидного лейкоза.

В конкретном воплощении раковое заболевание представляет собой заболевание, индуцированное вирусом или связанное с иммунодефицитом. Такое раковое заболевание может быть выбрано из группы, которая включает саркому Капоши (например, саркому Капоши, ассоциированную с вирусом герпеса); плоскоклеточный рак шейки матки, анального канала, полового члена и вульвы и раковые заболевания ротоглотки (например, ассоциированные с вирусом папилломы человека); В-клеточные неходжкинские лимфомы (NHL), включая диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, лимфому Беркитта, плазмобластную лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, первичную выпотную лимфому HHV-8, классическую лимфому Ходжкина и лимфопролиферативные заболевания (например, ассоциированные с вирусом Эпштейна-

Барр (EBV) и/или вирусом герпеса, вызывающим саркому Капоши); гепатоцеллюлярную карциному (например, ассоциированную с вирусами гепатита В и/или С); карциному из клеток Меркеля (например, ассоциированную с вирусом полиомы карциному из клеток Меркеля (MPV)); и раковое заболевание, связанное с инфекцией вирусом иммунодефицита человека (HIV).

Предпочтительные виды раковых заболеваний, подлежащих лечению, включают раковые заболевания, обычно поддающиеся иммунотерапии. Альтернативно, предпочтительными видами раковых заболеваний, подлежащих лечению, являются раковые заболевания, не отвечающие на иммунотерапию.

#### Инфекционные заболевания

Бифункциональная молекула, нуклеиновая кислота, группа нуклеиновых кислот, вектор, клетки-хозяева или фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения пациентов, подвергшихся воздействию определенных токсинов или патогенов. Соответственно, один аспект изобретения относится к способу лечения инфекционного заболевания у субъекта, включающему введение субъекту бифункциональной молекулы по настоящему изобретению или фармацевтической композиции, включающей ее, предпочтительно так, чтобы субъект подвергся лечению от инфекционного заболевания.

Любую подходящую инфекцию можно лечить бифункциональной молекулой, нуклеиновой кислотой, группой нуклеиновой кислоты, вектором, клетками-хозяевами или фармацевтической композицией, представленными в настоящей заявке.

Некоторые примеры патогенных вирусов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению способами по настоящему изобретению, включают HIV, гепатит (А, В или С), вирус герпеса (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и CMV, вирус Эпштейна-Барр), аденовирус, вирус гриппа, флавивirusы, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, коронавирусы, респираторно-синцитиальный вирус, вирус паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус осповакцины, вирус HTLV, вирус денге, вирус папилломы, вирус моллюска, полиовирус, вирус бешенства, вирус JC и вирус арбовирусного энцефалита.

Некоторые примеры патогенных бактерий, вызывающих инфекции, которые можно лечить способами по настоящему изобретению, включают хламидии, риккетсиозные бактерии, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки и гонококки, клебсиеллы, протеи, серратии, псевдомонады, легионеллы, бактерии дифтерии, сальмонеллы, бациллы, бактерии холеры, столбняка, ботулизма, сибирской язвы, чумы, лептоспироза и бактерии болезни Лайма.

Некоторые примеры патогенных грибов, вызывающих инфекции, которые можно лечить способами по настоящему изобретению, включают *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* и т.д.), род *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*.

Некоторые примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению способами по настоящему изобретению, включают *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Cruzoa microostoma*, *Trypanosoma microostoma*, *Trypanosoma microostomi*, *Toxoplasma gondii* и *Nippostrongylus brasiliensis*.

#### Комбинированная терапия

Бифункциональную молекулу по изобретению можно комбинировать с некоторыми другими потенциальными стратегиями преодоления механизмов уклонения от иммунного ответа с агентами, находящимися в клинической разработке или уже имеющимися на рынке (см. таблицу 1 от Antonia et al. *Immuno-oncology combinations: a review of clinical experience and future prospects. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 20, 6258–6268, 2014). Такая комбинация с бифункциональной молекулой по изобретению может быть полезна, в частности, для:

- 1- Обращения вспять ингибирования адаптивного иммунитета (блокировки путей контрольных точек Т-клеток);
- 2- Включения адаптивного иммунитета (стимулирования передачи сигналов Т-клеточного ко-стимулирующего рецептора с помощью молекул-агонистов, в частности антител),
- 3- Улучшения функции клеток врожденного иммунитета;
- 4- Активации иммунной системы (усиления эффекторной функции иммунных клеток), например, с помощью стратегий, основанных на вакцинах.

Соответственно, в настоящем изобретении также предусмотрены комбинированные терапии с любой раскрытой в настоящем изобретении бифункциональной молекулой или фармацевтической композицией и подходящим вторым агентом для лечения заболевания или расстройства. В одном аспекте бифункциональная молекула и второй агент могут содержаться в уникальной фармацевтической композиции, как описано выше. Альтернативно, термины «комбинированная терапия» или «комплексная терапия», используемые в данном изобретении, охватывают введение этих двух агентов (например, бифункциональной молекулы, как описано в данном изобретении, и дополнительного или второго

подходящего терапевтического агента) последовательно, то есть, при этом каждое терапевтическое средство вводят в разное время, а также введение указанных терапевтических средств или по меньшей мере двух из них по существу одновременно. Последовательное или по существу одновременное введение каждого агента может зависеть от любого подходящего пути. Агенты можно вводить одним и тем же путем или разными путями. Например, первый агент (например, бифункциональную молекулу) можно вводить перорально, а дополнительный терапевтический агент (например, противораковый агент, противоинфекционный агент или иммуномодулятор) можно вводить внутривенно. Альтернативно, агент выбранной комбинации можно вводить внутривенной инъекцией, тогда как другие агенты комбинации можно вводить перорально.

В одном воплощении дополнительное терапевтическое средство может быть выбрано из неисчерпывающего перечня, состоящего из алкилирующих агентов, ингибиторов ангиогенеза, антител, антиметаболитов, антимитотиков, антипролиферативных средств, противовирусных средств, ингибиторов киназы Ауога, промоторов апоптоза (например, ингибиторы семейства Bcl-2), активаторов пути гибели рецепторов, ингибиторов киназы Vcr-Abl, антител ViTE (биспецифические антитела, мобилизующие T-клетки), конъюгатов антител и лекарственных средств, модификаторов биологического ответа, ингибиторов тирозинкиназы Брутона (ВТК), ингибиторов циклин-зависимых киназ, ингибиторов клеточного цикла, ингибиторов циклооксигеназы-2, DVD, ингибиторов рецептора гомолога онкогена вирусного лейкоза (ErbB2), ингибиторов фактора роста, ингибиторов белка теплового шока (HSP)-90, ингибиторов гистондеацетилазы (HDAC), гормональной терапии, иммунологических средств, ингибиторов ингибиторов белков апоптоза (IAP), интеркалирующих антибиотиков, ингибиторов киназ, ингибиторов кинезина, ингибиторов Jak2, ингибиторов мишени рапамицина у млекопитающих, микроРНК, ингибиторов митогенактивируемых внеклеточных киназ, регулируемых сигналом, мультивалентных связывающих белков, нестероидных противовоспалительных препаратов (NSAID), ингибиторов поли-АДФ (аденозиндифосфат) -рибозополимеразы (PARP), платиновых химиотерапевтических средств, ингибиторов polo-подобной киназы (Plk), ингибиторов фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), ингибиторов протеасом, аналогов пурина, аналогов пиримидина, ингибиторов тирозинкиназных рецепторов, растительных алкалоидов ретиноидов/дельтоидов, малых ингибирующих рибонуклеиновых кислот (siRNA), ингибиторов топоизомеразы, ингибиторов убиквитинлигазы, гипометилирующих агентов, ингибиторов контрольных точек, пептидных вакцин и т.п., эпитопов или неэпитопов из опухолевых антигенов, а

также одной или нескольких комбинаций этих агентов.

Например, дополнительный терапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из химиотерапии, лучевой терапии, таргетной терапии, антиангиогенных агентов, гипометилирующих агентов, противоопухолевых вакцин, эпитопов или неоэпитопов из опухолевых антигенов, ингибиторов миелоидных контрольных точек, других иммунотерапевтических средств и ингибиторов HDAC.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения заболевания у субъекта, включающему введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества бифункциональной молекулы или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, и терапевтически эффективного количества дополнительного или второго терапевтического агента.

Конкретные примеры дополнительных или вторых терапевтических средств представлены в заявке WO 2018/053106, страницы 36-43.

В предпочтительном воплощении этот второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из химиотерапевтических агентов, радиотерапевтических агентов, иммунотерапевтических агентов, клеточных терапевтических агентов (таких как CAR-T-клетки), антибиотиков и пробиотиков.

Комбинированная терапия также может основываться на сочетании введения бифункциональной молекулы с хирургическим вмешательством.

### Наборы

Любая из описанных в данной заявке бифункциональных молекул или композиций может быть включена в набор, предусмотренный настоящим изобретением. В настоящем описании, в частности, предлагаются наборы для применения для усиления иммунных ответов и/или лечения заболеваний или нарушений (например, ракового заболевания и/или инфекции).

В контексте настоящего изобретения термин «набор» означает два или более компонентов (один из которых соответствует бифункциональной молекуле, молекуле нуклеиновой кислоты, вектору или клетке по изобретению), упакованных в контейнер или иным образом. Таким образом, набор можно описать как набор продуктов и/или инструментов, достаточных для достижения определенной цели, которые могут продаваться как единое целое. Наборы по настоящему изобретению находятся в подходящей упаковке.

В частности, набор по изобретению может включать:

- вариант или мутированный IL-7, слитый белок или бифункциональную молекулу, как определено выше,

- молекулу нуклеиновой кислоты или группу молекул нуклеиновых кислот, кодирующих указанный вариант или мутированный ПЛ-7, слитый белок или бифункциональную молекулу,

- вектор, содержащий указанную молекулу нуклеиновой кислоты или группу молекул нуклеиновых кислот, и/или

- клетку, содержащую указанный вектор, молекулу нуклеиновой кислоты или группу молекул нуклеиновых кислот.

Таким образом, набор может включать в подходящем контейнере фармацевтическую композицию и/или варианты или мутированные ПЛ-7, слитые белки или бифункциональные молекулы, и/или клетки-хозяева по настоящему изобретению, и/или векторы, кодирующие молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению и/или молекулы нуклеиновых кислот или родственные реагенты по настоящему изобретению. В некоторых воплощениях могут быть предусмотрены средства взятия образца у индивидуума и/или анализа образца. Композиции, содержащиеся в наборе согласно изобретению, могут быть, в частности, включены в состав, совместимый со шприцем.

В некоторых воплощениях набор дополнительно включает дополнительный агент для лечения ракового или инфекционного заболевания, и дополнительный агент может быть объединен с вариантом или мутантным ПЛ-7, слитым белком или бифункциональной молекулой, или другими компонентами набора по настоящему изобретению или может быть предоставлен отдельно в наборе. В частности, набор, описанный в настоящей заявке, может включать одно или несколько дополнительных терапевтических средств, таких как те, которые описаны в разделе «Комбинированная терапия», представленном выше. Набор(-ы) может(-гут) быть адаптирован(-ы) к конкретному раковому заболеванию у индивидуума и включать соответствующие вторые терапевтические средства лечения ракового заболевания у индивидуума, как описано выше.

Инструкции, относящиеся к применению бифункциональной молекулы или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, обычно включают информацию о дозировке, схеме дозирования, способе введения для предполагаемого лечения, средствах восстановления бифункциональной молекулы и/или средствах разбавления бифункциональной молекулы по изобретению. Инструкции, прикладываемые к наборам по изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или вкладыше в упаковку (например, лист бумаги, включенный в набор в виде листовки или инструкции по эксплуатации).

Примеры

Пример 1. Мутации IL-7, объединенного с Fc, модифицируют связывание с IL-7R и передачу сигналов pSTAT5 и улучшают фармакокинетику *in vivo*

Для получения мутированных IL-7 аминокислоты, участвующие во взаимодействии IL7 с CD127, были заменены на аминокислоту, обладающую аналогичной природой и свойствами. Было создано несколько мутированных вариантов, а именно Q11E, Y12F, M17L, Q22E, D74E, D74Q, D74N, K81R, W142H, W142F и W142Y.

Дисульфидные связи IL-7 были разрушены путем замены остатков цистеина остатками серина, что привело к замене C2S-C141S + C34S-C129S (мутант, обозначенный «SS1»), или C2S-C141S + C47S-C92S (мутант, обозначенный «SS2») или C47S-C92S + C34S-C129S (мутант, обозначенный «SS3»).

Таблица 1. Определение ED<sub>50</sub> на фиг. 1A, B и C относится к концентрации, необходимой для достижения 50% связывания с рецептором CD127. Каждая таблица представляет отдельный эксперимент и может быть сравнена с положительным контролем IgG4 G4S3 IL7WT

Образцы	EC50 нг/мл
IgG4 G4S3 IL7 WT	18,4
IgG4 G4S3 IL7 Q11E	18,49
IgG4 G4S3 IL7 Y12F	22,27
IGG4 G4S3 IL7 M17L	20,96
IGG4 G4S3 IL7 Q22E	17,44
IgG4 G4S3 IL7 D74E	103,94
IgG4 G4S3 IL7 K81R	20,18
IgG4 IL7 G4S3 W142F	34,86
IgG4 G4S3 IL7 W142H	136,32
IGG4 G4S3 IL7 W142Y	44,6

Таблица 2. Связывание WT с рецептором CD127 по сравнению с мутантным IL-7. Оценка аффинности слитого анти-PD-1 IL-7 с помощью Biacore. Для анализа использовалась модель реакции с двумя состояниями

Образцы	Ka (1/Mc)	Kd2 (1/c)	KD (M)
IgG4 Fc G4S3 IL-7 WT	5,76E+06	1,22E-04	4,14E-11
IgG4 Fc G4S3 IL-7 W142H	5,02E+05	2,56E-03	5,68E-08
IgG4 Fc G4S3 Fc IL-7 SS2	6,11E+05	1,55E-03	7,22E-09
IgG4 Fc G4S3 Fc IL-7 SS3	1962	6,02E-4	1,36E-6

Таблица 3. Связывание WT с рецептором CD132 IL-7 по сравнению с мутантным IL-7. Оценка аффинности к CD132с помощью Biacore комплекса CD127 + IgG, слитого с IL-7. Для анализа использовалась стационарная модель реакции

Образцы	KD CD132
IgG4 отдельно	2,50E-06
IgG4 G4S3 IL-7 WT	1,18E-07
IgG4 Fc G4S3 IL-7 W142H	5,72E-07
IgG4 Fc G4S3 Fc IL-7 SS2	3,10E-06

Таблица 4. Определение ED<sub>50</sub> на фиг. 2A, B и C относится к концентрации, необходимой для достижения 50% сигнала pSTAT5 в этом анализе для каждой анти-PD-1

молекулы. Каждая таблица представляет собой отдельный эксперимент с отличающимся донором, и каждую таблицу можно сравнить с положительным контролем IgG4 G4S3 IL7WT

Образцы	EC50 нг/мл		
IgG4 G4S3 IL7 WT	76		
IgG4 IL7 Q11E	77		
IgG4 G4S3 IL7 Y12F	66		
IGG4 G4S3 IL7 M17L	128		
IGG4 G4S3 IL7 Q22E	84		
IgG4 G4S3 IL7D74E	389		
IgG4 G4S3 IL7 K81R	79	Образцы	EC50 нг/мл
IgG4 G4S3 IL7 W142F	102	IgG4 G4S3 IL7 WT	0,52
IgG4 G4S3 IL7 W142H	861	IgG4 G4S3 IL7 SS2	2401
IgG4 G4S3 IL7 W142Y	208	IGG4 G4S3 IL7 SS3	4348

Таблица 5. C<sub>max</sub>, площадь под кривой и определение периода полувыведения из данных фиг. 3. C<sub>max</sub> рассчитывали в момент времени через 15 минут после инъекции анти-PD-1 IL7. AUC рассчитывали от 0 до 144 часов после инъекции анти-PD-1 IL-7

Образцы	C <sub>max</sub> полученное (нМ)	Площадь под кривой (AUC)
IgG4 G4S3 IL7 WT	13,22	121,4
IgG4 G4S3 IL7D74E	89,19	151,9
IgG4 G4S3 IL7 W142F	98	неопределено
IgG4 G4S3 IL7 W142H	141	248,2
IgG4 G4S3 IL7 W142Y	70	неопределено
IgG4 G4S3 SS2	69,9	361,6
IgG4 G4S3 SS3	140,6	466,5

Замена одной аминокислоты в последовательности IL7 не изменила его способность связываться с рецептором PD-1 (фиг. 1 А, В и С). Однако эти мутации изменяют его биологическую активность, что показано связыванием с CD127 и передачей сигнала pSTAT5 в анализе Т-клеток *ex vivo* (фиг. 2 и 3 и таблицы 1 и 4). Мутации D74E и W142H являются наиболее эффективными мутациями для снижения как связывания IL-7 с CD127, так и активации pStat5 в Т-лимфоцитах (фиг. 2А, 2В и 3А, 3В и таблицы 1 и 5). В другом эксперименте был проанализирован эффект нарушения дисульфидных связей (фиг. 2С). В высокой концентрации (10 мкг/мл) SS2 или SS3 были способны активировать pStat5 в Т-лимфоцитах с 3-кратным отклонением от IL-7 WT (фиг. 2С и таблица 4).

Для подтверждения связывающей способности этих мутантов был проведен анализ Вiascore для определения KD (константа равновесной диссоциации между рецептором и его антигеном, см. таблицу 2). Мутанты SS2 и W142H имеют более низкую аффинность к CD127 с KD, близкой к 7-57 нМ. Мутант SS3 имеет самую низкую аффинность к CD127 с KD, близкой к 3 мкМ. Аффинность к рецептору CD132 также оценивали, как показано в таблице 3. В этом эксперименте только IgG4 использовали в качестве исходного уровня KD аффинности, поскольку CD127 димеризуется с CD132 в отсутствие IL-7. Мутантный IL-7 W142H связывается с CD132, но с 5-кратно более высокой аффинностью по

сравнению с IgG IL-7 WT. Эти данные демонстрируют, что мутация W142H снижает связывание с CD127 и перенаправляет связывание IL-7 с рецептором CD132, что приводит к потере активации pSTAT5 в Т-клетках, как показано на фиг. 2. Напротив, авторы изобретения наблюдали в тестируемом состоянии, что мутант SS2 теряет способность связываться с рецептором CD132, предполагая, что мутант SS2 предпочтительно связывается с CD127, а не с рецептором CD132, что приводит к снижению активности pSTAT5 в Т-клетках (фиг. 3).

Для определения фармакокинетики/фармакодинамики анти-PD-1 IL-7 *in vivo* мышам внутривенно вводили одну дозу IgG-IL-7 (34,4 нМ/кг). Концентрацию лекарственного средства в плазме анализировали с помощью ELISA, специфичного к IgG человека. На фиг. 3 и в таблице 5 показано, что молекулы IgG4 IL-7 WT быстро распределяются, поскольку полученная  $C_{max}$  (максимальная концентрация через 15 минут после инъекции) в 30 раз ниже теоретической концентрации. Все протестированные мутанты W142Y, F, H продемонстрировали лучший профиль распределения с  $C_{max}$  в 5-10 раз выше, чем у IL-7 WT (фиг. 3А и таблица 5). Мутант W142H демонстрирует лучшую  $C_{max}$ . анти-PD-1 IL-7 D74E мутант также продемонстрировал хорошую  $C_{max}$ . Мутанты SS2 и SS3 демонстрируют наилучший фармакокинетический профиль с  $C_{max}$  в 7-13 раз выше, чем у IL-7 WT, и с хорошей линейной кривой профиля. Параллельно была определена AUC (площадь под кривой) (таблица 5 и фиг. 4D), и AUC дает представление о степени воздействия лекарственного средства и скорости его выведения из организма. Эти данные показывают, что AUC увеличивалась при использовании мутированных IL-7, что означает, что мутированные IL-7 имеют улучшенную величину экспозиции лекарственного средства. Как показано на фиг. 4D, авторы наблюдали, что величина экспозиции лекарственного средства коррелирует с активностью мутированного IL-7 (измеренной с помощью pSTAT5 EC<sub>50</sub>). В заключение необходимо отметить, что аффинность IL-7 коррелирует с фармакокинетикой продукта. Снижение аффинности IL-7 к их рецепторам CD127 и CD132 улучшает абсорбцию и распределение бифункциональных молекул IL-7 *in vivo*.

Пример 2. Добавление цистеина в структуру С-концевого домена IgG снижает гибкость молекулы IL7 и улучшает фармакокинетику *in vivo*

Добавление цистеина в структуру С-концевого домена IgG также тестировали для создания дополнительной дисульфидной связи и потенциального ограничения гибкости молекулы IL-7. Этот мутант был обозначен «С-IL-7». На фиг. 5 показано, что добавление дисульфидных связей в структуру IgG снижает активность pSTAT5 для IL-7 по сравнению с бифункциональной молекулой анти-PD-1 IL7 WT (фиг. 5А) и увеличивает  $C_{max}$  (в 5 раз)

в фармакокинетическом анализе *in vivo* (фиг. 5B).

Пример 3. Анти-PD-1 IL-7 мутанты, сконструированные с изотипом IgG1N298A, имеют лучшее связывание с IL-7R, более высокую передачу сигнала pSTAT5 и хороший профиль фармакокинетики *in vivo*

Различные изотипы анти-PD-1 IL-7 бифункциональных молекул тестировали с IgG4m (S228P) или IgG1m (N298A или N297A в зависимости от способа нумерации). Изотип IgG4 содержит мутацию S228P для предотвращения обмена плечами Fab *in vivo*, а изотип IgG1 содержит мутацию N298A, которая устраняет связывание изотипа IgG1 с рецепторами FcγR, что может снижать неспецифическое связывание иммуноцитокина (мутант, названный «IgG4m» или «IgG1N298A»). Затем была сконструирована анти-PD-1 IL-7 бифункциональная молекула с 2 различными изотипами: IgG1, мутированный в изотип N297A (называемый IgG1m), и изотип IgG4 S288P (называемый IgG4m), чтобы определить, изменяет ли структура изотипа биологическую активность IL-7 и его фармакокинетический профиль.

На фиг. 6A и 6B показано, что анти-PD-1 IL7 бифункциональные молекулы, сконструированные с использованием изотипа IgG4m или IgG1m, обладают одинаковыми свойствами связывания с рецептором PD-1, показывая, что изотип не изменяет конформацию VH и VL и аффинность анти-PD-1 антитела для PD-1. Однако авторы изобретения обнаружили, что изотип IgG1m неожиданно улучшает связывание IL-7 D74, SS2 и немного SS3 с CD127 (фиг. 7 A, B, C и D) и активацию pSTAT5 на PBMC человека (фиг. 8 A, B и C). Это усиление передачи сигнала pSTAT5 было подтверждено для мутанта SS2 на другой линии Т-клеток (клетки Jurkat, экспрессирующие PD-1 и CD127, см. фиг. 8D), но неожиданным образом изотип IgG1m не изменяет активность pSTAT5 для анти-PD-1 IL-7 WT бифункциональной молекулы, что позволяет предположить, что изотип IgG1m улучшает активность только мутированных IL-7. Чтобы определить способность бифункциональной молекулы, содержащей анти-PD1 антитело и мутированный IL7, реактивировать передачу сигналов, опосредованную TCR, был проведен биоанализ NFAT. Результаты, представленные на фиг. 9A, показывают, что бифункциональная молекула лучше, чем анти-PD1 или анти-PD1+rIL7 (в виде отдельных соединений), активирует опосредованную TCR передачу сигналов (NFAT), демонстрируя синергетический эффект бифункциональной молекулы на PD1+ Т-клетки. Затем авторы изобретения оценили синергическую способность бифункциональной молекулы, содержащей анти-PD-1 антитело и мутированный IL-7 (с мутацией D74E, W142H или SS2), сконструированной с изотипом IgG4m по сравнению с IgG1m (фиг. 9 B, C, D). Все протестированные мутанты сохраняют синергический эффект на активацию передачи

сигналов NFAT с уровнем активации, коррелирующим с их способностью активировать передачу сигналов pSTAT5, в частности, для бифункциональной молекулы с IL-7 D74E с IgG4m.

Исследование фармакокинетики на мышах демонстрирует, что изотип IgG1 не изменяет величину экспозиции молекул лекарственного средства IL7WT и SS3 и оказывает минимальное влияние на величину экспозиции молекулы W142H (фиг. 10A). В целом, эти данные показывают, что оптимизированного изотипа (IgG1m) достаточно для повышения биологической активности мутантов при сохранении хорошей фармакокинетики продукта *in vivo*. С изотипом IgG1m тестировали другие мутированные IL-7: D74N, D74Q и комбинацию мутации D74E+W142H. Никаких различий с анти-PD-1 IL-7 D74E мутантом не наблюдалось в отношении активации pSTAT5 (фиг. 9B) и фармакокинетики (фиг. 10B).

Авторы, в частности, протестировали анти-PD-1 бифункциональную молекулу, содержащую мутированные IL-7 D74 с различными аминокислотными заменами D74E, D74Q и D74N. Никаких различий с мутированным IL-7 D74E против PD-1 не наблюдалось в отношении активации pSTAT5 (фиг. 9B) и фармакокинетики (фиг. 10B). Как подробно показано в таблице 6, все конструкции обладают одинаковой эффективностью связывания PD-1, но связывание с двойным PD-1/CD127 снижается с мутантами D74Q и D74N по сравнению с мутантом D74E, что свидетельствует о том, что замена Q и N слегка ослабляет аффинность мутанта к рецептору CD127.

Таблица 6. Определение ED50 связывания PD-1 и CD127 для мутантов D74E, D74Q и D74N

Образцы	Связывание PD-1 (ED50 (нг/мл))	Двойное связывание PD-1/CD127 (ED50 (нг/мл))
IgG1m G4S D74E	6,4	4,9
IgG1m G4S D74Q	5,4	15,7
IgG1m G4S D74N	5,8	8,5

ED<sub>50</sub> (нг/мл) относится к концентрации, необходимой для достижения 50% связывания с PD-1 и связывания с рецептором CD127, измеренного с помощью ELISA. Связывание PD-1 измеряли путем иммобилизации рецептора PD-1 человека, а двойное связывание PD-1/CD127 измеряли путем иммобилизации PD-1 и выявления с помощью рецептора CD127, как подробно описано в материале и методах. Все протестированные конструкции содержат линкер GGGGS и изотип IgG1 N298A.

Двойной мутант D74E + W142H продемонстрировал аналогичный профиль по сравнению с W142H IgG1, а D74Q показал аналогичный профиль по сравнению с мутантом D74E. Авторы изобретения также сконструировали бифункциональные молекулы с изотипом IgG1m + мутацией YTE (M252Y/S254T/T256E). Было описано, что

эта мутация увеличивает время полувыведения антитела за счет увеличения связывания с рецепторами FcRn. Как показано на фиг. 7D, мутация YTE не модифицирует передачу сигнала pSTAT5 бифункциональной молекулы, содержащей мутант D74 или W142H.

Пример 4. Мутация K444A в C-концевом остатке лизина не влияет на фармакокинетику *in vivo*

Все подклассы человеческого IgG несут C-концевой остаток лизина в тяжелой цепи антитела (K444), который может быть отщеплен в кровотоке. Это расщепление в крови потенциально может поставить под угрозу биологическую активность иммуноцитокина, высвобождая связанный IL-7 от IgG. Чтобы обойти эту проблему, аминокислота K444 в домене IgG была заменена аланином, чтобы уменьшить протеолитическое расщепление, мутация, обычно используемая для антител. Как показано на фиг. 11, аналогичная кривая была получена для IgG WT IL-7 по сравнению с IgG K444A IL-7, что свидетельствует о том, что мутация не влияет на фармакокинетический профиль лекарственного средства.

Пример 5. Линкер между IgG-антителом и IL-7 не изменяет фармакокинетику *in vivo*, но улучшает активацию передачи сигнала pSTAT5

Для модификации гибкости тестировали различные линкеры между Fc-доменом IgG и IL-7m. Были протестированы несколько модификаций (например, отсутствие линкера, линкеры GGGGS, GGGSGGGGS, GGGSGGGGS, GGGSGGGSGGGGS)

В примерах 1 и 2 для конструкций IgG4m-IL7 и IgG1m-IL-7 использовали линкер (G4S)<sub>3</sub> между C-концевым Fc-доменом и N-концевым доменом IL-7, соответственно. Этот линкер обеспечивает высокую гибкость и улучшение сигнала активации IL7. Для снижения аффинности IL7 к CD127 и улучшения фармакокинетики тестировали различные конструкции с различной длиной линкера (без линкера, G4S, (G4S)<sub>2</sub> или (G4S)<sub>3</sub>). Для сравнения, IgG1m или IgG4m Fc IL-7 WT также получали с различными линкерами.

Исследование фармакокинетики демонстрирует, что длина линкера не влияет на распределение, абсорбцию и элиминацию продукта для тестируемой конструкции: анти-PD-1 IL7 WT (фиг. 12A), анти-PD-1 IL-7 D74 (фиг. 12B) и анти-PD-1 IL-7 W142H (фиг. 12C). Однако длина линкера влияет на активацию pStat5, как показано на фиг. 12D. Действительно, анти-PD-1 IL7, сконструированный с линкером (G4S)<sub>3</sub>, более эффективен в активации передачи сигнала pSTAT5 по сравнению с анти-PD-1 IL-7, сконструированным с (G4S)<sub>2</sub> или G4S3 линкером, и даже более эффективен по сравнению с анти-PD-1 IL-7, сконструированным без линкера. Эти данные подчеркивают применение линкера (G4S)<sub>3</sub> для обеспечения гибкости IL-7 без ущерба для фармакокинетики лекарственного средства *in vivo*.

Пример 6. Анти-PD-1 IL-7 мутанты обеспечивают предпочтительное связывание с клетками PD-1+ CD127+ по сравнению с клетками PD-1-CD127+

Затем авторы изобретения оценили способность анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулы направленно воздействовать на PD-1+ Т-клетки. Клетки Jurkat, экспрессирующие CD127+ или совместно экспрессирующие CD127+ и PD-1+, окрашивали 45 нМ следующих бифункциональных молекул: анти-PD-1 IL-7 WT, D74, W142H, SS2 и SS3. Связывание детектировали с помощью анти-IgG-PE (Biolegend, клон HP6017) и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Результаты. На фиг. 13 показано, что анти-PD-1 IL-7 WT и мутант D74 связываются с одинаковой эффективностью с PD-1+/CD127+ клетками по сравнению с PD-1-/CD127+ клетками, тогда как мутантные анти-PD-1 IL-7 SS2, SS3 связываются с 2-3-кратной большей эффективностью с PD-1+/CD127+ клетками по сравнению с PD-1-/CD127+ клетками. Анти-PD-1 IL-7 W142H бифункциональная молекула проявляет промежуточный эффект и связывается с 1,4-кратной эффективностью с PD-1+/CD127+ клетками.

Чтобы подтвердить специфическое направленное воздействие анти-PD-1 IL-7 мутанта на PD-1+ Т-клетки в гетерогенной клеточной модели, авторы изобретения затем смешали клетки PD-1(+) и клетки PD-1(-) и проанализировали их связывание на каждом подмножестве клеток. В этом анализе клетки CHO, коэкспрессирующие клетки CD127+ человека и клетки PD-1+ человека, совместно культивировали в соотношении 1:1 с клетками CHO, экспрессирующими только человеческий рецептор CD127+ (фиг. 14A), а затем окрашивали возрастающими дозами бифункциональных анти-PD-1 мутантных молекул IL-7 D74E, W142H, SS2 и SS3, отдельного анти-PD-1 антитела или иррелевантного изотипического антитела IL-7. Связывание выявляли с помощью анти-IgG-PE (Biolegend, клон HP6017) и анализировали с помощью проточной цитометрии. Связывание EC50 (нМ) определяли для каждой конструкции и каждой популяции клеток PD-1(+) и PD-1(-) (фиг. 14B). Нерелевантный изотипический контроль IL-7 использовали в качестве отрицательного контроля, демонстрирующего равное связывание с клетками PD-1(+) по сравнению с клетками PD-1(-). Хотя все анти-PD-1 IL-7 бифункциональные молекулы предпочтительно связываются с клетками PD-1(+), а не с клетками PD-1(-) в этом анализе совместного культивирования, авторы изобретения обнаружили, что мутация IL-7 улучшает селективное цис-связывание молекулы на PD-1+ клетках. Как показано на фиг. 14B, мутанты W142H, SS2 и SS3 анти-PD-1 IL-7 продемонстрировали сильно ослабленное связывание с клетками PD-1(-)CD127(+) по сравнению с анти-PD-1 IL-7 дикого типа, в то время как анти-PD-1 IL-7 мутанты сохраняли сильное связывание

(EC<sub>50</sub>~300 пМ) с PD-1(+)/CD127(+) клетками, сходное с анти-PD-1 IL-7 дикого типа. В частности, анти-PD-1 IL-7 W142H и SS3 мутант показал самую высокую селективную активность с 62-кратной и 311-кратной разницей связывания, соответственно, между PD-1(+) клетками и PD-1(-) клетками.

В целом, эти данные показывают, что мутация IL-7 не только обеспечивает лучшую фармакокинетику лекарственного средства, но также делает возможным преимущественное связывание IL-7 с PD-1+ клетками, т.е. направленного воздействия лекарственного средства на ту же клетку. Этот аспект представляет интерес для биологической активности препарата *in vivo*, поскольку анти-PD-1 IL-7 будет концентрировать IL-7 на истощенных PD-1+CD127+ Т-клетках в микроокружении опухоли по сравнению с CD127+ наивными Т-клетками.

Пример 7. Анти-PD-1 IL-7 мутантная бифункциональная молекула предпочтительно активирует IL-7R на PD-1+ клетках и синергически способствует пролиферации активированных Т-клеток человека

Активацию передачи сигнала IL-7R (pSTAT5) также тестировали в модели совместного культивирования смешанных клеток U937 PD-1(+)/CD127(+) и PD-1(-)/CD127(+). Клетки U937 также экспрессировали эндогенный рецептор CD132, необходимый для передачи сигнала IL-7R (фиг. 15A). Данные о передаче сигнала pSTAT5 демонстрируют, что PD-1 IL-7 мутанты W142H, SS2 и SS3 обладают гораздо более высокой селективной активностью в PD-1(+) клетках по сравнению с PD-1(-) клетками. 10-50-кратное снижение активности наблюдается в PD-1(-) клетках с помощью анти-PD-1 бифункциональной молекулы, содержащей анти-IL7 мутанты, по сравнению с анти-PD-1 бифункциональной молекулой, содержащей IL-7 дикого типа (фиг. 15B). В то время как в PD-1(-) клетках индуцировалась очень низкая активность pSTAT5, в PD-1(+) клетках была получена восстановленная активность анти-PD-1 бифункциональной молекулы, содержащей мутанты IL-7, в той же степени, что и рекомбинантный цитокин IL-7 дикого типа с активностью EC<sub>50</sub> по pSTAT5, близкой к 10 пМ. В частности, мутант W142H имеет более чем в 450 раз большее связывание/активность в PD1+ клетках по сравнению с PD-1-клетками.

Поскольку сконструированная анти-PD-1 IL-7 бифункциональная молекула оказалась весьма успешной и, в частности, направленной воздействующей на истощенные PD-1(+)/CD127(+) Т-клетки, далее авторы изобретения проанализировали способность анти-PD-1 IL-7 W142H бифункциональной молекулы преимущественно активировать передачу сигналов pSTAT5 и пролиферацию в первичных истощенных Т-клетках человека. Для получения истощенных PD-1(+)/CD127(+) Т-клеток, Т-клетки

периферической крови человека подвергали многократной стимуляции *in vitro* ( $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28), чтобы имитировать хроническую антигенную стимуляцию, происходящую в микроокружении опухоли.

Чтобы оценить эффект направленного воздействия анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулы на PD-1(+) Т-клетки, истощенные Т-клетки инкубировали с высокой концентрацией конкурентного анти-PD-1 антитела, чтобы блокировать связывание анти-PD-1 части анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулы. После инкубации истощенные Т-клетки обрабатывали анти-PD-1 IL-7 W142H бифункциональной молекулой или рекомбинантным цитокином IL-7 дикого типа. Активацию pSTAT5 затем количественно определяли с помощью проточной цитометрии. Коэффициент активации pSTAT5 (EC50) между двумя состояниями (блокирующий PD-1 по сравнению с неблокирующим изотипом) рассчитали и представили на фиг. 16А. Рекомбинантный цитокин IL-7 ненаправленного воздействия использовали в этом анализе в качестве отрицательного контроля, и было получено соотношение 1, показывающее аналогичную активность IL-7 ненаправленного воздействия в PD-1(+) и PD-1(-) Т-клетках. Значительная дифференциальная активность была получена после обработки анти-PD-1 IL-7 W142H молекулой (активность в 2-4 раза ниже), что свидетельствует о том, что молекула обеспечивает преимущественно цис-активацию передачи сигнала IL-7R в PD-1(+) истощенные первичные Т-клетки по сравнению с истощенными PD-1(-) Т-клетками.

Кроме того, авторы изобретения продемонстрировали, что специфическое направленное цис-воздействие анти-PD-1 IL-7 W142H обеспечивает синергетическую пролиферацию истощенных Т-клеток *in vitro*, в то время как комбинация двух отдельных агентов (анти-PD-1 антитела + изотип IL-7 W142H) вызывал значительно более низкую стимуляцию пролиферации истощенных Т-клеток (фиг. 16В). В целом эти данные подтверждают преимущество бифункциональной молекулы, содержащей мутантную молекулу IL-7 W142H и анти-PD-1 антитело, для селективной и синергической цис-активации истощенных PD-1(+) CD127(+) Т-клеток.

Пример 8. Анти-PD-1 IL-7 молекулы с одним цитокином IL-7 W142H и одним или двумя плечами анти-PD-1 продемонстрировали высокую эффективность в обеспечении цис-активности в клетках PD-1+ IL-7R+ и стимуляции IL-7R-зависимой пролиферации Т-клеток *in vivo* и синергетическую способность реактивировать передачу сигналов TCR

Затем авторы изобретения разработали и сравнили биологическую активность множества структур бифункциональных молекул, содержащих один или два анти-PD-1 домена связывания и один или два мутанта IL-7 W142H, как описано на фиг. 17.

Конструкция 1 включает два анти-PD-1 антигенсвязывающих домена и два

варианта IL-7 W142H (конструкция 1 также называется анти-PD-1\*2 IL-7 W142H\*2), эта молекула соответствует конструкции, протестированной в примере 1-7. Эта молекула также называется BICKI-IL-7 W142H. В примерах контрольная молекула, названная BICKI-IL-7 WT, соответствует конструкции 1, но с IL-7 дикого типа.

Конструкция 2 включает два анти-PD-1 антигенсвязывающих домена и один вариант IL-7 W142H (конструкция 2 также называется анти-PD-1\*2 IL-7 W142H\*1).

Конструкция 3 содержит один анти-PD-1 антигенсвязывающий домен и один вариант IL-7 W142H (конструкция 3 также называется анти-PD-1\*1 IL-7 W142H\*1). Контрольная конструкция, называемая анти-PD-1\*1, аналогична конструкции 3, но лишена варианта IL-7.

Конструкция 4 содержит один анти-PD-1 антигенсвязывающий домен и два варианта IL-7 W142H (конструкция 4 также называется анти-PD-1\*1 IL-W142H\*2).

Конструкции 2, 3 и 4 были сконструированы с использованием изотипа IgG1 N298A, а аминокислотные последовательности были мутированы в Fc-части, чтобы создать выступ на CH2 и CH3 тяжелых цепей A и впадину на CH2 и CH3 тяжелых цепей B.

Все анти-PD-1 IL-7 конструкции обладают высокой аффинностью к рецептору PD-1, как показано с помощью анализа ELISA (фиг. 18A и таблица 7). Анти-PD-1 IL-7 молекулы, имеющие 2 анти-PD-1 плеча (анти-PD-1\*2), имеют такую же эффективность связывания (равную EC50) по сравнению с анти-PD-1\*2 без IL-7. Точно так же анти-PD-1 IL-7 молекулы, имеющие 1 анти-PD-1 плечо (анти-PD-1\*1 IL7 W142H\*1 и анти-PD-1\*1 IL-7 W142H\*2), продемонстрировали такую же эффективность связывания по сравнению с анти-PD-1\*1 без IL-7, с EC50, равной 86, и 111 нМ для анти-PD-1 IL-7 по сравнению с 238 нМ для анти-PD-1. Эти данные показывают, что слияние IL-7, по-видимому, не мешает связыванию PD-1 независимо от тестируемой конструкции.

Таблица 7. Определение ED50 на фиг. 18A относится к концентрации, необходимой для достижения 50% сигнала связывания PD1, измеренного с помощью ELISA для каждой анти-PD-1 IL-7 молекулы

Образцы	EC50 (нМ)
анти-PD-1*2	0,021
анти-PD-1*2 IL7 W142H*1	0,026
анти-PD-1*2 IL7 W142H*2	0,034
анти-PD-1*1	0,238
анти-PD-1*1 IL7 W142H*1	0,111
анти-PD-1*1 IL7 W142H*2	0,086

Более того, биоанализ антагониста PD-L1/PD-1 (фиг. 18B) демонстрирует, что анти-PD-1 IL-7 молекулы, имеющие 1 или 2 анти-PD-1 плеча, демонстрируют высокую эффективность блокирования связывания PD-L1 с рецептором PD-1. Хотя одно плечо

анти-PD-1 было удалено из конструкций 3 и 4, все конструкции анти-PD-1\*1 IL-7 демонстрируют высокие антагонистические свойства. Только 2,5-кратное снижение активности по сравнению с анти-PD-1\*2 IL-7 конструкциями было рассчитано с EC<sub>50</sub> (таблица 8) для конструкций 3 и 4.

Таблица 8. Определение ED<sub>50</sub> на фиг. 18B относится к концентрации, необходимой для достижения 50% активности антагониста PD1/PDL1, измеренной с помощью ELISA, для каждой анти-PD-1 IL-7 молекулы

Образцы	EC <sub>50</sub> (нМ)
анти-PD-1*2 IL7 W142H*1	2,168
анти-PD-1*2 IL7 W142H*2	2,792
анти-PD-1*1	5,014
анти-PD-1*1 IL7 W142H *1	5,839
анти-PD-1*1 IL7 W142H *2	7,235

Затем авторы изобретения оценили аффинность различных конструкций к рецептору CD127 с использованием анализа Viacore и анализа ELISA. Поскольку из конструкций 2 и 3 была удалена одна молекула IL-7, для этих молекул ожидалась более низкая связывающая способность с рецептором CD127 и более низкая активация pSTAT5 по сравнению с гетеродимерными конструкциями IL-7. Однако авторы настоящего изобретения обнаружили, что анти-PD-1\*2 IL-7 W142H\*1 молекула имеет аналогичную аффинность к рецептору CD127 по сравнению с анти-PD-1\*2 IL-7 W142H\*2 (BICKI-IL-7 W142H) и более низкую аффинность по сравнению с анти-PD-1 IL7 бифункциональными молекулами, содержащими форму IL-7 дикого типа (фиг. 19A и таблица 9). Неожиданно оказалось, что молекулы анти-PD-1\*2 IL7 W142H\*1 демонстрируют высокую активность pSTAT5, сходную с PD-1 IL-7 бифункциональными молекулами, содержащими форму IL-7 дикого типа (фиг. 19B). На основании этих наблюдений можно предположить, что мономерная форма IL-7 в сочетании с мутацией W142H IL-7 обеспечивает оптимальную конформацию молекулы IL-7 для стимулирования передачи сигналов IL-7 в Т-клетках человека. Даже при наличии только одного IL-7 молекула с мутацией W142H IL-7 обладает активационным эффектом (pSTAT5) таким же хорошим, как и двухцитокиновая молекула IL-7 wt. Этот результат является неожиданным в контексте варианта IL-7, имеющего более низкую аффинность к своему рецептору, чем IL-7 дикого типа.

Аналогичные выводы были сделаны с анти-PD-1 IL7 молекулами, сконструированными с одним анти-PD-1 плечом, объединенным с одним мутированным IL-7 W142H. Аналогичная и сопоставимая высокая активность pSTAT5 была получена с анти-PD-1\*2 IL-7WT\*2, анти-PD-1\*2 IL-7 W142H\*1 и анти-PD-1\*1 IL-7 W142H\*1 конструкциями (фиг. 19C)

Таблица 9. Связывание анти-PD1 IL-7 дикого типа или анти-PD1 мутированного

IL-7 W142H, сконструированного с 1 или 2 молекулами IL-7. Затем авторы изобретения оценили аффинность различных конструкций к рецептору CD127 с использованием анализа Biacore и анализа ELISA

	KD CD127 (M)
анти-PD-1*2 IL7 дикого типа*2	8,7 E-10
анти-PD-1*2 IL7 W142H*2	3,73 E-8
анти-PD-1*2 IL7 W142H*1	4,52 E-8

Эксперименты *in vivo* проводили для определения эффективности различных анти-PD-1 IL-7 конструкций. Одну дозу анти-PD-1 IL-7 молекул вводили мышам в эквивалентной молярной концентрации (34 нМ/кг). На 4-й день после начала обработки пролиферацию CD4 и CD8 Т-клеток определяли количественно с помощью проточной цитометрии с использованием маркера Ki67. На фиг. 20 показано, что анти-PD-1 IL-7 молекулы, содержащие один мутант W142H (анти-PD-1\*2 IL-7 W142H\*1 и анти-PD-1\*1 IL-7 W142H\*1) или имеющие одиночную валентность PD-1 и два цитокина IL7 W142H (анти-PD-1\*1IL7W142H\*2) проявляют высокую эффективность в стимулировании пролиферации CD8 и, в меньшей степени, CD4 Т-клеток.

Чтобы определить способность бифункциональных молекул, содержащих анти-PD1 антитело (одна или две валентности) и один или два мутантных цитокина IL7, реактивировать TCR-опосредованную передачу сигналов, был проведен биоанализ NFAT. На фиг. 21А показано, что бифункциональная молекула, сконструированная из 2 анти-PD-1 плечей и одного цитокина IL-7, усиливает активацию NFAT по сравнению с одним анти-PD-1 антителом, демонстрируя, что синергетическая активность лекарственного средства для усиления TCR-опосредованной передачи сигналов консервативен с анти-PD-1 IL-7 бифункциональной молекулой, сконструированной только из одного цитокина IL-7. Как видно на фиг. 9А, такого синергизма не было, когда клетки обрабатывали комбинацией анти-PD1 плюс IL-7.

Кроме того, далее авторы изобретения оценили активность анти-PD-1 IL-7 молекулы, сконструированной только с одной анти-PD-1 валентностью (анти-PD-1\*1), и продемонстрировали, что анти-PD-1\*1 IL-7 W142H конструкции (анти-PD-1\*1 IL7 W142H\*1 и \*2) сохраняют свою синергетическую активность, тогда как обработка комбинацией PD-1\*1 + изотип IL-7 W142H\*2 демонстрирует меньшую эффективность в стимуляции передачи сигналов TCR (активация NFAT) (фиг. 21В).

Наконец, специфическое цис-нацеливание и цис-активность различных анти-PD-1 IL-7 конструкций анализировали в анализе совместного культивирования. PD-1+CD127+ клетки U937 смешивали с PD-1-CD127+ клетками (соотношение 1:1), затем инкубировали с различными конструкциями при возрастающих дозах. Связывание и передачу сигнала

IL-7R (pSTAT5) количественно определяли с помощью проточной цитометрии. EC50 (нМ) связывания и активации pSTAT5 определяли для каждой конструкции и для каждой популяции PD-1+ и PD-1- клеток (фиг. 22А и В). Авторы изобретения подтвердили, что разнообразие анти-PD-1 IL-7 мутантных молекул (анти-PD-1\*2 IL7 W142H\*1, анти-PD-1\*1 IL7 W142H\*1 анти-PD-1\*1 IL7 W142H\*2) существенно преимущественно связывает IL-7R в PD-1+ клетках, с огромной активацией IL7R-опосредованной передачи сигнала pSTAT5 в PD-1+ клетках для различных и репрезентативных структур.

Пример 9. Анти-PD-1 IL-7 молекулы, сконструированные с 1 или 2 анти-PD-1 плечами и 1 или 2 цитокинами IL-7 W142H, имеют хороший фармакокинетический профиль *in vivo*

Было проведено исследование фармакокинетики конструкций 2, 3 и 4 на основе анти-PD-1 IL-7 бифункциональных молекул, описанных на фиг. 17. Гуманизированным мышам PD1 KI внутривенно инъецировали одну дозу анти-PD-1 IL-7 молекул (34,4 нМ/кг). Концентрацию лекарственного средства в плазме анализировали с помощью ELISA, специфичного к IgG человека (фиг. 23). Также была рассчитана площадь под кривой (см. таблицу 10), которая представляет собой общее воздействие лекарственного средства в зависимости от времени для каждой конструкции. Анти-PD-1\*2IL-7 W142H\*1, анти-PD-1\*1 IL-7 W142H\*1 и анти-PD-1\*1 IL-7 W142H\*2 конструкции продемонстрировали очень выгодно улучшенный ФК-профиль по сравнению с анти-PD-1\*2 IL7WT\*1. Наблюдали C<sub>max</sub> от 2,8 до 19 раз выше по сравнению с анти-PD-1\*1 IL-7WT\*2. Важно отметить, что высокая концентрация лекарственного средства (11-15 нМ), которая соответствует удовлетворительному значению ФК *in vivo*, сохраняется в течение по меньшей мере 96 часов с анти-PD-1\*1 IL-7 W142H\*1 анти-PD-1\*1 IL-7 W142H\*2 молекулами, тогда как в плазме обнаруживается только 2 нМ анти-PD-1\*2 IL-7WT\*2 молекулы. Остаточная концентрация лекарственного средства с анти-PD-1\*2 IL-7 W142H\*1 в 2,5 раза выше, чем концентрация анти-PD-1\*2 IL-7WT\*2. Экспозиция лекарственного средства в плазме коррелирует с эффективностью *in vivo*. Здесь авторы демонстрируют, что все анти-PD-1 IL-7 W142H молекулы, сконструированные с одним плечом анти-PD-1, обеспечивают длительное воздействие лекарственного средства после однократной инъекции, предполагая, что эти конструкции будут индуцировать более высокую биологическую активность *in vivo*.

Таблица 10. Определение площади под кривой из фиг. 23. AUC рассчитывали от 0 до 96 часов после внутривенного введения одной дозы анти-PD-1 IL-7 (34 нМ/кг)

	AUC	Cmax (нМ)
анти-PD1*1 IL7W142H*1	1597	42,4
анти-PD-1*1 IL7W142H*2	2024	248.6

Также упоминается, что, даже если некоторые молекулы PD-1\*2 IL-7WT\*2 с IL7 дикого типа могут также иметь хорошую ФК (в частности, для внутривенной инъекции) по сравнению с IL-7 W142H, молекулы с IL-7 W142H также имеют лучшие другие свойства: лучшая пролиферация Т-клеток (CD4, CD8, как показано на фиг. 20) и гораздо лучшее специфическое направленное воздействие на PD1+ клетки по сравнению с PD1-клетками (в 10-50 раз, как объяснено для фиг. 15B).

В целом было получено множество конструкций бифункциональных молекул с мутантным IL-7 (в частности, W142H) с очень удовлетворительной ФК для эффективного фармацевтического применения (предпочтительно не менее 10 нМ через 24 часа), а также дополнительно с:

- существенным полезным эффектом на пролиферацию LT,
- высокой эффективностью с точки зрения активации LT посредством IL7R-опосредованной передачи сигнала pSTAT5 в PD-1+ клетках, благодаря неожиданному синергетическому эффекту на Т-клетки анти-PD1-части бифункциональной молекулы и IL7-части бифункциональной молекулы,
- высокой специфичностью направленного воздействия на PD1+ Т-клетки по сравнению с PD-1- Т-клетками (намного выше, чем у бифункциональных молекул, не содержащих мутантный IL7), и цис-активацией передачи сигналов IL-7R в истощенных первичных PD-1+ Т-клетках по сравнению с PD-1-Т клетками, что является существенным преимуществом при лечении опухолей; и
- эффективным антагонистическим эффектом взаимодействия PD-1/PD-L1 (не только связывание с PD1).

#### Материалы и методы

##### ELISA на основе связывания с PD1

Для анализа активности ELISA рекомбинантный hPD1 (Sino Biologicals, Пекин, Китай; учетный номер 10377-H08H) иммобилизовали на пластике при 0,5 мкг/мл в карбонатном буфере (рН 9,2) и добавили очищенное антитело для измерения связывания. После инкубации и промывки добавляли меченные пероксидазой ослиные антитела против IgG человека (Jackson ImmunoResearch; США; учетный номер 709-035-149) и выявляли их обычными способами.

### Измерение аффинности с использованием способа Biacore

Оценка, с помощью Biacore, аффинности IgG, слитого с IL-7 по тяжелым цепям, к CD127 (A) или CD132 (B). CD127 (Sinobiological, 10975-H03H-50) иммобилизовали на биочипе CM5 в концентрации 20 мкг/мл и добавляли указанный белок в последовательных концентрациях (0,35; 1,1; 3,3; 10; 30 нМ). Аффинность анализировали с использованием моделей реакции с двумя состояниями. Для оценки аффинности IL-7 к CD132, CD127 иммобилизовали на биочипе CM5, и каждую конструкцию IL-7 вводили в концентрации 30 нМ. Рецептор CD132 (Sinobiological 10555-H08B) добавляли в различных концентрациях, т.е. 31, 25, 52,5, 125, 250, 500 нМ. Для анализа использовалась стационарная модель аффинности.

### ELISA на основе связывания с CD127

Связывание CD127 оценивали методом сэндвич-ELISA. Рекомбинантные белки, на которые нацелен каркас антитела, иммобилизовали, затем инкубировали антитела, слитые с IL-7, предварительно инкубированные с рекомбинантным белком CD127 (с гистиридиновой меткой, Sino ref 10975-H08H). Выявление осуществляли с помощью смеси антигистиринового антитела (MBL #D291-6), связанного с биотином, и стрептавидина, связанного с пероксидазой (JI 016-030-084). Колориметрию определяли при 450 нм с использованием субстрата ТМВ.

### Анализ pSTAT5

РВМС, выделенные из периферической крови здоровых добровольцев, инкубировали в течение 15 минут с рекомбинантным IL-7 или с IgG, слитым с IL-7. Для определения цис-активности клетки U937, трансдуцированные CD127+ PD-1+, смешивали с клетками U937, трансдуцированными только CD127+. Клетки смешивали в соотношении 1:1 и обрабатывали рекомбинантным IL-7 или различными конструкциями IgG, слитого с IL-7, описанными в настоящей заявке. Каждую подгруппу клеток метили красителем для пролиферации клеток (CPDe450 или CPDe670) перед совместным культивированием. Затем клетки фиксировали, пермеабелизировали и окрашивали меченным AF647 анти-pSTAT5 (клон 47/Stat5 (pY694)). Данные были получены путем расчета MFI pSTAT5 в популяции CD3+ Т-клеток.

### Анализ клеточного связывания

Для определения цис-связывания IgG, слитого с молекулами IL-7, клетки U937 или СНО, трансдуцированные CD127+ PD-1+, смешивали с клетками СНО или U937, трансдуцированными только CD127+. Клетки смешивали в соотношении 1:1 и обрабатывали различными конструкциями IgG, слитыми с IL-7, описанными в данной заявке. Каждую подгруппу клеток метили красителем для пролиферации клеток (CPDe450

или CPDe670) перед совместным культивированием. После 20 минут инкубации связывание различных гибридных молекул IgG определяли с помощью антитела против IgG-PE (Biolegend, клон HP6017) и анализировали с помощью проточной цитометрии.

#### Фармакокинетика *in vivo* IgG, слитого с IL-7

Для анализа фармакокинетики иммуноцитокина IL-7 одну дозу молекулы интраорбитально или внутрибрюшинно вводили мышам Balb/cRJ (самки 6-9 недель) или мышам C57bl6JrJ (самки 6-9 недель). Концентрацию лекарственного средства в плазме определяли с помощью ELISA с использованием иммобилизованного антитела против легкой цепи человека (клон NaM76-5F3), разведенной сыворотки, содержащей IgG, слитый с  $\epsilon$ -IL-7. Детекцию проводили с помощью меченого пероксидазой ослиного антитела против IgG человека (Jackson Immunoresearch; США; уч. № 709-035-149) и выявляли обычными способами.

Анализ активации Т-клеток с использованием биоанализа Promega на основе клеток

Способность антител против PD-1 восстанавливать активацию Т-клеток тестировали с использованием набора Promega PD-1/PD-L1 (ссылка J1250). Использовали две клеточные линии, (1) эффекторные Т-клетки (Jurkat, стабильно экспрессирующие PD-1, люциферазу, индуцированную NFAT) и (2) активирующие клетки-мишени (клетки CHO K1, стабильно экспрессирующие PDL1 и поверхностный белок, предназначенный для стимуляции когнатных TCR антигеннезависимым образом. При совместном культивировании клеток взаимодействие PD-L1/PD-1 ингибирует активацию, опосредованную TCR, тем самым блокируя активацию NFAT и активность люциферазы. Добавление антитела против PD-1 блокирует опосредованный PD-1 ингибирующий сигнал, что приводит к активации NFAT и синтезу люциферазы и испусканию сигнала биолюминесценции. Эксперимент проводился в соответствии с рекомендациями производителя. Были протестированы серийные разведения антитела PD-1. Через четыре часа после совместного культивирования клеток-мишеней PD-L1+, эффекторных клеток PD-1 и антител против PD-1 в лунки добавляли субстрат люциферина BioGlo™, и планшеты считывали с помощью люминометра Tecan™.

#### Пролиферация *in vivo*

Однократную дозу бифункциональных молекул (34 нМ/кг) вводили внутрибрюшинно мышам C57bl6JrJ (самки 6-9 недель) с подкожной опухолью MC38. На 4-й день после обработки собирали кровь и опухоль MC38 и окрашивали Т-клетки анти-CD3, анти-CD8, анти-CD4 антителами и анти-ki67 антителами для количественной оценки пролиферации с помощью проточной цитометрии.

## Антитела и бифункциональные молекулы

Следующие антитела и бифункциональные молекулы использовались в различных экспериментах, раскрытых в настоящем описании: пембролизумаб (Китруда, Merck), ниволумаб (Опдиво, Bristol-Myers Squibb) и бифункциональные молекулы, раскрытые в настоящем описании, содержащие гуманизированное анти-PD1 антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH), имеющей SEQ ID NO: 24, и переменную область легкой цепи (VL), имеющей SEQ ID NO: 28, или химерное анти-PD1 антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 71, и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 72.

Конструкция 1 включает два анти-PD-1 антигенсвязывающих домена и два варианта IL-7 W142H (конструкция 1 также обозначена как анти-PD-1\*2 IL-7 W142H\*2). Указанная молекула соответствует конструкции, протестированной в примерах 1-7. Эта молекула также обозначена как BICKI-IL-7 W142H. В частности, конструкция 1 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), имеющую SEQ ID NO: 24, и переменную область легкой цепи (VL), имеющую SEQ ID NO: 28, или химерное анти-PD1 антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 71 и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 72. Молекула также содержит вариант IL7, такой как представлен SEQ ID No: 5.

В примерах контрольная молекула, обозначенная BICKI-IL-7 WT, соответствует конструкции 1, но с IL-7 дикого типа. Данная молекула содержит переменную область тяжелой цепи (VH), имеющую SEQ ID NO: 24, и переменную область легкой цепи (VL), имеющую SEQ ID NO: 28. Молекула имеет изотип IgG4 S288P.

Другой контрольной молекулой является анти-PD1\*2 (без какого-либо IL7). Молекула содержит тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 79, и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 80.

Конструкция 2 включает два анти-PD-1 антигенсвязывающих домена и один вариант IL-7 W142H (конструкция 2 также называется анти-PD-1\*2 IL-7 W142H\*1). В частности, конструкция 2 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), имеющую SEQ ID NO: 24, и переменную область легкой цепи (VL), имеющую SEQ ID NO: 28. Молекула, в частности, содержит тяжелую цепь, связанную с IL-7 W142H, имеющую SEQ ID NO: 83 (впадина), или тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 81 (выступ), и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 80.

Конструкция 3 содержит один анти-PD-1 антигенсвязывающий домен и один вариант IL-7 W142H (конструкция 3 также называется анти-PD-1\*1 IL-7 W142H\*1). В частности, конструкция 3 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), имеющую SEQ ID NO: 24, и переменную область легкой цепи (VL), имеющую SEQ ID NO: 28.

Молекула содержит тяжелую цепь, связанную с IL-7 W142H, имеющую SEQ ID NO: 83, Fc-область, имеющую SEQ ID NO: 75, и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 80.

Контрольная конструкция, называемая анти-PD-1\*1, аналогична конструкции 3, но лишена варианта IL-7. Такой контроль содержит переменную область тяжелой цепи (VH), имеющую SEQ ID NO: 24, и переменную область легкой цепи (VL), имеющую SEQ ID NO: 28. Молекула содержит тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 81, Fc-область, имеющую SEQ ID NO: 75, и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 80.

Конструкция 4 содержит один анти-PD-1 антигенсвязывающий домен и два варианта IL-7 W142H (конструкция 4 также обозначена как анти-PD-1\*1 IL-W142H\*2). В частности, конструкция 4 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), имеющую SEQ ID NO: 24, и переменную область легкой цепи (VL), имеющую SEQ ID NO: 28. Молекула содержит тяжелую цепь, связанную с IL-7 W142H, имеющую SEQ ID NO: 83, Fc-область, связанную с IL-7 W142H, имеющую SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 80.

Конструкции 2, 3 и 4 были сконструированы с использованием изоформа IgG1 N298A, а аминокислотные последовательности были мутированы в Fc-части, чтобы создать выступ на CH2 и CH3 тяжелой цепи A и впадину на CH2 и CH3 тяжелой цепи B. Все конструкции анти-PD-1 IL-7 и анти-PD-1\*1 содержат мутантный изоформ IgG1N298A, за исключением конструкции анти-PD-1\*2 (без IL-7) и анти-PD-1\*2 IL7wt\*2 (BICKI-IL-7 WT), которые были созданы с использованием изоформа IgG4 S288P.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Бифункциональная молекула, содержащая вариант интерлейкина 7 (IL-7), конъюгированный со связывающим фрагментом, где:

- связывающий фрагмент связывается с мишенью, экспрессируемой исключительно на поверхности иммунных клеток,

- вариант IL-7 обладает по меньшей мере 75% идентичностью с человеческим IL-7 дикого типа (wth-IL-7), содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, причем вариант содержит по меньшей мере одну аминокислотную мутацию, выбранную из группы, состоящей из (i) W142H, W142F или W142Y, (ii) C2S-C141S и C47S-C92S, C2S-C141S и C34S-C129S, или C47S-C92S и C34S-C129S, (iii) D74E, D74Q или D74N, iv) Q11E, Y12F, M17L, Q22E и/или K81R; или любой их комбинации, причем нумерация аминокислот соответствует таковой в SEQ ID NO: 1, которая i) снижает аффинность варианта IL-7 к рецептору IL-7 (IL-7R) по сравнению с аффинностью wth-IL-7 к IL-7R, и ii) улучшает фармакокинетику бифункциональной молекулы, содержащей вариант IL-7, по сравнению с бифункциональной молекулой, содержащей wth-IL-7.

2. Молекула по п. 1, отличающаяся тем, что вариант IL-7 содержит аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из W142H, W142F и W142Y, причем нумерация аминокислот соответствует таковой в SEQ ID NO: 1.

3. Молекула по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что вариант IL-7 содержит группу аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из C2S-C141S и C47S-C92S, C2S-C141S и C34S-C129S, и C47S-C92S и C34S-C129S, причем нумерация аминокислот соответствует таковой в SEQ ID NO: 1.

4. Молекула по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что вариант IL-7 содержит аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из D74E, D74Q и D74N, причем нумерация аминокислот соответствует таковой в SEQ ID NO: 1.

5. Молекула по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что вариант IL-7 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 2-15.

6. Молекула по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что связывающий фрагмент содержит константный домен тяжелой цепи, предпочтительно Fc-домен, IgG1 человека, необязательно с заменой или комбинацией замен, выбранных из группы, состоящей из T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E; K322A и

K444A, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из N297A, необязательно в сочетании с M252Y/S254T/T256E и L234A/L235A.

7. Молекула по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что связывающий фрагмент содержит константный домен тяжелой цепи, предпочтительно Fc-домен, IgG4 человека, необязательно с заменой или комбинацией замен, выбранных из группы, состоящей из S228P; L234A/L235A, S228P + M252Y/S254T/T256E.17 и K444A.

8. Молекула по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что иммунная клетка представляет собой Т-клетку, предпочтительно истощенную Т-клетку.

9. Молекула по п. 8, отличающаяся тем, что мишень экспрессируется Т-клетками, а связывающий фрагмент связывается с мишенью, выбранной из группы, состоящей из PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 и CD8.

10. Молекула по п. 8, отличающаяся тем, что мишень экспрессируется истощенными Т-клетками, а связывающий фрагмент связывается с мишенью, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из PD-1, CTLA-4, BTLA, TIGIT, LAG3 и TIM3.

11. Молекула по любому из пп. 1-10, отличающаяся тем, что связывающий фрагмент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий домен, а N-конец варианта IL-7 слит с C-концом константного домена тяжелой или легкой цепи антитела или фрагмента этого антитела, предпочтительно с C-концом константного домена тяжелой цепи, необязательно посредством пептидного линкера.

12. Молекула по п. 11, отличающаяся тем, что вариант IL-7 слит со связывающим фрагментом посредством пептидного линкера, выбранного из группы, состоящей из GGGGS (SEQ ID NO: 68), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 67), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 69) и GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 70), предпочтительно представляющего собой (GGGGS)<sub>3</sub>.

13. Молекула по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что молекула содержит первый мономер, содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный через C-конец с N-концом первой гетеродимерной Fc-цепи, необязательно посредством пептидного линкера, причем указанная первая гетеродимерная Fc-цепь ковалентно связана через C-конец с N-концом варианта IL-7, необязательно посредством пептидного линкера, и второй мономер, содержащий комплементарную вторую гетеродимерную Fc-цепь, лишенную антигенсвязывающего домена.

14. Молекула по п. 13, отличающаяся тем, что во втором мономере комплементарная вторая гетеродимерная Fc-цепь ковалентно связана с вариантом IL-7, необязательно посредством пептидного линкера, предпочтительно ковалентно связана через C-конец с N-концом варианта IL-7, необязательно посредством пептидного линкера.

15. Молекула по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что молекула содержит первый мономер, содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный через C-конец с N-концом первой гетеродимерной Fc-цепи, необязательно посредством пептидного линкера, причем указанная первая гетеродимерная Fc-цепь не содержит варианта IL-7, а второй мономер содержит комплементарную вторую гетеродимерную Fc-цепь, лишенную антигенсвязывающего домена, причем указанная вторая гетеродимерная Fc-цепь ковалентно связана с вариантом IL-7, необязательно посредством пептидного линкера, предпочтительно связанный через C-конец с N-концом варианта IL-7, необязательно посредством пептидного линкера.

16. Молекула по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что молекула содержит первый мономер, содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный через C-конец с N-концом первой гетеродимерной Fc-цепи, необязательно посредством пептидного линкера, и второй мономер, содержащий антигенсвязывающий домен, ковалентно связанный через C-конец с N-концом комплементарной второй гетеродимерной Fc-цепи, необязательно посредством пептидного линкера, причем только одна из гетеродимерных Fc-цепей, предпочтительно первая, ковалентно связана через C-конец с N-концом варианта IL-7.

17. Молекула по любому из пп. 13-16, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой домен Fab, Fab', одноцепочечный переменный фрагмент (scFV) или однодоменное антитело (sdAb).

18. Молекула по любому из пп. 13-17, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен содержит или по существу состоит из: (i) тяжелой цепи, содержащей CDR1 с SEQ ID NO: 51, CDR2 с SEQ ID NO: 53 и CDR3 с SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 или 62; и (ii) легкую цепь, содержащую CDR1 с SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 65, CDR2 с SEQ ID NO: 66 и CDR3 с SEQ ID NO: 16.

19. Молекула по любому из пп. 13-17, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен содержит или, по существу, состоит из:

(a) переменной области тяжелой цепи (VH), содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25;

(b) вариабельной области легкой цепи (VL), содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28.

20. Молекула по любому из пп. 13-19, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен содержит или, по существу, состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 24 и вариабельной области легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 28.

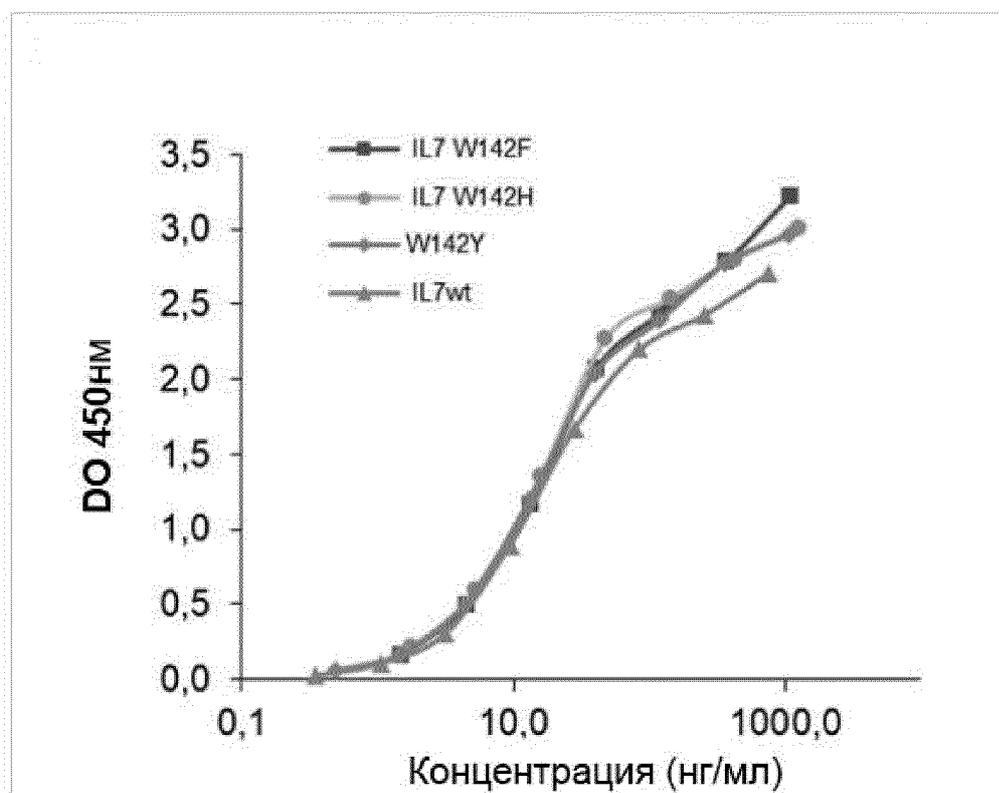
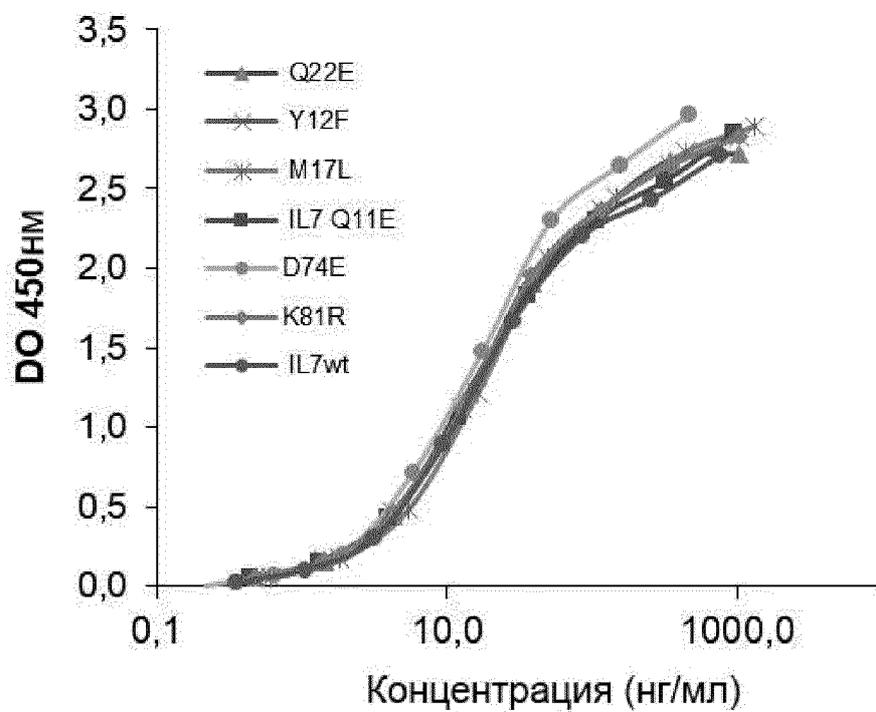
21. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты или группа выделенных молекул нуклеиновых кислот, кодирующие бифункциональную молекулу по любому из пп. 1-20.

22. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п. 21.

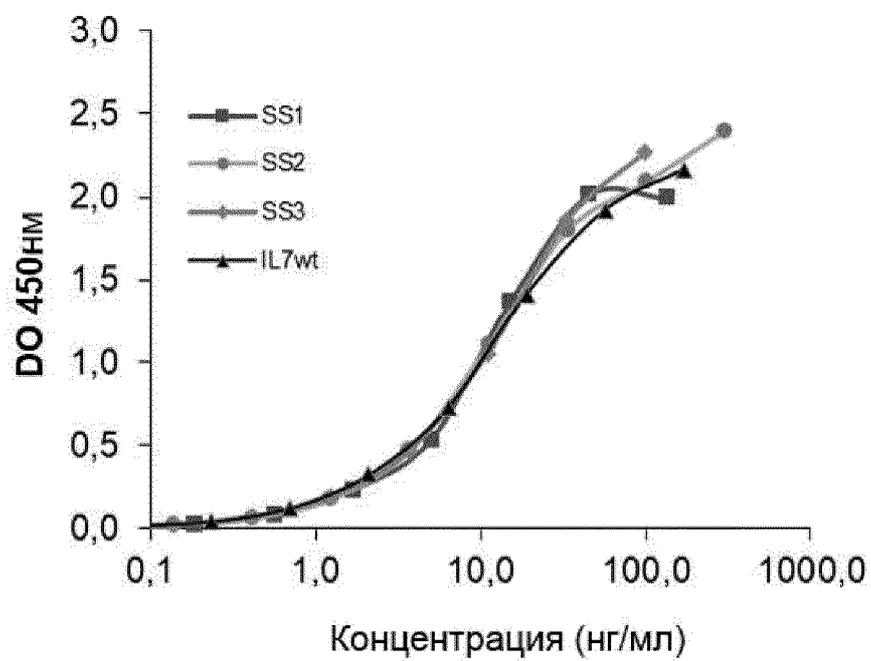
23. Фармацевтическая композиция, содержащая бифункциональную молекулу по любому из пп. 1-20, нуклеиновую кислоту по п. 21 или клетку-хозяина по п. 22, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем.

24. Молекула по любому из пп. 1-20, нуклеиновая кислота по п. 21, или клетка-хозяин по п. 22, или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения в качестве лекарственного средства, особенно для применения при лечении ракового или инфекционного заболевания.

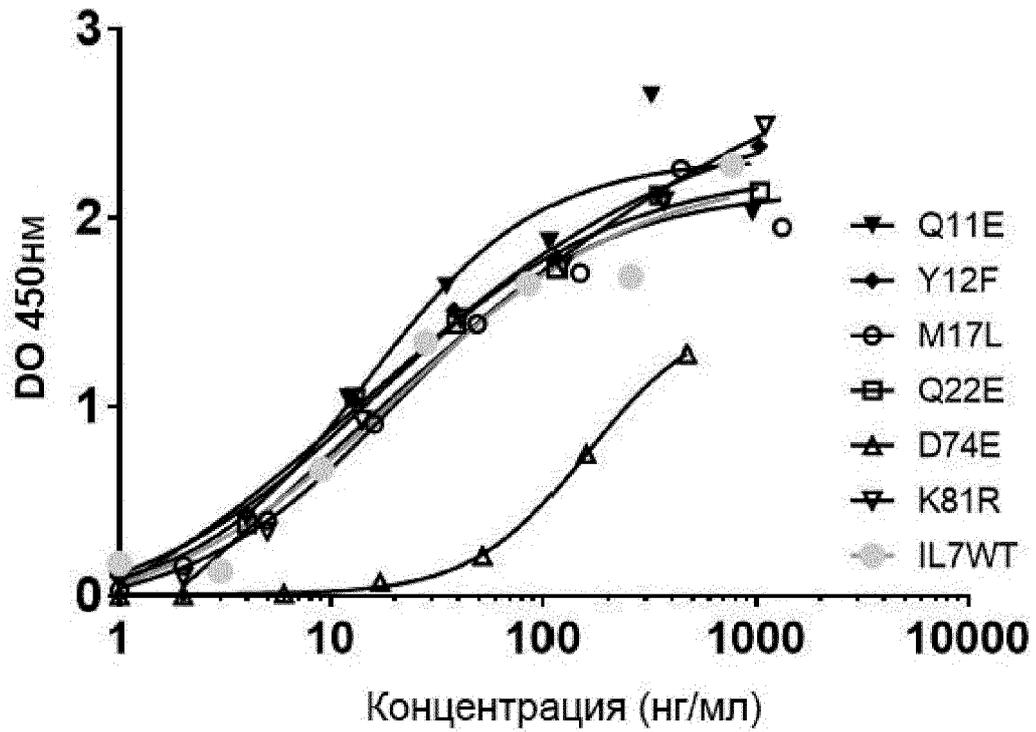
Фиг. 1А



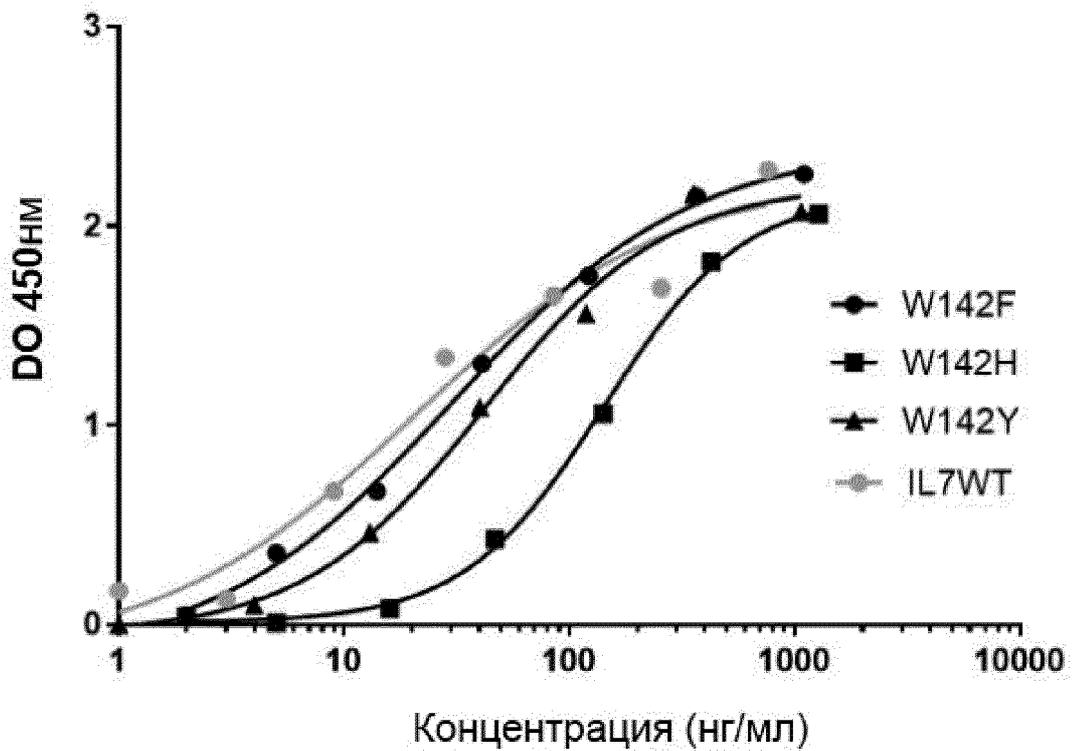
Фиг. 1В



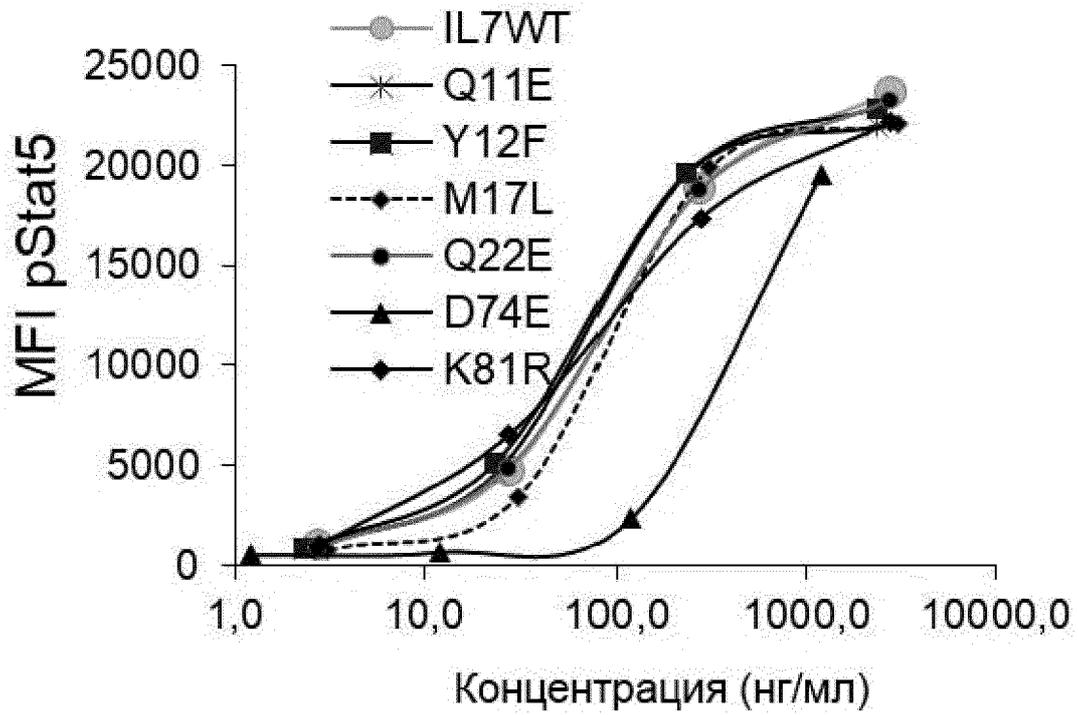
Фиг. 1С



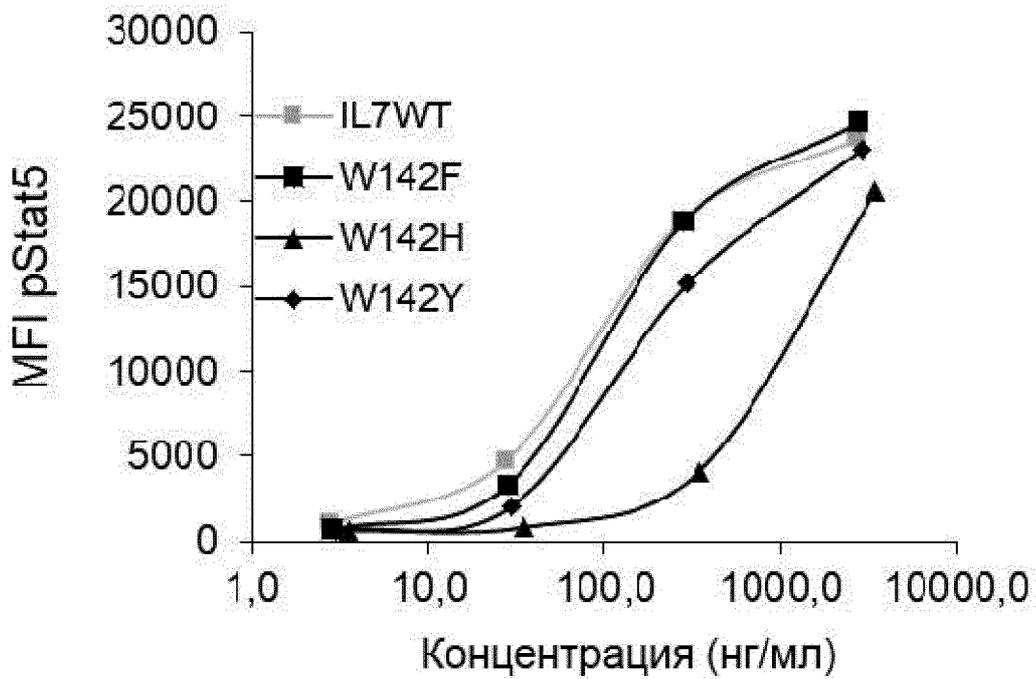
Фиг. 2А



Фиг. 2В

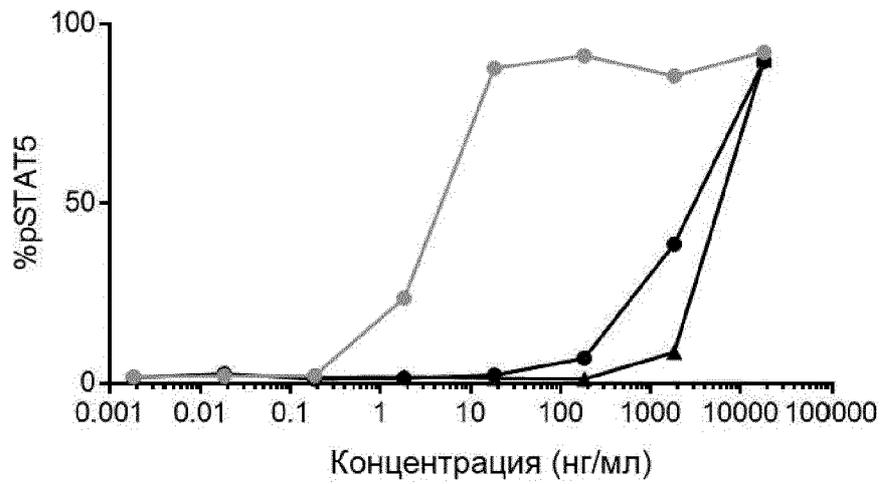


Фиг. 3А

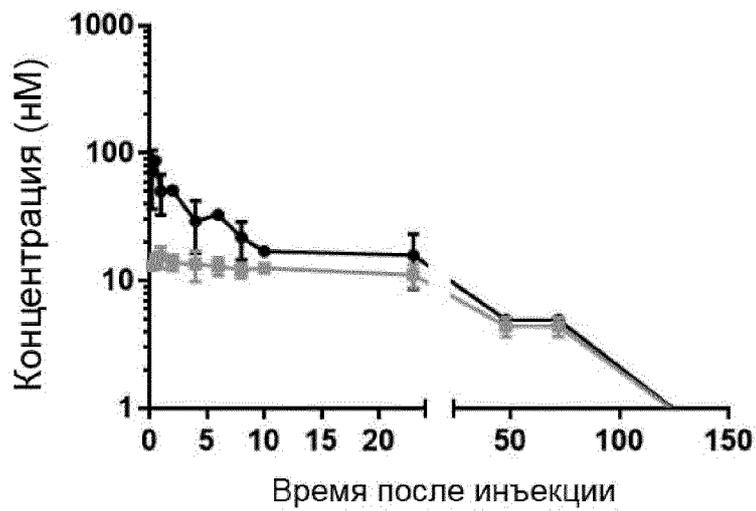


Фиг. 3В

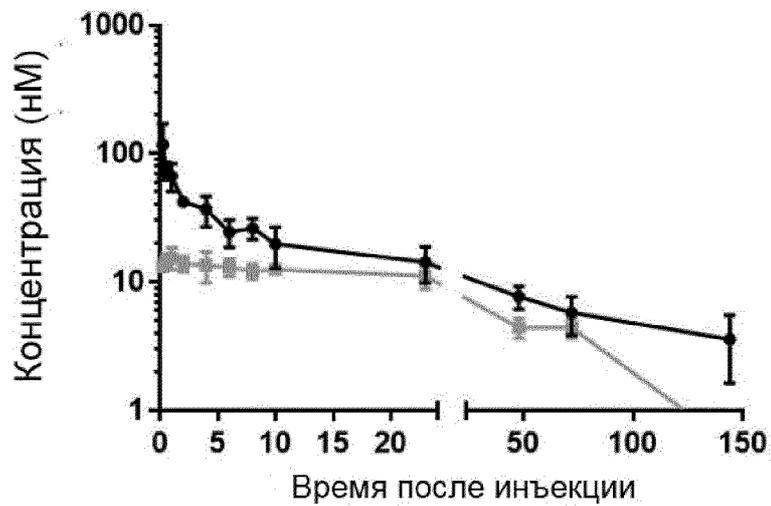
5/26



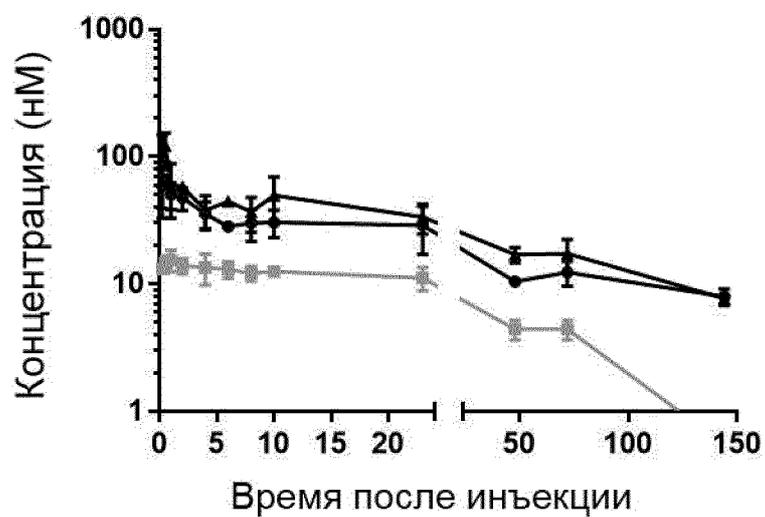
Фиг. 3С



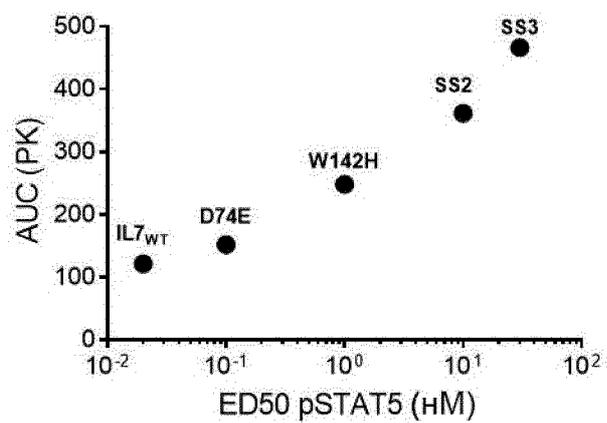
Фиг. 4А



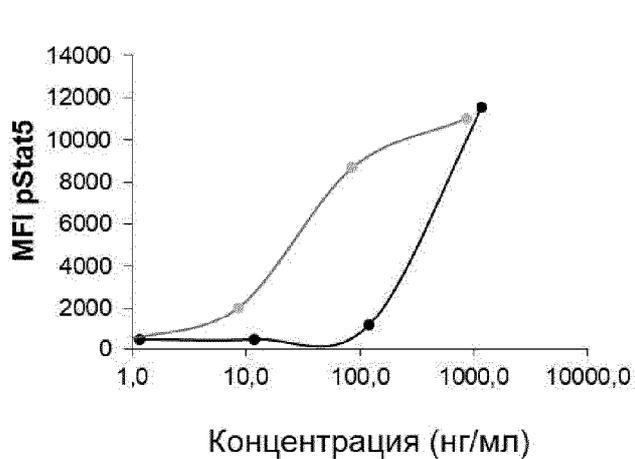
Фиг. 4В



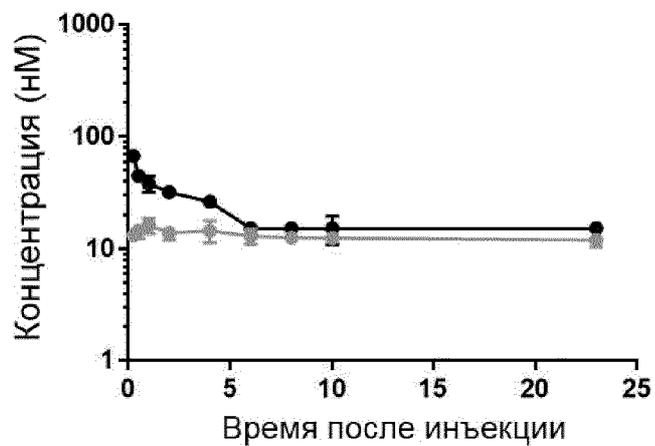
Фиг. 4С



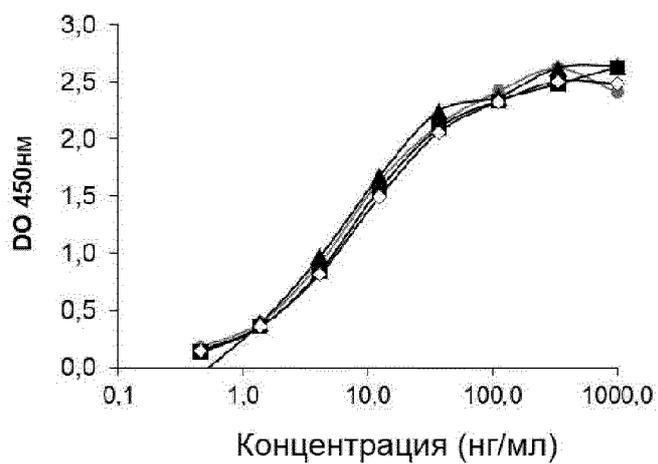
Фиг 4D



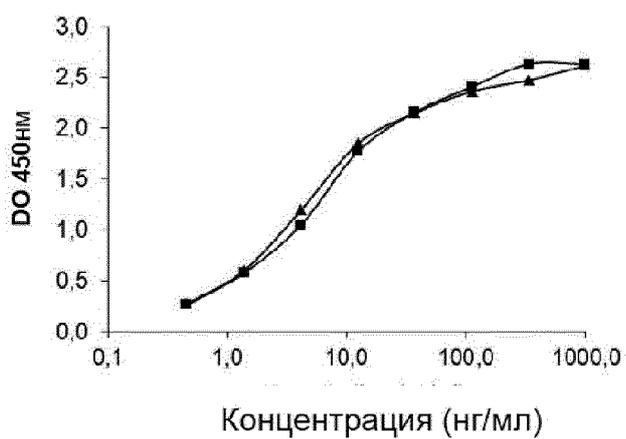
Фиг. 5А



Фиг. 5В

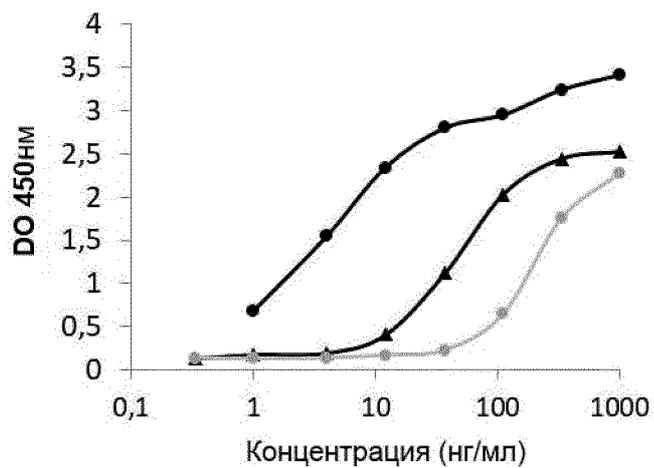


Фиг. 6А

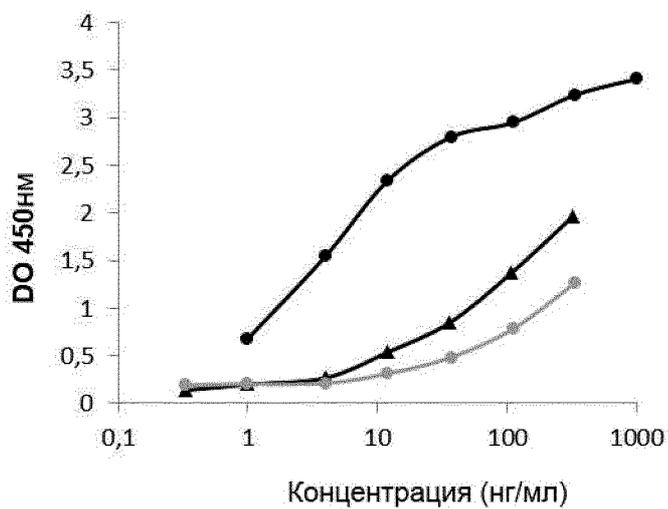


Фиг. 6В

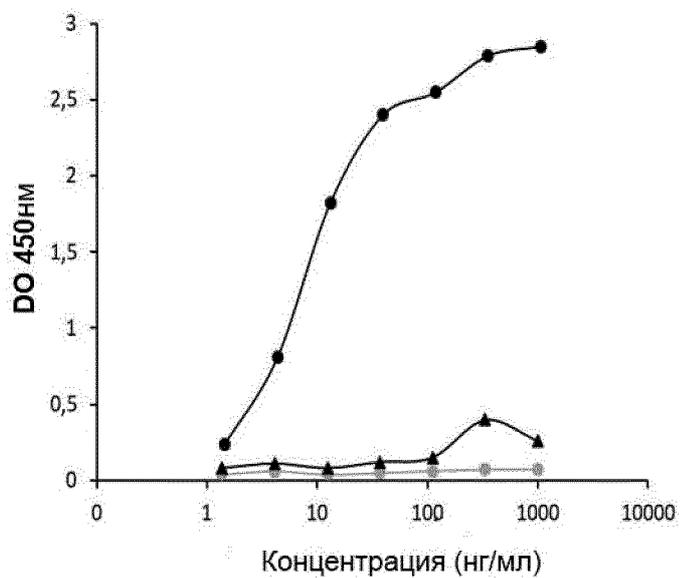
8/26



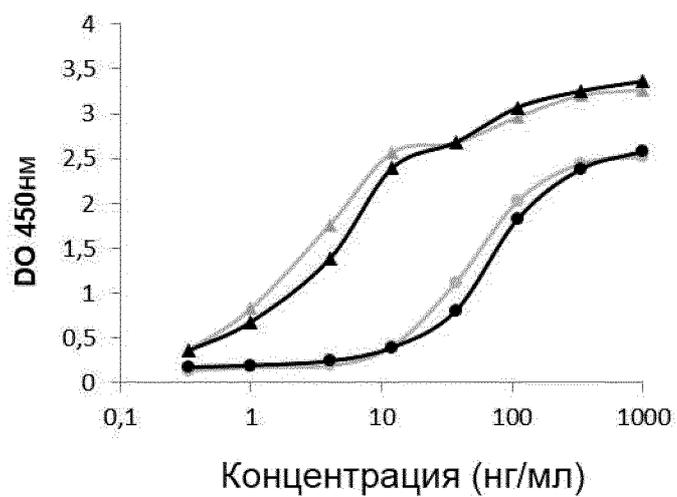
Фиг. 7А



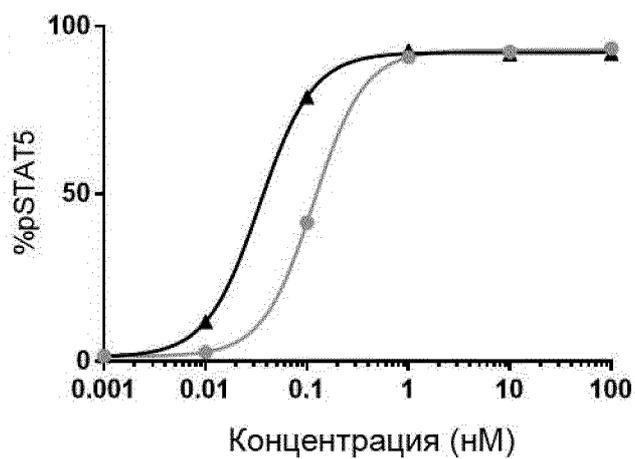
Фиг. 7В



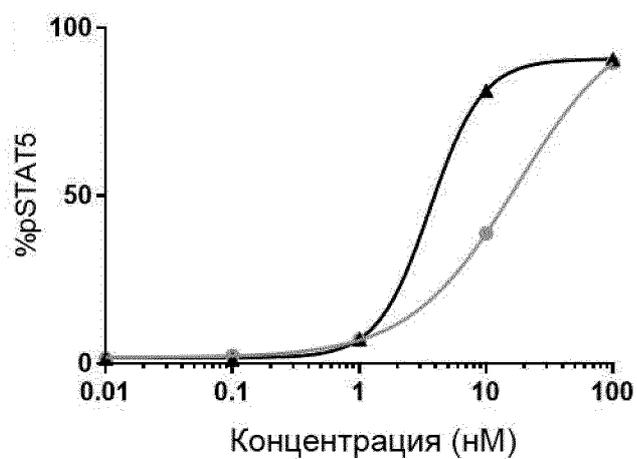
Фиг. 7С



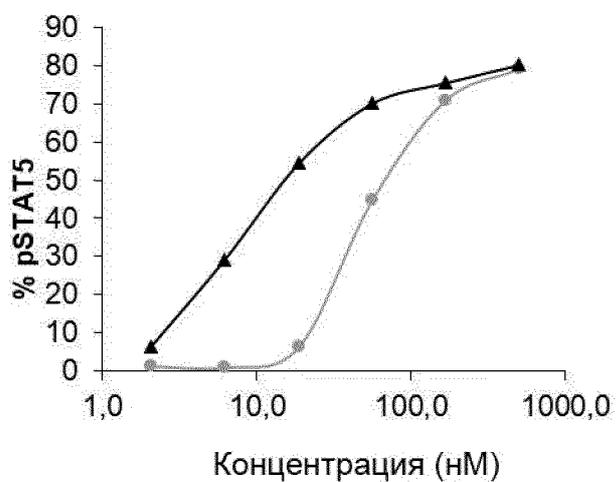
Фиг. 7D



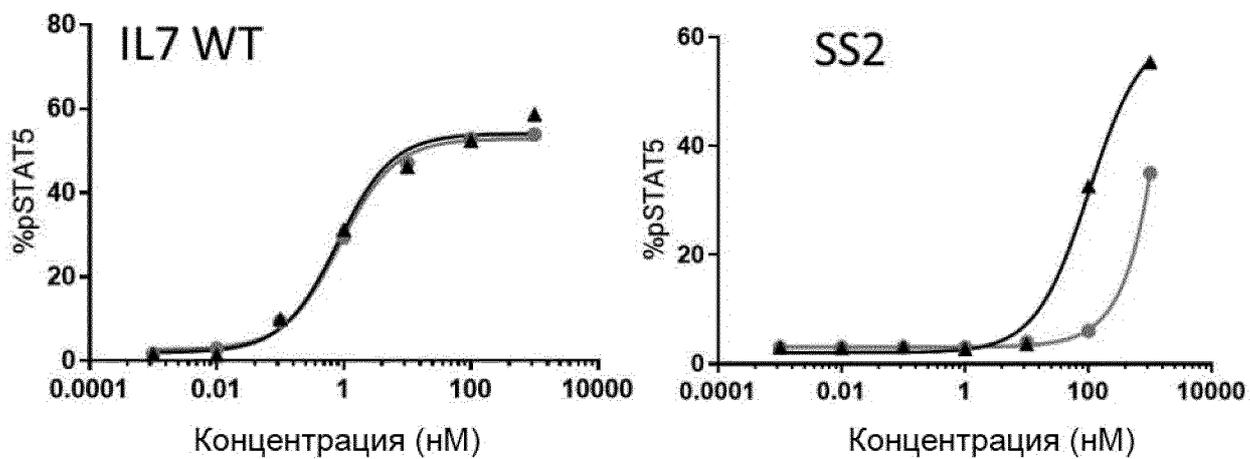
Фиг. 8А



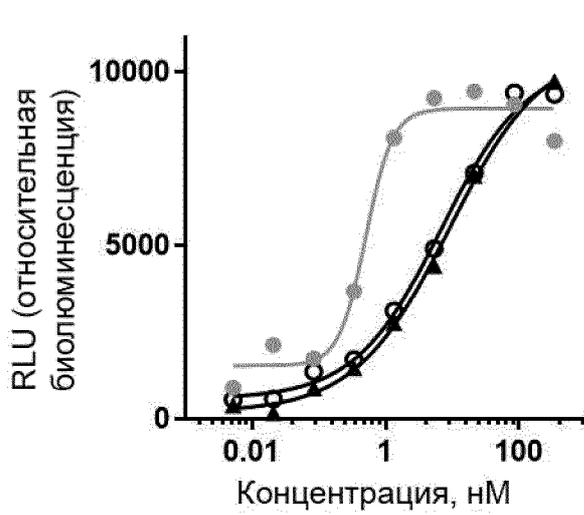
Фиг. 8В



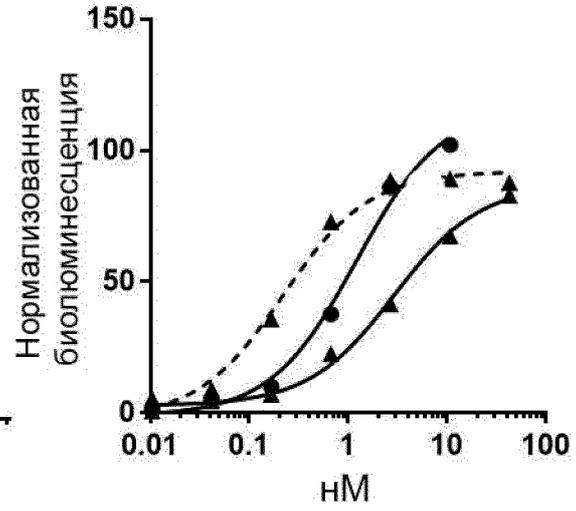
Фиг. 8С



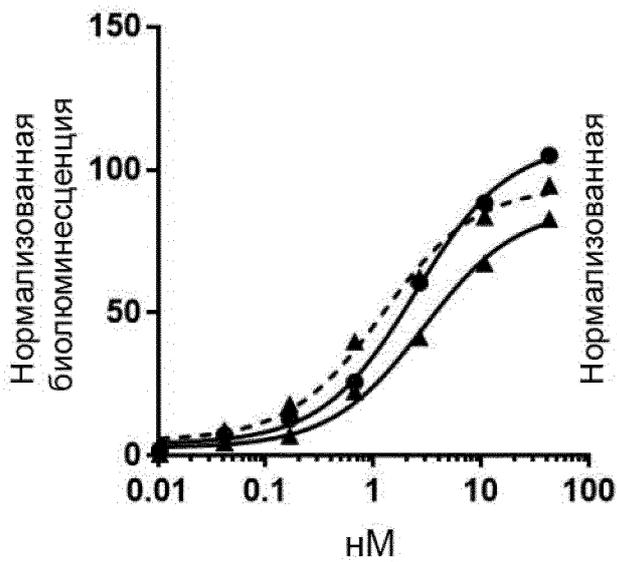
Фиг. 8D



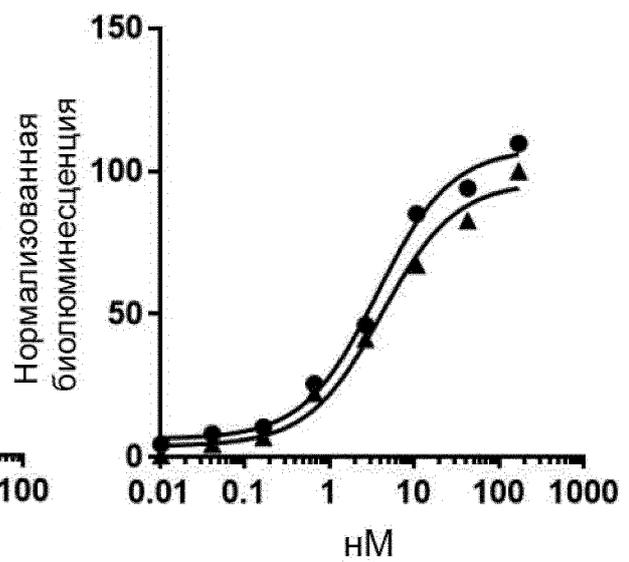
Фиг. 9А



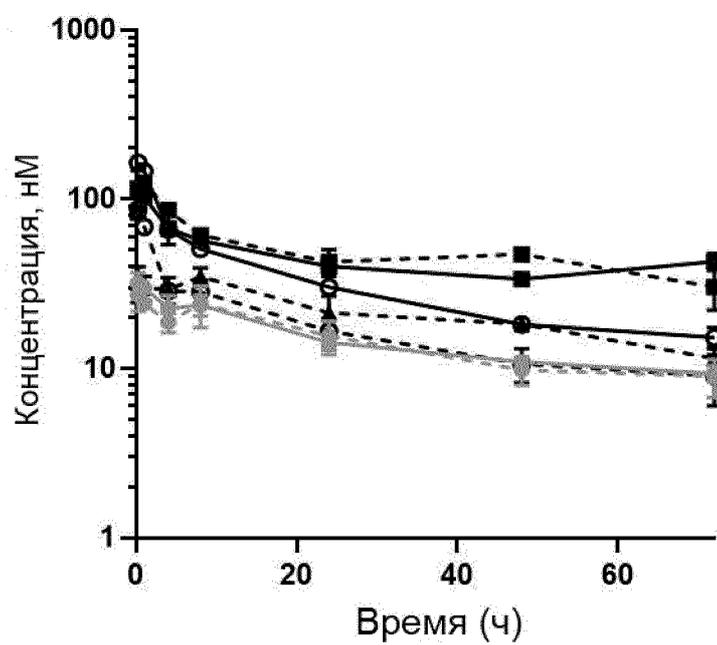
Фиг. 9В



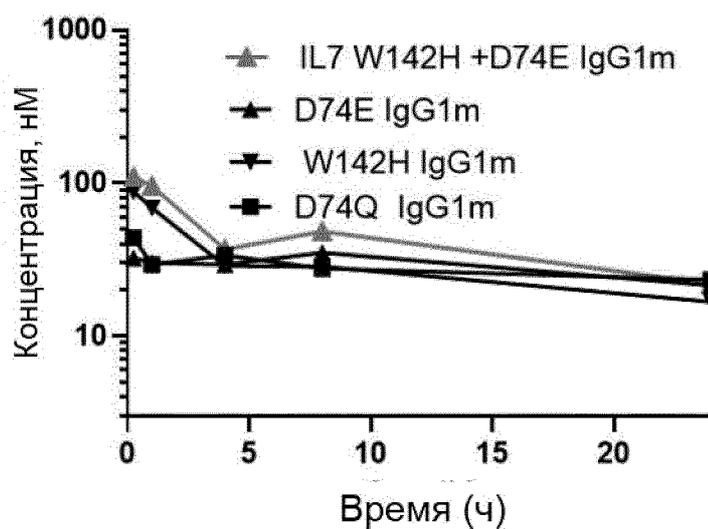
Фиг. 9С



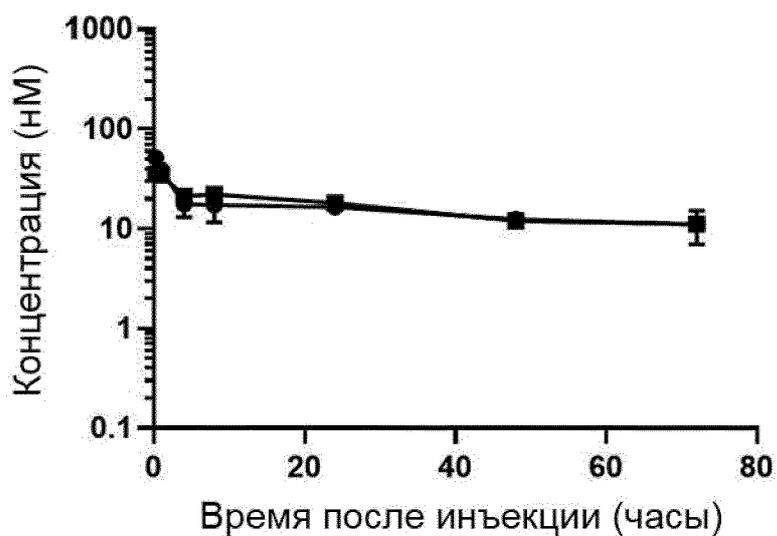
Фиг. 9D



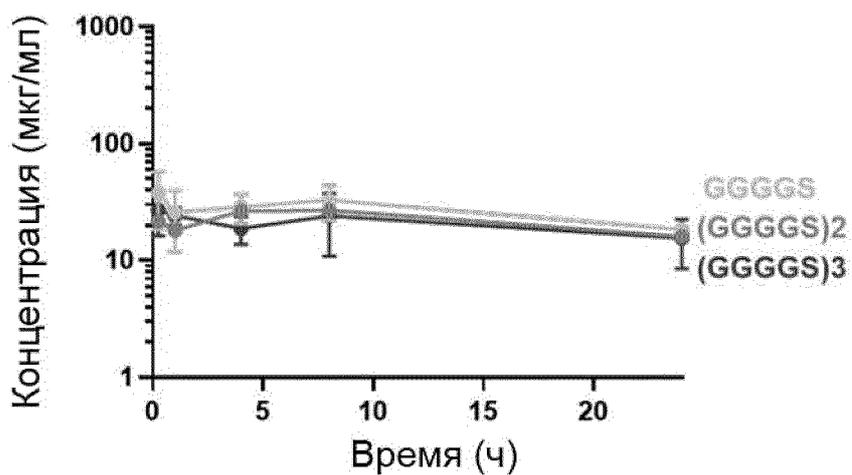
Фиг. 10А



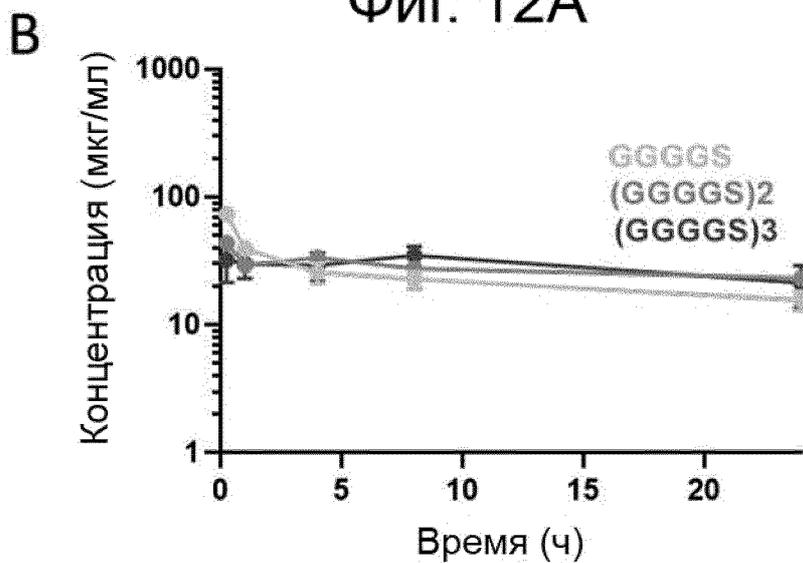
Фиг. 10В



Фиг. 11

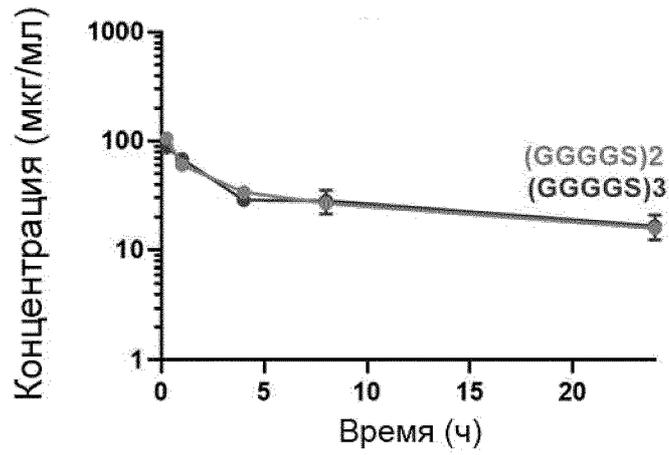


Фиг. 12А

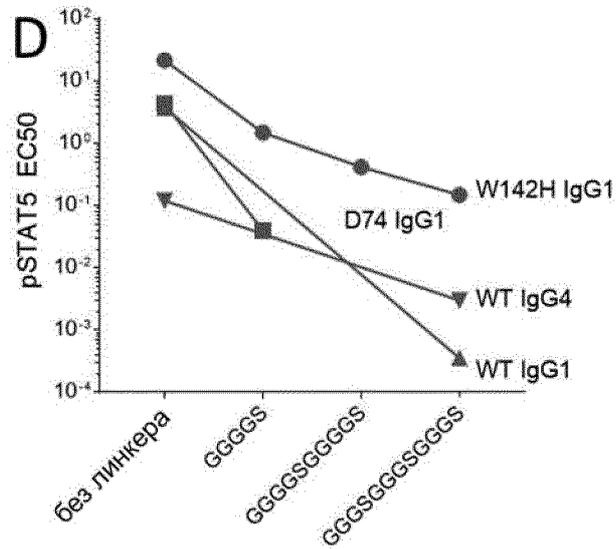


Фиг. 12В

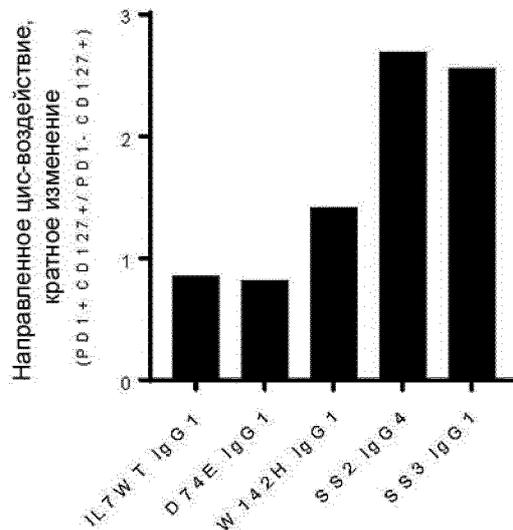
14/26



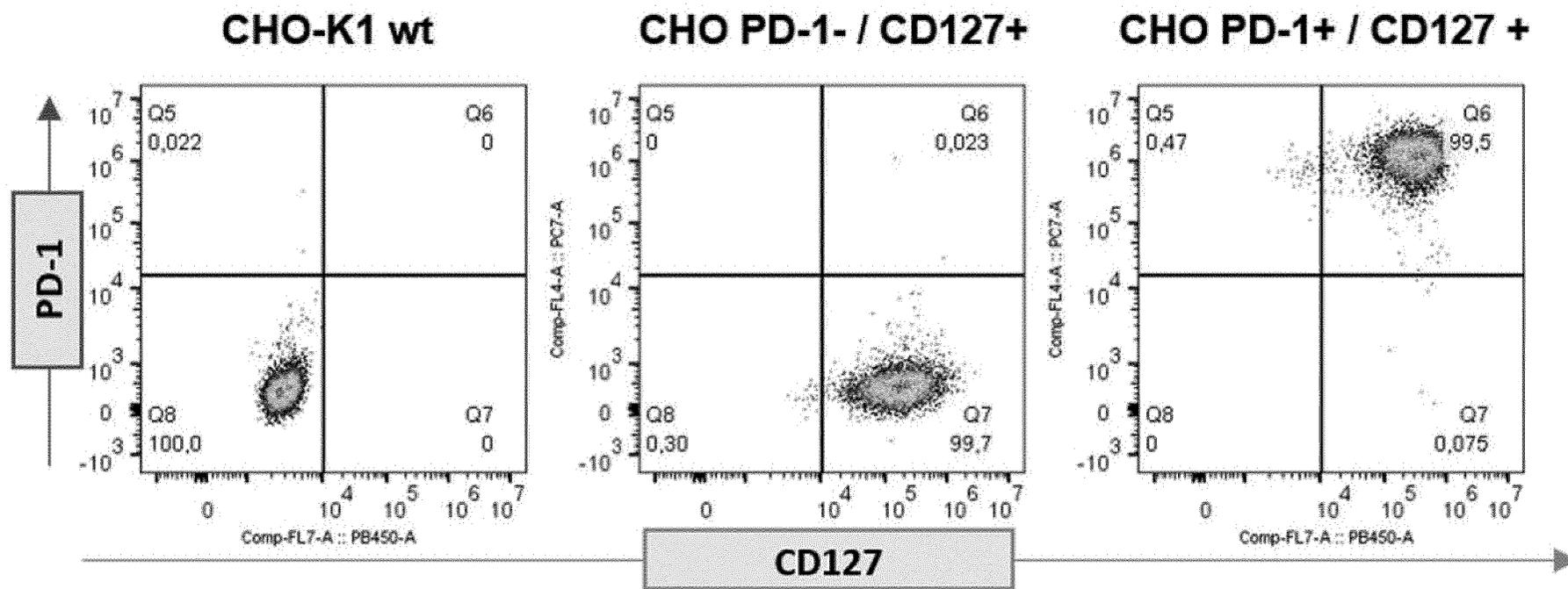
Фиг. 12С



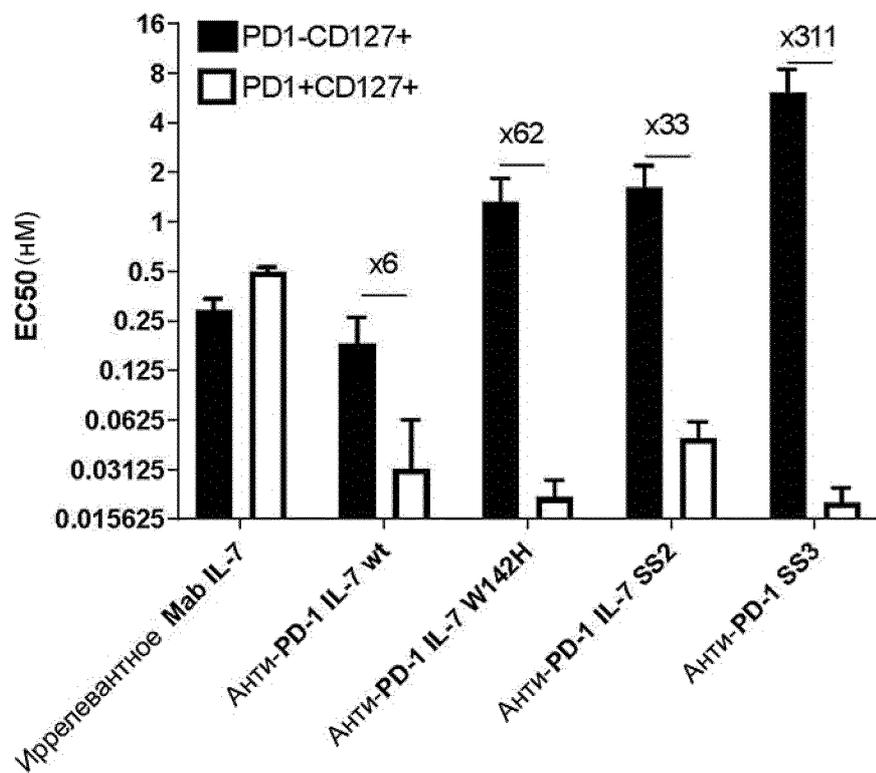
Фиг. 12D



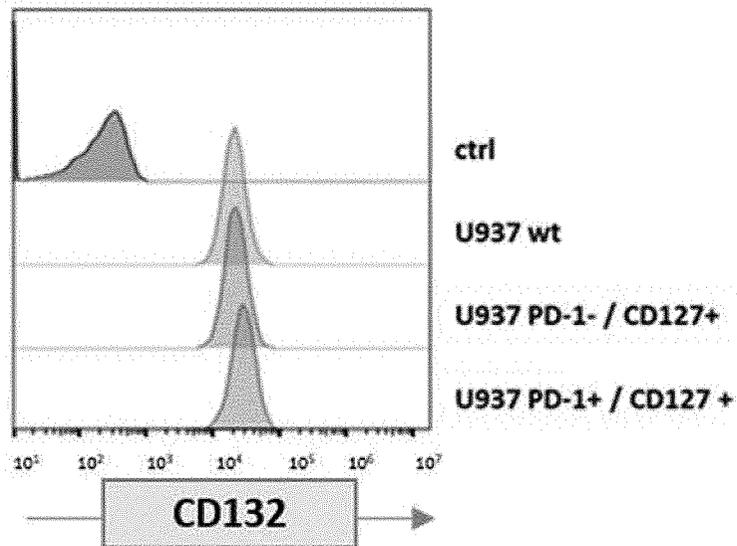
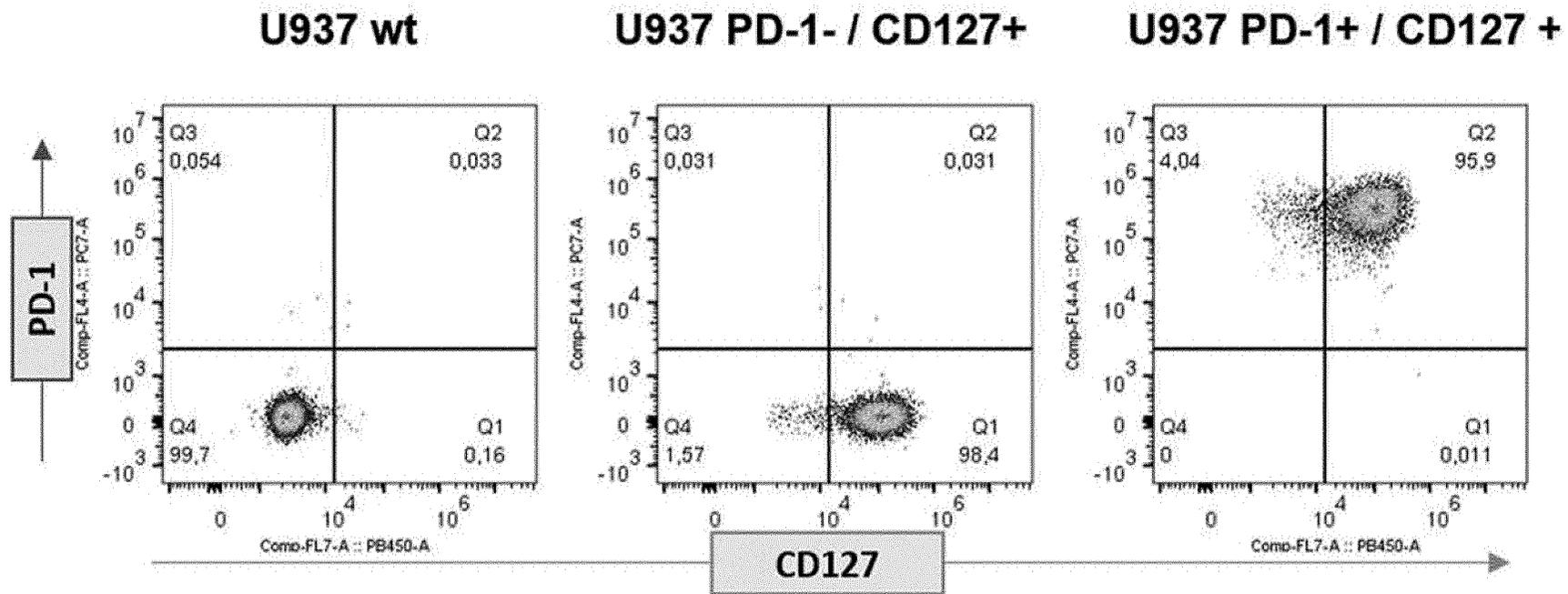
Фиг. 13



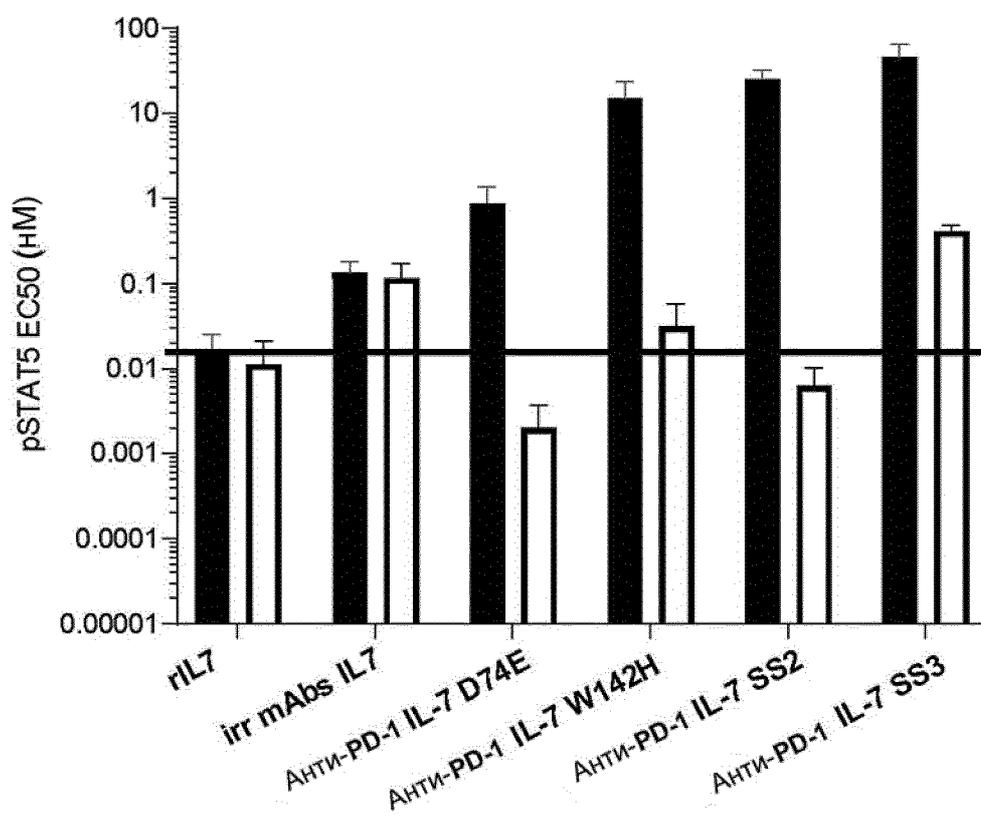
Фиг. 14А



Фиг. 14В

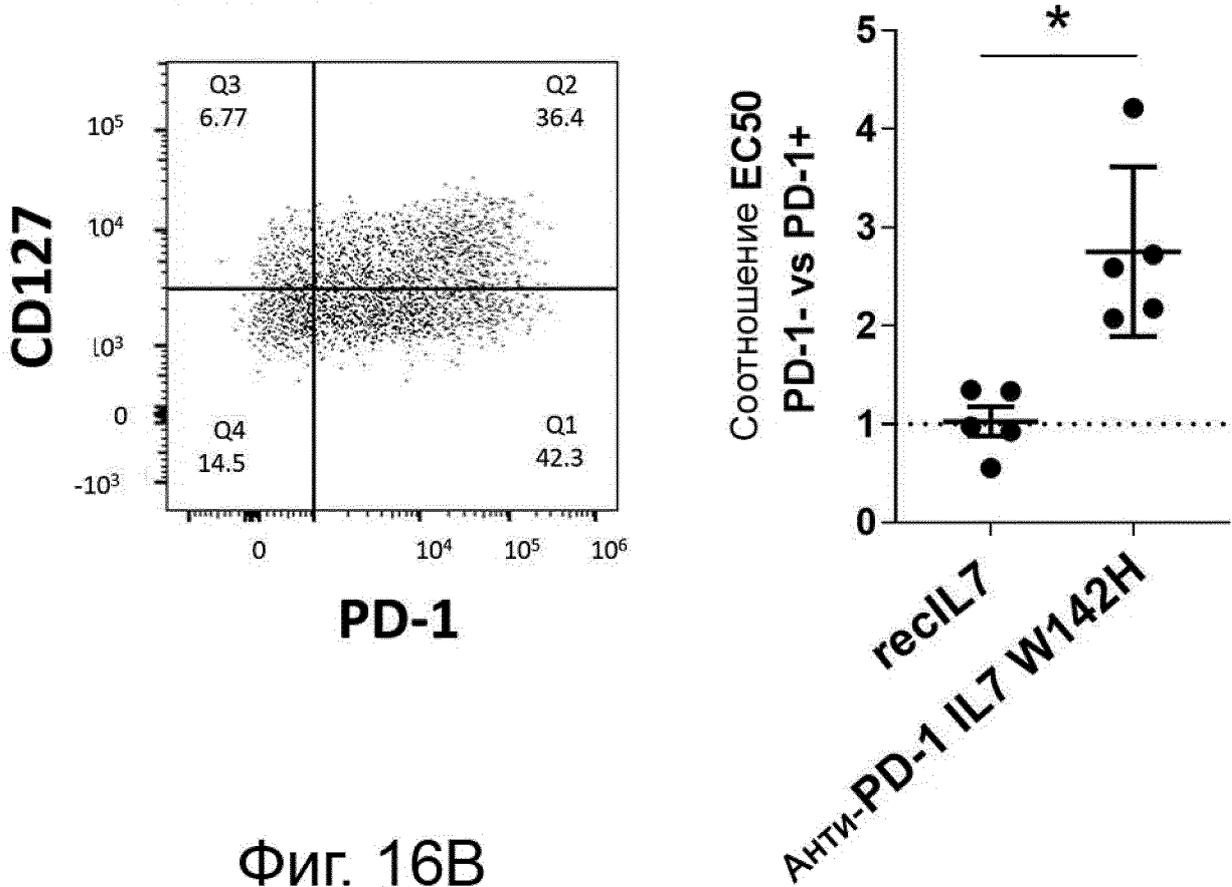


Фиг. 15А

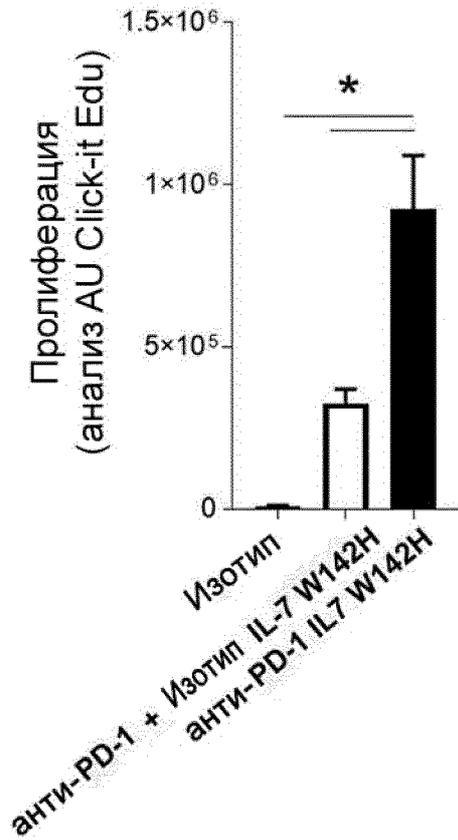


Фиг. 15В

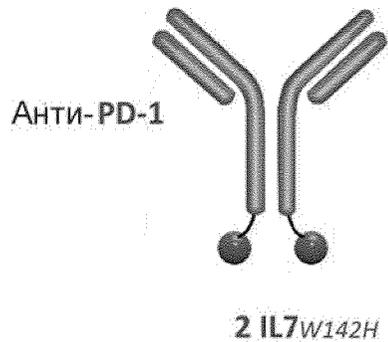
Фиг. 16А



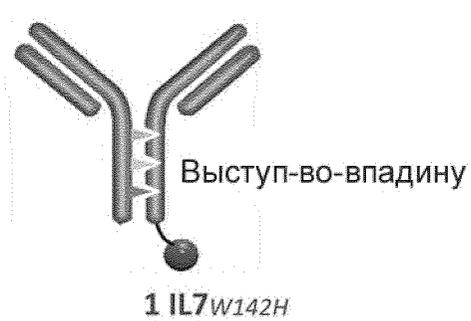
Фиг. 16В



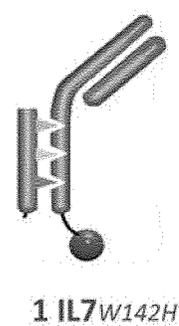
**Конструкция 1**  
Анти-PD-1\*2 IL7 W142H\*2



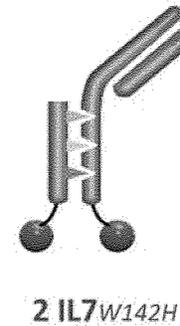
**Конструкция 2**  
Анти-PD-1\*2 IL7 W142H\*1



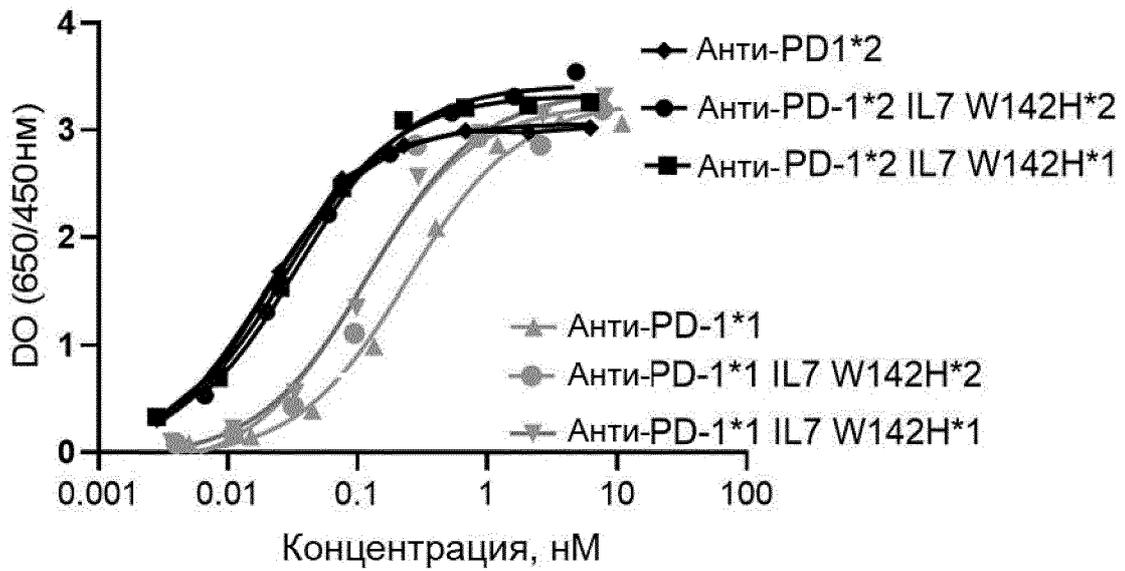
**Конструкция 3**  
Анти-PD-1\*1 IL7 W142H\*1



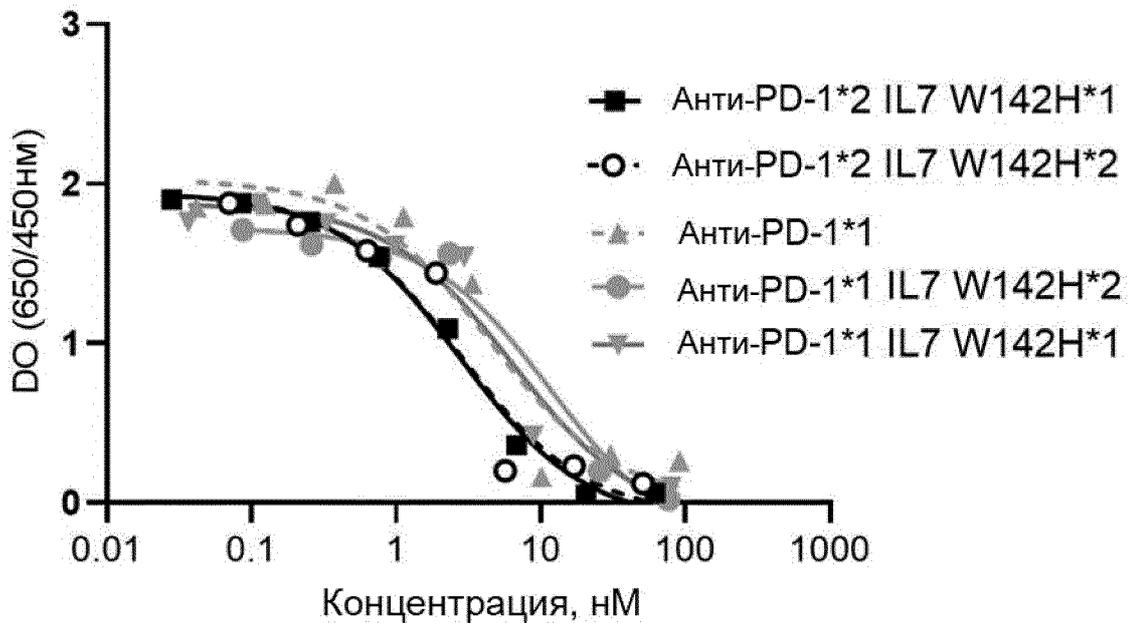
**Конструкция 4**  
Анти-PD-1\*1 IL7 W142H\*2



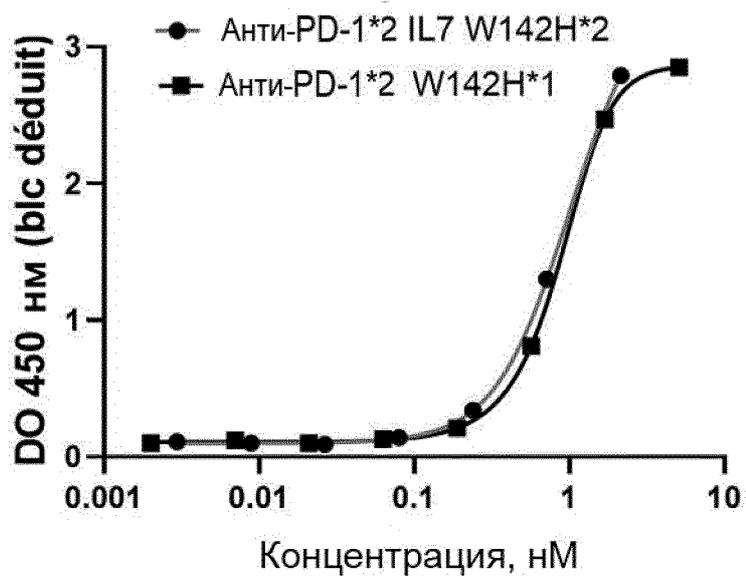
Фиг. 17



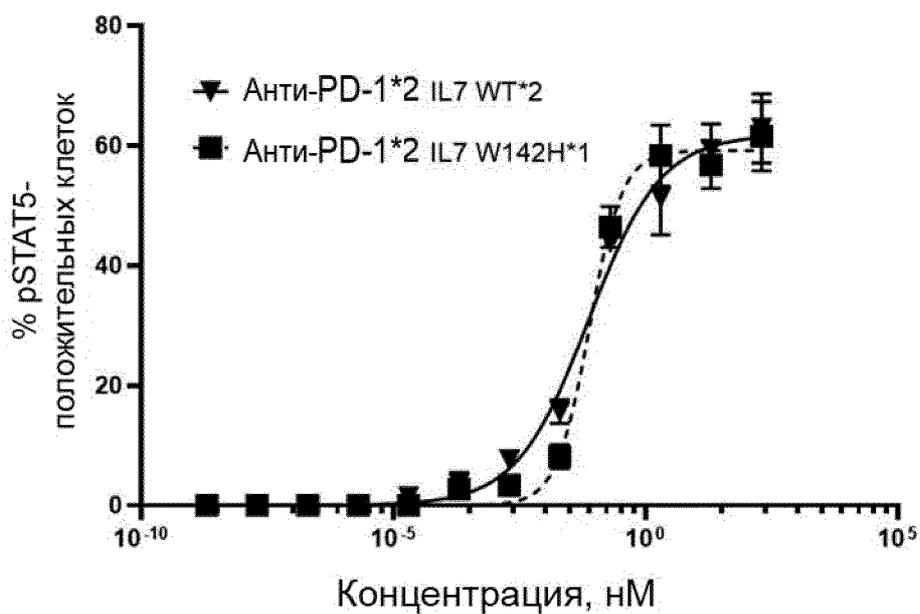
Фиг. 18А



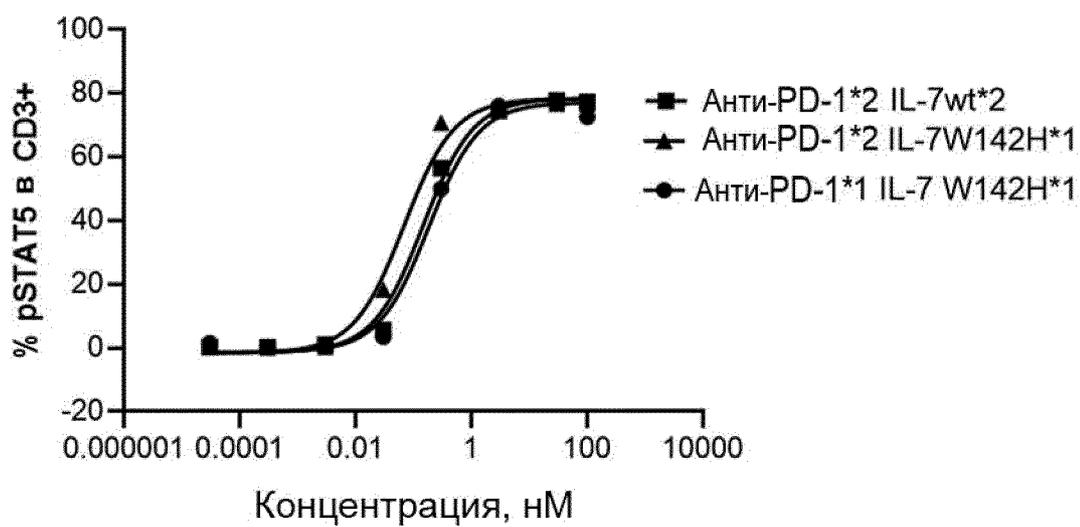
Фиг. 18В



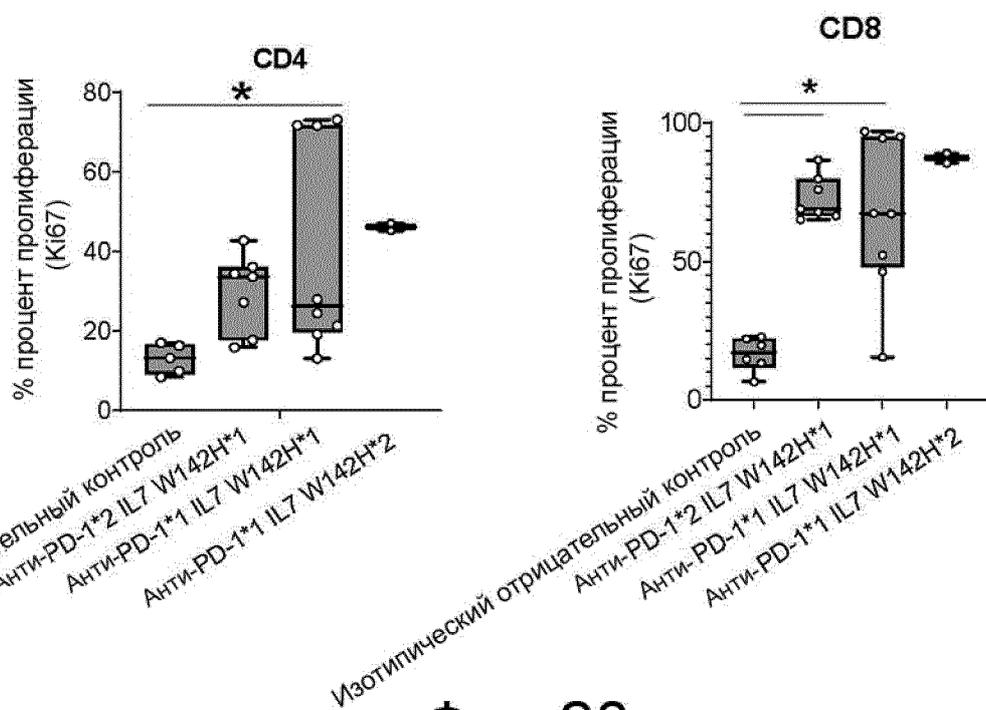
Фиг. 19А



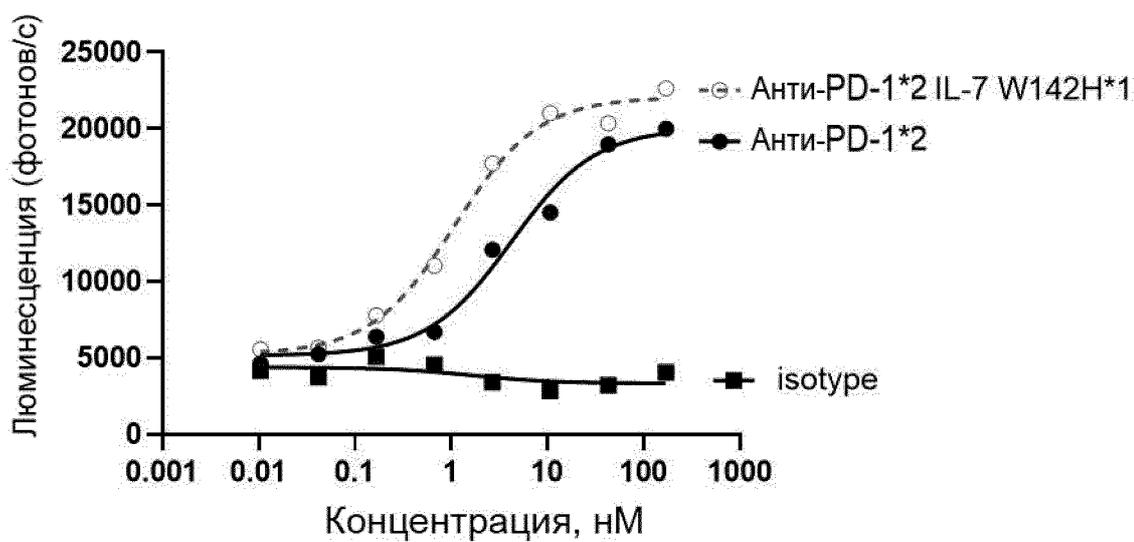
Фиг. 19В



Фиг. 19С

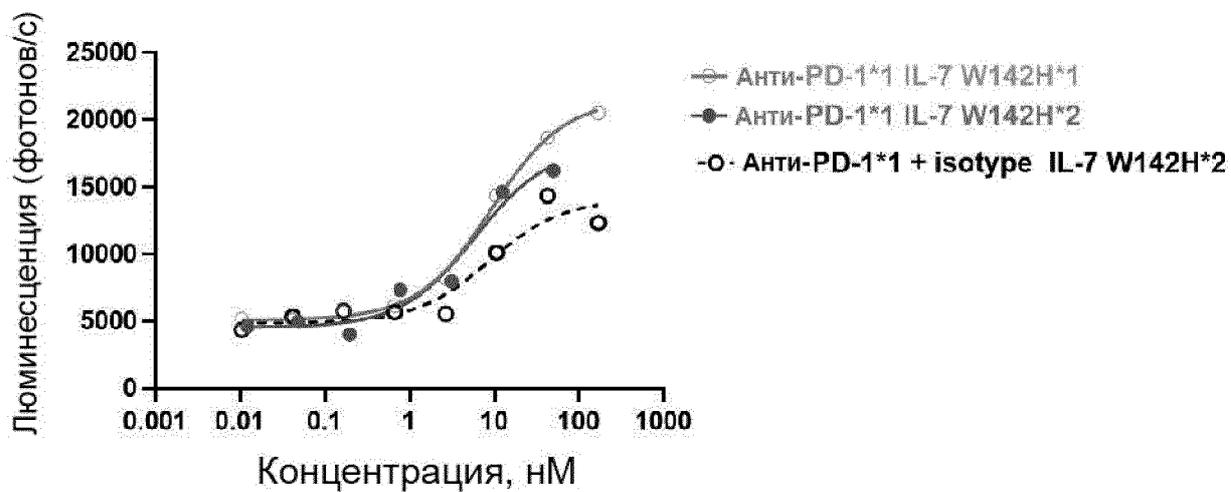


Фиг. 20



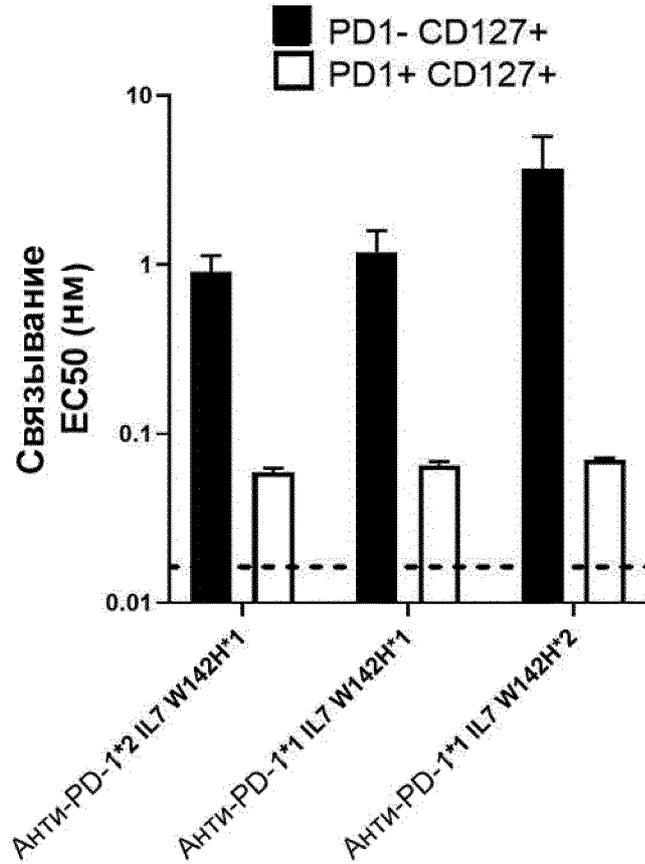
Фиг. 21А

В

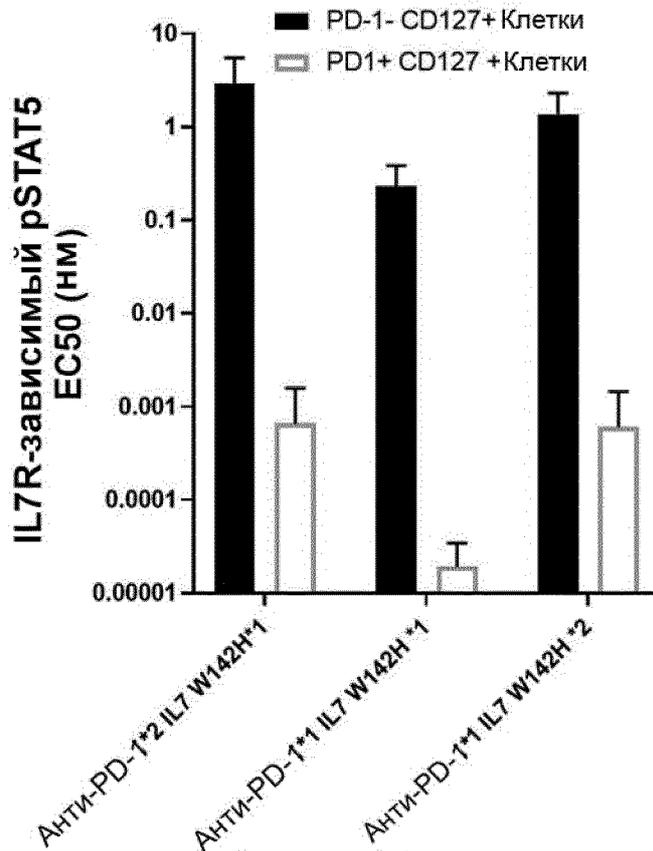


Фиг. 21В

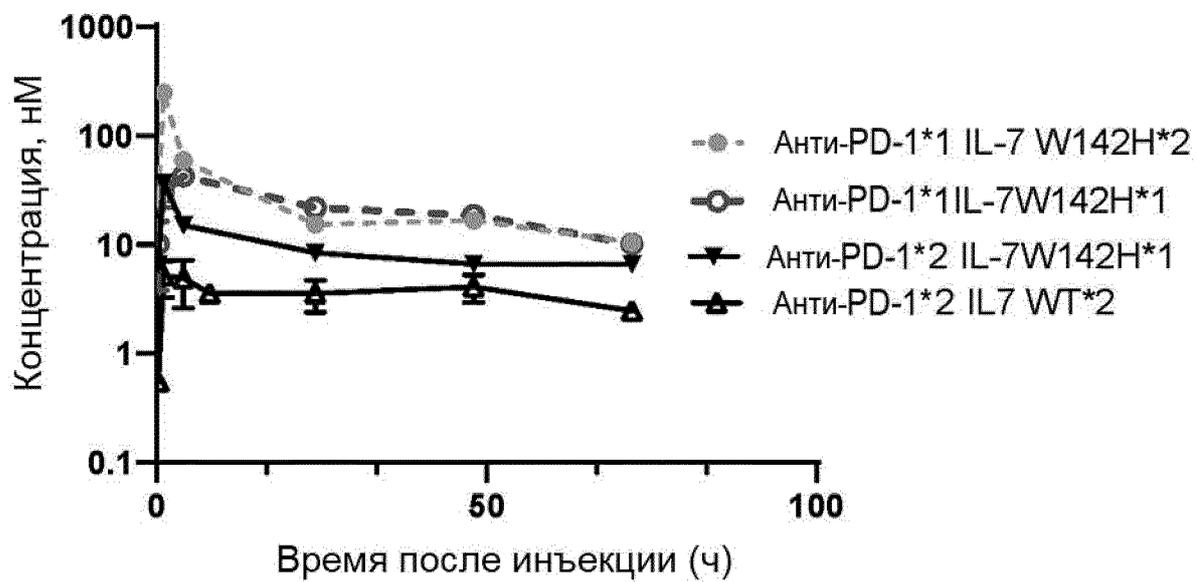
25/26



Фиг. 22А



Фиг. 22В



Фиг. 23