

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390318** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.02

(22) Дата подачи заявки
2020.12.02

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) СЛИТЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ ДВУХ ЦИТОКИНОВ, СОДЕРЖАЩИЕ IL-10

(31) **63/054,208**

(32) **2020.07.20**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/062907**

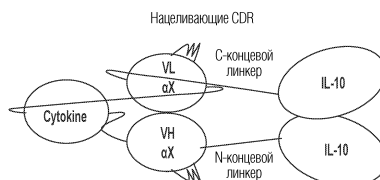
(87) **WO 2022/019945 2022.01.27**

(71) Заявитель:
ДЕКА БАЙОСАЙЕНСИЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Мамм Джон (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к слитому белку на основе двух цитокинов, фармацевтической композиции и/или их составу, содержащему IL-10 или варианты молекулы IL-10, слитые с каркасной системой одноцепочечного переменного фрагмента, и второй цитокин, где второй цитокин связан в шарнирной области scFv. Изобретение также относится к способам применения композиции слитого белка на основе двух цитокинов для лечения рака, воспалительных заболеваний и иммунных или опосредованных иммунной системой заболеваний или расстройств.



A1

202390318

202390318

A1

СЛИТЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ ДВУХ ЦИТОКИНОВ, СОДЕРЖАЩИЕ IL-10**Перекрестная ссылка на родственные заявки**

[001] Настоящая заявка заявляет приоритет заявки на патент США № 63/054208, поданной 20 июля 2020 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Область изобретения

[002] Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и, более конкретно, к новому слитому белку на основе двух цитокинов, содержащему интерлейкин-10 («IL-10») в комбинации с другими воспалительными и иммунорегуляторными цитокинами, способам лечения воспалительных и иммунных заболеваний и патологических состояний и/или способам лечения рака.

Введение

[003] IL-10, первоначально названный фактором, ингибирующим синтез цитокинов (Malefyt, Interleukin 10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes, 1991), является плеiotропным цитокином, который, как известно, подавляет воспалительную ответную реакцию (Fedorak, 2000), и позднее было установлено, что он активирует CD8⁺ Т-клетки для индукции зависимых от интерферона-γ («IFNγ») противоопухолевых иммунных ответов (Mumm J., 2011). IL-10 представляет собой нековалентный гомодимерный цитокин со структурным сходством с IFNγ. IL-10 связывается с рецептором IL-10, который состоит из двух субъединиц рецептора 1 IL-10 (IL10R1) и двух субъединиц рецептора 2 IL-10 (IL10R2) (Moore, 2001). Рецепторный комплекс IL-10 экспрессируется на поверхности большинства гемопоэтических клеток и на наиболее высоком уровне экспрессируется на макрофагах и Т-клетках. Несмотря на сообщения о том, что IL-10 является как иммуносупрессорным (Schreiber, 2000), так и иммуностимуляторным цитокином (Mumm, 2011), клиническая оценка лечения IL-10 пациентов с болезнью Крона привела к обратному дозозависимому эффекту (Fedorak, 2000; Schreiber, 2000), в то время как лечение онкологических пациентов пегилированным IL-10 приводило к дозозависимым сильным противоопухолевым ответам (Naing, 2018). Для противоопухолевого ответа пегилированного IL-10 требуются эндогенные CD8⁺ Т-клетки и IFNγ (Mumm, 2011). Обработка животных с опухолями пегилированным IL-10 приводит к увеличению количества интратуморальных CD8⁺ Т-клеток и увеличению IFNγ в расчете на клетку. Однако совсем недавно у онкологических больных, получавших пегилированный IL-10, были обнаружены признаки иммунной стимуляции, но не усиление противоопухолевого ответа (Spigel, 2020).

[004] Интерлейкин-2 («IL-2») представляет собой плеiotропный цитокин из четырехспиральных пучков, который, как известно, индуцирует противоопухолевые иммунные ответы (Jiang, 2016), но также проявляет высокую токсичность за счет неконтролируемой активации и секреции IFNγ естественными клетками-киллерами

(«NK») и CD4⁺ Т-клетками, а также экспансию регуляторных Т-клеток (Chinen, 2016). По этой причине многие группы исследователей пытались мутировать IL-2 для снижения его связывания с высокоаффинным рецептором для уменьшения токсичности IL-2 (Chen, 2018). Такие мутеины не привели к существенному клиническому успеху (Bentebibe, 2019). Это предполагает необходимость использования других механизмов для снижения потенциально летальной токсичности IL-2.

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

[006] Интерлейкин-4 («IL-4») представляет собой плейотропный цитокин из четырехспиральных пучков, считающийся типичным цитокином, регулирующим Th2 (McGuirk, 2000), который в основном связан с альтернативной регуляцией активации макрофагами (Balce, 2011). IL-4 преимущественно связан с регуляцией воспаления, ассоциированного с аллергическими реакциями и астмой (Steinke, 2001; Ryan, 1997). Кроме того, IL-4 лечит больных раком с хорошей переносимостью (Davis, 2009), благодаря способности IL-4 подавлять пролиферацию некоторых раковых клеток (Lee, 2016; Gooch, 1998). Несмотря на сообщения о том, что IL-4 подавляет секрецию провоспалительных цитокинов моноцитами (Woodward, 2012), он не считается сильнодействующим противовоспалительным цитокином за счет его способности праймировать антигенпрезентирующие клетки и стимулировать секрецию провоспалительных цитокинов моноцитами, подвергшимися воздействию бактерий (Varin, 2010).

[007] Неожиданно было обнаружено, что варианты IL-10 вируса Эпштейна-Барра («EBV») с одной и более аминокислотными заменами (в аминокислотных положениях 31, 75 или в обоих положениях аминокислотной последовательности зрелого EBV IL-10 с SEQ ID NO: 3) в ключевых областях связывающего домена с рецептором IL-10, изменяют способность EBV IL-10 связываться с рецептором IL-10 и активировать его. Такие модификации включали способность повышать аффинность EBV IL-10 к рецептору IL-10. Авторы изобретения обнаружили, что вариантные молекулы EBV IL-10 функционируют в качестве агонистов рецептора IL-10, которые способны оказывать лечебное действие в отношении иммунных заболеваний, воспалительных заболеваний и патологических состояний, и лечить рак. Авторы изобретения также обнаружили, что посредством включения мономерных вариантов EBV IL-10 в каркасную систему, содержащую неиммуногенные переменные области тяжелой цепи («VH») и переменные области легкой цепи («VL»), полученные вариантные молекулы EBV IL-10 имели пролонгированный период полураспада, были правильно сложенными и функционально активными. Варианты EBV IL-10, включенные в каркасную систему, продемонстрировали усиленную функцию IL-10 как на воспалительных клетках (например,

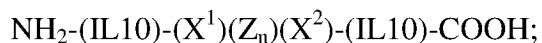
моноцитах/макрофагах/дендритных клетках), так и на иммунных клетках (например, CD8⁺ Т-клетках). См. патент США № 10858412; поданный 6 марта 2020 г. в виде заявки США 16/811718, которая включена здесь посредством ссылки в полном объеме. Настоящая заявка основана на модификации ранее описанной каркасной системы EBV IL-10 для доставки IL-10 и другого цитокина в виде части структуры нового слитого белка, которая аддитивно или синергически усиливает биологические свойства IL-10 для лечения воспалительных заболеваний, иммунных заболеваний и/или рака.

Сущность различных аспектов изобретения

[008] Настоящее изобретение, в общем, относится к слитому белку на основе двух цитокинов.

[009] Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку на основе двух цитокинов, содержащему IL-10 или варианты IL-10 в качестве первого цитокина, который слит с антигенсвязывающим фрагментом или вариабельной областью тяжелой цепи («VH») и вариабельной областью легкой цепи («VL») моноклонального антитела, и второй цитокин, где второй цитокин связан между VH- и VL-областями антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления первый цитокин представляет собой IL-10, такой как, не ограничиваясь этим, человека, мыши, цитомегаловируса («CMV») и EBV IL-10, или вариантную молекулу IL-10, где вариант IL-10 имеет одну или более аминокислотных замен, которые оказывают влияние на связывающие домены рецептора IL-10. Слитый белок также включает второй цитокин, который является цитокином, отличным от первого цитокина, который функционирует в тандеме с IL-10 и вариантной молекулой IL-10, так что в результате имеет место аддитивный и синергический эффект, когда первый и второй цитокины нацелены на специфический антиген слитым белком, имеющим пролонгированный период полураспада, VH- и VL-областями антигенсвязывающего фрагмента. Слитый белок также включает антитело, фрагмент антитела и антигенсвязывающий участок, содержащие VH- и VL-область, которая направляет слитый белок на основе двух цитокинов к антигену-мишени, распознаваемому VH- и VL-областью антитела, фрагмента антитела или их антигенсвязывающего участка. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv.

[0010] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку на основе двух цитокинов формулы (I):



где:

«IL-10» представляет собой мономер IL-10, где IL-10 представляет собой IL-10 человека, мыши, CMV или EBV IL-10 или их вариант, более предпочтительно IL-10 представляет собой мономер, содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 9, 10, 11, 12, 14 или 16;

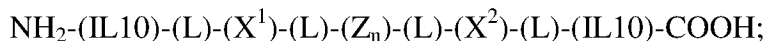
«X¹» представляет собой VH- и VL- область, полученную из первого моноклонального антитела; «X²» представляет собой VH- и VL-область, полученную из

первого моноклонального антитела; где, когда X^1 представляет собой VL, то X^2 представляет собой VH, или когда X^1 представляет собой VH, то X^2 представляет собой VL;

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

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

[0011] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку IL-10 формулы (II):



где:

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

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

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

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

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

[0012] В еще одних аспектах настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует слитый белок на основе двух цитокинов.

[0013] В еще одних аспектах настоящее изобретение относится к способам получения и очистки слитого белка на основе двух цитокинов. В одном варианте осуществления способ получения слитого белка на основе двух цитокинов включает рекомбинантную экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок на основе двух цитокинов.

[0014] В еще одних аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества слитого белка на основе двух цитокинов.

[0015] В еще одних аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительных заболеваний или состояний, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества слитого белка на основе двух цитокинов. Предпочтительно воспалительное заболевание представляет собой болезнь Крона, псориаз и/или ревматоидный артрит.

[0016] В еще одних аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения иммунных заболеваний или состояний, включающему введение субъекту, нуждающемуся

в этом, эффективного количества слитого белка на основе двух цитокинов.

[0017] В еще одних аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения, ингибирования и/или облегчения сепсиса и/или септического шока и ассоциированных с ними симптомов.

[0018] Приведенное выше упрощенное краткое изложение репрезентативных аспектов служит для обеспечения базового понимания настоящего раскрытия. Данное резюме не является обширным обзором всех предполагаемых аспектов и не предназначено ни для определения ключевых или критических элементов всех аспектов, ни для определения объема любого или всех аспектов настоящего раскрытия. Его единственная цель состоит в том, чтобы представить один или более аспектов в упрощенной форме в качестве введения к более подробному описанию изобретения, которое следует ниже. Для достижения вышеизложенного один или более аспектов настоящего изобретения включают в себя признаки, описанные и указанные в качестве примера в формуле изобретения.

Краткое описание фигур

[0019] На фиг. 1 приведено схематическое представление слитого белка на основе цитокина IL-10, описанного в патенте США № 10858412.

[0020] На фиг. 2 приведено схематическое представление слитого белка на основе двух цитокинов по настоящему изобретению, где слитый белок на основе двух цитокинов содержит связанные по концам мономеры IL-10 (или варианты IL-10), где второй цитокин включен в линкер между VH и VL scFv.

[0021] На фиг. 3 приведено схематическое представление слитого белка, содержащего два цитокина в альтернативной форме (названной «SLP-IL-2»), включающей DV07 (вариант EBV IL-10 с высокой аффинностью к рецептору IL-10), связанный с VH и VL scFv, и IL-2, где IL-2 слит с карбоксиконцом самого С-концевого мономера IL-10.

[0022] На фиг. 4 представлены данные исследования с титрацией, в котором сравнивали влияние SLP-IL-2 с IL-10, IL-2 и комбинацией IL-10 и IL-2 на процент снижения секреции TNF α из моноцитов/макрофагов.

[0023] На фиг. 5 представлены данные исследования с титрацией, в котором сравнивали влияние DK2¹⁰ с IL-10 и DegfrDV07 (вариант SLP 3; SEQ ID NO: 31) на процент снижения секреции TNF α из моноцитов.

[0024] На фиг. 6 представлены результаты анализа потенцирования Т-клеточного IFN γ , сравнивающего SLP и DK2¹⁰. Темно-серый столбец обозначает минимальную терапевтическую концентрацию обоих цитокинов в сыворотке, и светло-серый столбец обозначает ожидаемую необходимую терапевтическую концентрацию DK2¹⁰.

[0025] На фиг. 7 представлены результаты анализа для определения влияния IL-10 на NK-клетки, CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки в IL-2-опосредованной индукции IFN γ . Темно-серый столбец обозначает минимальную терапевтическую концентрацию обоих цитокинов в сыворотке, и светло-серый столбец обозначает ожидаемую необходимую терапевтическую концентрацию для DK2¹⁰.

[0026] На фиг. 8 представлены результаты анализа, определяющего влияние цитокинов на презентацию модельного антигена в Т-клеткам.

[0027] На фиг. 9 представлены результаты анализа, определяющего индукцию $\text{IFN}\gamma$ в CD4^+ и CD8^+ Т-клетках после воздействия антигена.

[0028] На фиг. 10 представлены данные исследования *in vivo* на опухолевой модели CT26 (hEGFR^+) на мышах, в котором сравниваются противоопухолевые эффекты у мышей, получавших Degfr:DV07 или DK2¹⁰.

[0029] На фиг. 11 представлены данные исследования *in vivo* на опухолевой модели CT26 (hEGFR^+) на мышах, в котором сравнивается масса тела мышей, обработанных Degfr:DV07 или DK2¹⁰.

[0030] На фиг. 12 представлены данные исследования *in vivo* на опухолевой модели CT26 (hEGFR^+) на мышах, в котором сравнивается выживаемость мышей, обработанных Degfr:DV07 и DK2¹⁰.

[0031] На фиг. 13 представлены данные исследования с титрацией эффекта IL-10, IL-4 и IL-10 и IL-4 на процент снижения секреции $\text{TNF}\alpha$ из моноцитов.

[0032] На фиг. 14 представлены данные исследования с титрацией эффекта IL-10, IL-4, IL-4 и DeboWtEBV и одного DeboWtEBV на процент снижения секреции $\text{TNF}\alpha$ из моноцитов.

[0033] На фиг. 15 представлен анализ потенцирования Т-клеточного $\text{IFN}\gamma$, в котором сравнивали DeboWtEBV и IL-4 с одним DeboWtEBV.

[0034] На фиг. 16 представлены данные исследования с титрацией, в котором оценивали влияние IL-10, IL-4, DeboDV06 и DeboDV06 в комбинации с IL-4 на подавление LPS-индуцированной секреции $\text{TNF}\alpha$ моноцитами/макрофагами.

[0035] На фиг. 17 приведено схематическое представление группы молекул, обозначенных как форма DK4¹⁰.

[0036] На фиг. 18 представлены данные исследования с титрацией, в котором оценивали влияние IL-4DeboDV06 в форме DK4¹⁰ (также известной как «4DeboDV06») в сравнении с IL-10, IL-4, DeboDV06 и IL-10 в комбинации с IL-4 на подавление LPS-индуцированной секреции $\text{TNF}\alpha$ моноцитами/макрофагами.

[0037] На фиг. 19 представлены данные исследования с титрацией, в котором оценивали влияние IL-4DeboDV06 в форме DK4¹⁰ (также известной как «4DeboDV06») в сравнении с IL-10, IL-4, DeboDV06 и DeboDV06 в комбинации с IL-4 на CD8^+ Т-клетки.

[0038] На фиг. 20 представлены данные исследования с титрацией, в котором оценивали влияние IL-4HADeglymCD14DV06 и IL-4HADeglymCD14DV07, которые являются членами группы молекул DK4¹⁰, включающих негликозилированную (N38A) и высокоаффинную (T13D) форму человеческого IL-4, и сравнивали с IL-10, IL-4 и IL-4DeboDV06 (также известный как «4DeboDV06») в форме DK4¹⁰ в отношении подавления LPS-индуцированной секреции $\text{TNF}\alpha$ макрофагами/моноцитами.

[0039] На фиг. 21 представлены данные исследования с титрацией, в котором оценивали IL-4ngDmCD14DV06 и IL-4ngDmCD14DV07, которые являются членами

группы молекул DK4¹⁰, содержащих одну замену в N38A, приводящую к негликозилированной форме IL4, и сравнивали с IL-10 в отношении подавления LPS-индуцированной секреции TNF α моноцитами/макрофагами.

[0040] На фиг. 22 представлены данные исследования с титрацией, в котором оценивали IL-4ngDmCD14DV06 и IL-4ngDmCD14DV07, которые являются членами группы молекул DK4¹⁰, содержащих одну замену в N38A, приводящую к негликозилированной форме IL4, и сравнивали с IL-10 в отношении IFN γ -опосредованной индукции CD8⁺ Т-клетками.

[0041] На фиг. 23 представлены данные исследования с титрацией, в котором оценивали IL-4ngDmMAdCAMDV06, которые являются членами группы молекул DK4¹⁰, содержащих одну замену в N38A, приводящую к негликозилированной форме IL4, и сравнивали с IL-10 в отношении подавления LPS-индуцированной секреции TNF α моноцитами/макрофагами.

[0042] На фиг. 24 представлены данные исследования с титрацией, в котором оценивали IL-4ngDmMAdCAMDV06, которые являются членами группы молекул DK4¹⁰, содержащих одну замену в N38A, приводящую к негликозилированной форме IL4, и сравнивали с IL-10 в отношении IFN γ -опосредованной индукции CD8⁺ Т-клетками.

[0043] На фиг. 25 представлены данные исследования на модели сепсиса *in vivo* на мышах, в котором сравнивали выживаемость мышей, обработанных IL-4ngDmMAdCAMDV06, до и после введения LPS.

Подробное описание изобретения

[0044] Примерные аспекты описаны в настоящем документе в контексте слитого белка на основе двух цитокинов, содержащего IL-10, способов получения слитого белка на основе двух цитокинов, содержащего IL-10, и способов применения слитого белка на основе двух цитокинов, содержащего IL-10, для лечения воспалительных заболеваний или состояний, иммунных заболеваний или состояний, лечения и/или профилактики рака. Специалистам в данной области должно быть понятно, что последующее описание является только иллюстративным и никоим образом не предназначено для ограничения. Другие аспекты будут легко понятны специалистам в данной области техники, имеющим преимущество настоящего раскрытия. Теперь будет сделана подробная ссылка на осуществление иллюстративных аспектов, как показано на прилагаемых чертежах. Одни и те же ссылочные указатели будут использоваться, насколько это возможно, на всех чертежах и в последующем описании для обозначения одних и тех же или подобных элементов.

[0045] Несмотря на то, что ряд способов и материалов, подобных или эквивалентных тем, которые описаны в настоящем документе, могут быть использованы при практическом применении различных описанных вариантов осуществления, в настоящем документе описаны предпочтительные материалы и способы.

[0046] Если не указано иное, то в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, используются общепринятые способы и методики молекулярной

биологии, биохимии, фармакологии, химии и иммунологии, хорошо известные специалистам в данной области. Многие из общих методов конструирования и получения вариантов IL-10, включая, помимо прочего, формы IL-10 человека, мыши, CMV и/или EBV, а также анализы для тестирования вариантов IL-10, представляют собой хорошо известные способы, которые легко доступны и подробно описаны в данной области техники. См., например, Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I- IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., текущее дополнение). Химия пэгилирования на основе N-концевого альдегида также хорошо известна в данной области.

Определения

[0047] Следующие термины будут использоваться для описания различных вариантов осуществления, обсуждаемых в настоящем документе, и подразумевается, что они определяются, как указано ниже.

[0048] В рамках настоящего изобретения, при описании различных вариантов осуществления формы единственного числа «а», «an» и «the» включают ссылки во множественном числе, если по контексту явно не требуется иное.

[0049] Термин «примерно» относится к отклонению в пределах 0,0001-5% от указанного числа или диапазона чисел. В одном варианте осуществления термин «примерно» относится к отклонению в пределах 1-10% от указанного числа или диапазона чисел. В одном варианте осуществления термин «примерно» относится к отклонению до 25% от указанного числа или диапазона чисел. В более конкретном варианте осуществления термин «примерно» относится к различию в пределах 1-25% в отношении гомологии нуклеотидной последовательности или гомологии аминокислотной последовательности по сравнению с последовательностью дикого типа.

[0050] Термин «интерлейкин-10» или «IL-10» относится к белку, содержащему две субъединицы, нековалентно соединенные с образованием гомодимера, где IL-10 представляет собой интеркалированный димер из двух шестиспиральных пучков (спирали A-F). В рамках настоящего изобретения, если не указано иное, то «интерлейкин-10» и «IL-10» относятся к любой форме IL-10, включая, помимо прочего, белок человеческого IL-10 («hIL-10»; идентификационный номер Genbank NP_000563; или патент США № 6217857) (SEQ ID NO: 1) или нуклеиновая кислота (SEQ ID NO: 2); белок мышинового IL-10 («mIL-10»; идентификационный номер Genbank: M37897 или патент США № 6217857) (SEQ ID NO: 7) или нуклеиновая кислота (SEQ ID NO: 8); или вирусный IL-10 («vIL-10»). Гомологи вирусного IL-10 могут быть получены из EBV или CMV (идентификационные номера Genbank NC_007605 и DQ367962 соответственно). Термин EBV-IL10 относится к гомологу EBV белка IL-10 (SEQ ID NO: 3) или нуклеиновой кислоте (SEQ ID NO: 4). Термин CMV-IL10 относится к гомологу CMV белка IL-10 (SEQ ID NO: 5) или нуклеиновой кислоте (SEQ ID NO: 6). Термин «мономерный» или «мономер» IL-10,

используемый здесь, относится к отдельным субъединицам IL-10 или вариантному IL-10, которые при нековалентном связывании образуют гомодимер IL-10 или вариантный IL-10. Термины «дикий тип», «дт» и «нативный» используются здесь взаимозаменяемо для обозначения последовательности белка (например, IL-10, CMV-IL10 или EBV IL-10), которая обычно встречается в природе у конкретного рассматриваемого IL-10 разных видов. Например, термин EBV IL-10 «дикого типа» или «нативный», таким образом, будет соответствовать аминокислотной последовательности, наиболее часто встречающейся в природе.

[0051] Термины «вариант», «аналог» и «мутеин» относятся к биологически активным производным референсной молекулы, которые сохраняют желаемую активность, например, такую как противовоспалительная активность. Как правило, термины «вариант», «варианты», «аналог» и «мутеин» применительно к полипептиду относятся к соединению или соединениям, имеющим нативную полипептидную последовательность и структуру с одной или более аминокислотными добавлениями, заменами (которые могут быть консервативными по своей природе) и/или делециями относительно нативной молекулы. По существу, термины «вариант IL-10», «вариантный IL-10», «молекула вариантного IL-10», а также их грамматические вариации и формы во множественном числе считаются эквивалентными терминами, которые относятся к аминокислотной последовательности IL-10 (или нуклеиновой кислоты), которая отличается от IL-10 дикого типа примерно на 1-25% по идентичности или гомологии последовательности. Так, например, молекула варианта EBV IL-10 представляет собой молекулу, которая отличается от EBV IL-10 дикого типа наличием одной или более аминокислотных (или нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислоту) добавлений, замен и/или делеций. Таким образом, в одной форме вариант EBV IL-10 представляет собой вариант, который отличается от последовательности дикого типа SEQ ID NO: 3 тем, что имеет примерно от 1% до 25% различий в гомологии последовательностей, что составляет примерно 1-42 аминокислотных различия. В одном варианте осуществления вариант IL-10 представляет собой EBV IL-10, содержащий аминокислотную мутацию V31L («DV05»; SEQ ID NO: 12), аминокислотную мутацию A75I («DV06»; SEQ ID NO: 14), или аминокислотные мутации как V31L, так и A75I («DV07»; SEQ ID NO: 16).

[0052] Термин «слитый белок» относится к комбинации или конъюгации двух или более белков или полипептидов, что приводит к новому расположению белков, которое обычно отсутствует в природе. Слитый белок является результатом ковалентного связывания двух или более белков или полипептидов. Два или более белков, составляющих слитый белок, могут располагаться в любой конфигурации от аминоконца («NH₂») до карбоксиконца («COOH»). Так, например, карбоксиконец одного белка может быть ковалентно связан либо с карбоксиконцом, либо с аминоконцом другого белка. Примеры слитых белков могут включать объединение молекулы мономерного IL-10 или мономерного варианта IL-10 с одним или более вариабельными доменами антитела (т. е.

VH и/или VL) или одноцепочечного вариабельного фрагмента («scFv»). Слитые белки могут также образовывать димеры или ассоциироваться с другими слитыми белками того же типа, что приводит к образованию комплекса слитых белков. Комплексообразование слитого белка может в некоторых случаях активировать или повышать функциональность слитого белка по сравнению с некомплексованным слитым белком. Например, молекула мономерного IL-10 или мономерного варианта IL-10 с одним или более вариабельными доменами антитела может иметь ограниченную или пониженную способность связываться с рецептором IL-10; однако, когда слитый белок образует комплекс, то мономерные формы молекулы IL-10 или варианта IL-10 становятся гомодимерами, и вариабельные домены связываются с образованием функционального диатела.

[0053] Термин «гомолог», «гомология», «гомологичный» или «по существу гомологичный» относится к процентной идентичности между по меньшей мере двумя полинуклеотидными последовательностями или по меньшей мере двумя полипептидными последовательностями. Последовательности являются гомологичными друг другу, если последовательности имеют по меньшей мере примерно 50%, предпочтительно по меньшей мере примерно 75%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 80-85%, предпочтительно по меньшей мере примерно 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 95%-98% идентичность последовательностей по определенной длине молекул.

[0054] Термин «идентичность последовательности» относится к точному соответствию нуклеотида к нуклеотиду или аминокислоты к аминокислоте. Идентичность последовательности может варьироваться от 100% идентичности последовательности до 50% идентичности последовательности. Процентную идентичность последовательности можно определить с использованием различных методов, включая, помимо прочего, прямое сравнение информации о последовательности между двумя молекулами (референсная последовательность и последовательность с неизвестной процентной идентичностью по отношению к референсной последовательности) выравниванием последовательностей, подсчетом точного количества совпадений между двумя выровненными последовательностями, делением на длину референсной последовательности и умножением результата на 100. Для помощи в определении процентной идентичности можно использовать легкодоступные компьютерные программы.

[0055] Термины «субъект», «индивидуум» или «пациент» используются здесь взаимозаменяемо и относятся к позвоночному животному, предпочтительно к млекопитающему. Млекопитающие включают, не ограничиваясь этим, мышей, грызунов, обезьян, людей, сельскохозяйственных животных, спортивных животных и некоторых домашних животных.

[0056] Термин «введение» включает способы введения, которые позволяют активному ингредиенту по изобретению выполнять предназначенную ему функцию.

[0057] «Терапевтически эффективное количество», относящееся, например, к

введению вариантов EBV IL-10 или его слитых белков, описанных в настоящем документе, относится к достаточному количеству варианта EBV IL-10 или его слитых белков для стимуляции определенных биологических активностей. Они могут включать, например, подавление функции миелоидных клеток, повышение активности клеток Купфера и/или отсутствие какого-либо воздействия на CD8⁺ Т-клетки или повышение активности CD8⁺ Т-клеток, а также блокаду активации тучными клетками Fc-рецептора или предотвращение дегрануляции. Таким образом, «эффективное количество» облегчит или предотвратит симптом или признак заболевания. Эффективное количество также означает количество, достаточное для обеспечения или облегчения диагностики.

[0058] Термин «лечить» или «проводить лечение» относится к способу уменьшения последствий заболевания или патологического состояния. Лечение также может относиться к способу уменьшения лежащей в основе причины самого заболевания или патологического состояния, а не только к симптомам. Лечение может представлять собой любое снижение по сравнению с естественными уровнями и может представлять собой, помимо прочего, полное устранение заболевания, патологического состояния или симптомов заболевания или состояния.

[0059] В следующей таблице приведены определения различных слитых белков IL-10 и слитых белков на основе двух цитокинов, содержащих IL-10, на которые делается ссылка в настоящем описании:

Термин	Определение
«Debo»	Относится к каркасной системе IL-10 с пролонгированным периодом полураспада, схематично представленной на фиг. 1, где мономеры IL-10 (например, SEQ ID NO: 1, 3 или 5) или молекулы варианта IL-10 (например, SEQ ID NO: 9-11, 12, 14 или 16) связаны с scFv, содержащим VH- и VL- области, полученные из человеческого антитела против вируса Эбола. Не желая связываться с какой-либо конкретной теорией, каркасная система способна образовывать стабильный комплекс благодаря образованию пары VH и VL и гомодимеризации мономеров IL-10.
«DeboWtEBV» или «DeboWt»	Относится к Debo, схематично представленному на фиг. 1, молекуле, содержащей мономеры EBV IL-10 дикого типа (SEQ ID NO: 3), связанные с scFv, содержащим VH- и VL- области, полученные из человеческого антитела против вируса Эбола.

«DeboDV06»	Относится к Debo, схематично представленному на фиг. 1, молекуле, содержащей мономеры варианта IL-10 DV06 (SEQ ID NO: 14), связанные с scFv, содержащим VH- и VL-области, полученные из человеческого антитела против вируса Эбола.
«DeboDV07»	Относится к Debo, схематично представленному на фиг. 1, молекуле, содержащей мономеры варианта IL-10 DV07 (SEQ ID NO: 16), связанные с scFv, содержащим VH- и VL- области, полученные из человеческого антитела против вируса Эбола.
«DegfrDV07»	Относится к Debo, схематично представленному на фиг. 1, молекуле, содержащей мономеры варианта IL-10 DV07, где 3 CDR в VH-области и 3 CDR в VL- области из человеческого scFv против вируса Эбола замещены 3 CDR в VH-области и 3 CDR в VL-области из анти-EGFR антитела (цетуксимаба).
«SLP»	Относится к оптимизированной вариантной форме (вариант № 3) DegfrDV07, которая представляет последовательность SEQ ID NO: 31.
«IL4DeboDV06» или «4DeboDV06» или «DK410DV06»	Относится к слитому белку на основе двух цитокинов, схематично представленному на фиг. 17, где DeboDV06 включает человеческий IL-4 дикого типа (SEQ ID NO: 43), связанный между областью из человеческого scFv против вируса Эбола.
«IL4DeboDV07» или «4DeboDV07» или «DK4 ¹⁰ DV07»	Относится к слитому белку на основе двух цитокинов, схематично представленному на фиг. 2, где DeboDV07 включает человеческий IL-4 дикого типа (SEQ ID NO: 43), связанный между областью из человеческого scFv против вируса Эбола.
«DK210» или «форма DK210»	Относится к группе молекул слитых белков на основе двух цитокинов, схематично представленных на фиг. 2, молекуле, в которой DeboDV07 включает человеческий IL-2 (SEQ ID NO: 36), связанный между областью человеческого scFv против вируса Эбола. DK2 ¹⁰ может быть превращен в нацеливающую молекулу путем

	необязательного замещения 6 участков CDR из человеческого scFv против вируса Эбола, 6 участками CDR (3 CDR в VH и 3 CDR в VL) из любого моноклонального антитела. Номенклатура будет соответствовать формату «DK2¹⁰ (в зависимости от белка-мишени)». Например, если DK2¹⁰ включает прививку 6 CDR анти-EGFR антитела человека (цетуксимаба), то молекула будет называться DK2¹⁰egfr (SEQ ID NO: 35), или если DK2¹⁰ включает прививку 6 CDR анти-HER2/Neu антитела человека (трастузумаба), то молекула будет называться DK2¹⁰her2 (SEQ ID NO: 52-54 или 55) соответственно; или если DK2¹⁰ включает прививку 6 CDR анти-VEGFR1 антитела или анти-VEGFR2 антитела человека, то молекула будет называться DK2¹⁰vegfr1 или DK2¹⁰vegfr2 соответственно; или если DK2¹⁰ включает прививку 6 CDR анти-PDGFR антитела человека, то молекула будет называться DK2¹⁰pdgfr.
«DK2 ¹⁰ egfr»	Относится к молекуле DK2¹⁰, нацеленной на EGFR, где 6 участков CDR из области, полученной из человеческого scFv против вируса Эбола, замещены 6 участками CDR (3 CDR в VH и 3 CDR в VL) из анти-EGFR антитела человека (цетуксимаба). Молекула имеет последовательность SEQ ID NO: 35. Молекула может также включать оптимизированную VH-область (SEQ ID NO: 37) и VL-область (SEQ ID NO: 38).
«DK2 ¹⁰ her2»	Относится к молекуле DK2¹⁰, нацеленной на HER2, где 6 участков CDR из области, полученной из человеческого scFv против вируса Эбола, замещены 6 участками CDR (3 CDR в VH и 3 CDR в VL) из анти-HER2 антитела человека (трастузумаба). Молекула имеет последовательность SEQ ID NO: 52-54 или 55.
«DK2 ¹⁰ vegfr1»	Относится к молекуле DK2¹⁰, нацеленной на VEGFR1, где 6 участков CDR из области, полученной из человеческого scFv против вируса Эбола, замещены 6 участками CDR (3 CDR в VH и 3 CDR в VL) из анти-VEGFR1 антитела

	человека.
«DK210vegfr2»	Относится к молекуле DK2 ¹⁰ , нацеленной на VEGFR2, в которой 6 участков CDR из области человеческого scFv против вируса Эбола, замещены 6 участками CDR (3 CDR в VH и 3 CDR в VL) из анти-VEGFR2 антитела человека.
«DK4 ¹⁰ » или «форма DK410»	Относится к группе молекул слитых белков на основе двух цитокинов, схематично представленных на фиг. 2 или фиг. 17, молекуле, содержащей либо DeboDV06, либо DeboDV07 в комбинации с IL-4 (SEQ ID NO: 43) или вариантами IL-4 (SEQ ID NO: 44 или 45), где IL-4 или вариант IL-4 связан в шарнирной области человеческого scFv, полученного из вируса Эбола. DK4 ¹⁰ может быть превращен в нацеливающую молекулу путем необязательной замены 6 участков CDR из человеческого scFv против вируса Эбола, 6 участками CDR (3 CDR в VH и 3 CDR в VL) из любого моноклонального антитела. Например, если DK4 ¹⁰ включает прививку 6 CDR анти-CD14 антитела мыши в комбинации с DV06 или DV07, то молекула будет называться DK4 ¹⁰ mCD14DV06 (SEQ ID NO: 49) или DK4 ¹⁰ mCD14DV07 (SEQ ID NO: 50) соответственно; или если DK4 ¹⁰ включает прививку 6 CDR анти-MAdCAM антитела мыши в комбинации с DV06, то молекула будет называться DK4 ¹⁰ mMAdCAMDV06 или DK4 ¹⁰ mMAdCAM (SEQ ID NO: 51); или если DK4 ¹⁰ включает прививку 6 CDR анти-VEGFR1 антитела человека или анти-VEGFR2 антитела человека, то молекула будет называться DK4 ¹⁰ vegfr1 или DK4 ¹⁰ vegfr2 соответственно, где фрагмент IL-4 представляет собой негликозилированную форму IL-4 (вариант IL-4 N38A с SEQ ID NO: 44) и DV06.

«DK4 ¹⁰ ngDV06mCD14» или «DK410mCD14DV06»	Относится к молекуле DK4 ¹⁰ (схематично представленной на фиг. 17), нацеленной на мышинный CD14, молекуле, содержащей DeboDV06 с негликозилированной формой IL-4 (вариант IL-4 N38A с SEQ ID NO: 44), связанной в шарнирной области человеческого scFv против вируса Эбола. 6 участков CDR из человеческого scFv против вируса Эбола, замещены 6 участками CDR (3 CDR в VH и 3 CDR в VL) анти-CD14 антитела мыши. Эта молекула имеет последовательность SEQ ID NO: 49.
«DK410ngDV07mCD14» или «DK4 ¹⁰ mCD14DV07»	Относится к молекуле DK4 ¹⁰ (схематично представленной на фиг. 1), нацеленной на мышинный CD14, молекуле, содержащей DeboDV07 с негликозилированной формой IL-4 (вариант IL-4 N38A с SEQ ID NO: 44), связанной в шарнирной области человеческого scFv против вируса Эбола. 6 участков CDR из человеческого scFv против вируса Эбола замещены 6 участками CDR (3 CDR в VH и 3 CDR в VL) анти-CD14 антитела мыши. Данная молекула представляет собой последовательность SEQ ID NO: 50.
«DK4 ¹⁰ ngDV06mMAdCAM» или «DK4 ¹⁰ mMAdCAMDV06» или «DK4 ¹⁰ mMAdCAM»	Относится к молекуле DK4 ¹⁰ (схематично представленной на фиг. 17), нацеленной на мышинный MAdCAM, молекуле, содержащей DeboDV06 с негликозилированной формой IL-4 (вариант IL-4 N38A с SEQ ID NO: 44), связанной в шарнирной области человеческого scFv против вируса Эбола. 6 участков CDR из человеческого scFv против вируса Эбола, замещены 6 участками CDR (3 CDR в VH и 3 CDR в VL) анти-CD14 антитела мыши. Молекула имеет последовательность SEQ ID NO: 51.

«DK410ngDV06CD14» или «DK4 ¹⁰ CD14DV06»	Относится к молекуле DK410 (схематично представленной на фиг. 17), нацеленной на человеческий CD14, молекуле, содержащей DeboDV06 с негликозилированной формой IL-4 (вариант IL-4 N38A с SEQ ID NO: 44), связанной в шарнирной области человеческого scFv против вируса Эбола. 6 участков CDR из человеческого scFv против вируса Эбола замещены 6 участками CDR (3 CDR в VH и 3 CDR в VL) из анти-CD14 антитела человека. Эта молекула представляет собой последовательность SEQ ID NO: 56-58 или 59.
«DK410ngDV06vegfr1» или «DK4 ¹⁰ vegfr1DV06»	Относится к молекуле DK4 ¹⁰ (схематично представленной на фиг. 17), нацеленной на человеческий VEGFR1, молекуле, содержащей DeboDV06 с негликозилированной формой IL-4 (вариант IL-4 N38A с SEQ ID NO: 44), связанной в шарнирной области человеческого scFv против вируса Эбола. 6 участков CDR из человеческого scFv против вируса Эбола замещены 6 участками CDR (3 CDR в VH и 3 CDR в VL) из анти-VEGFR1 антитела человека.
«DK4 ¹⁰ ngDV06vegfr2» или «DK410vegfr2DV06»	Относится к молекуле DK4 ¹⁰ (схематично представленной на фиг. 17), нацеленной на человеческий VEGFR2, молекуле, содержащей DeboDV06 с негликозилированной формой IL-4 (вариант IL-4 N38A с SEQ ID NO: 44), связанной в шарнирной области человеческого scFv против вируса Эбола. 6 участков CDR из человеческого scFv против вируса Эбола замещены 6 участками CDR (3 CDR в VH и 3 CDR в VL) из анти-VEGFR2 антитела человека.

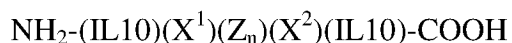
Структура слитого белка на основе двух цитокинов

[0060] Настоящее изобретение обеспечивает усовершенствование варианта осуществления слитого белка IL-10, ранее описанного в патенте США № 10858412 (поданном в виде заявки на патент США № 16/811718), который включен здесь посредством ссылки в полном объеме. Усовершенствование слитого белка IL-10 включает включение второй молекулы цитокина в ранее описанный слитый белок IL-10. На фиг. 1 приведено схематическое представление одной из ранее описанной конструкций слитого белка IL-10, описанных в патенте США № 10858412. Данный слитый белок IL-10

сконструирован на каркасе VH и VL scFv, содержащем два мономера IL-10 на каждом конце (т. е. первый мономер IL-10 на аминоконце и второй мономер IL-10 на карбоксиконце). Первичная каркасная система содержит scFv, полученный из человеческого антитела против вируса Эбола. Слитый белок IL-10, описанный в патенте США № 10858412, включает 6 участков, определяющих комплементарность («CDR»), имея CDR 1-3 в VH и CDR 1-3 в VL. Необязательно, VH- и VL-области способны нацеливать слитый белок IL-10 на специфический антиген. Это достигается заменой 6 участков CDR пары VH и VL (3 CDR в VH и 3 CDR в VL) 6 участками CDR из VH и VL антитела, нацеленного на рецептор или антиген, или его антигенсвязывающего фрагмента. Возможность заменить и оптимизировать 6 CDR и каркасные области и прививать эти CDR в каркас scFv, описанный в настоящем документе, хорошо известна и применяется на практике специалистами в данной области. Данные 6 участков CDR могут быть замещены 6 участками CDR любого моноклонального антитела, которое любой специалист в данной области сможет определить на основе представляющей интерес конкретной мишени.

[0061] В первом аспекте настоящая заявка относится к слитому белку на основе двух цитокинов, содержащему IL-10 и по меньшей мере один другой цитокин, где слитый белок на основе двух цитокинов обладает комбинированной или синергической функциональной активностью по сравнению со слитым белком IL-10, ранее описанным в патенте США № 10858412. На фиг. 2 приведено репрезентативное представление усовершенствованного слитого белка на основе двух цитокинов, содержащего IL-10. В частности, усовершенствованный слитый белок на основе двух цитокинов адаптирует ту же или по существу ту же каркасную систему, состоящую из VH и VL scFv, посредством чего два мономера IL-10 находятся на концах двойного слитого белка на аминоконце и карбоксиконце. Второй цитокин конъюгирован со слитым белком IL-10 посредством слияния между VH- и VL-областями scFv, которая является шарнирной областью scFv. Слитый белок на основе двух цитокинов способен образовывать функциональный белковый комплекс, в результате чего мономеры IL-10 гомодимеризуются в функциональную молекулу IL-10, и VH- и VL-области образуют пару, которая связывается вместе с образованием комплекса scFv, который обеспечивает связывание и распознавание антигена.

[0062] В некоторых вариантах осуществления слитый белок на основе двух цитокинов, содержащий IL-10, представляет собой структуру, имеющую формулу I:



где:

«IL-10» представляет собой любой мономер IL-10, такой как, не ограничиваясь этим, человеческий, мышинный, CMV или EBV IL-10 или варианты молекул IL-10;

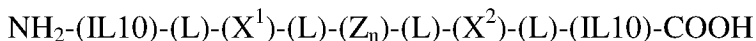
«X¹» представляет собой VL- или VH-область, полученную из первого моноклонального антитела; «X²» представляет собой VL- или VH-область, полученную из первого моноклонального антитела, где, когда X¹ представляет собой VL, то X²

представляет собой VH или когда X^1 представляет собой VH, то X^2 представляет собой VL;

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

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

[0063] В еще одном варианте осуществления слитый белок на основе двух цитокинов, содержащий IL-10, представляет собой структуру, имеющую формулу II:



где:

«IL-10» представляет собой мономер IL-10;

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

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

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

[0064] В одном варианте осуществления мономер IL-10 включает любую форму IL-10, включая человеческий (SEQ ID NO: 1), CMV (SEQ ID NO: 5), EBV (SEQ ID NO: 3), или мышиный (SEQ ID NO: 7). В другом варианте осуществления мономер IL-10 представляет собой модифицированную или вариантную форму EBV IL-10 (SEQ ID NO: 3), включая формы, описанные в патенте США № 10858412. В предпочтительном варианте осуществления EBV IL-10 содержит одну или более замен в SEQ ID NO: 3 в аминокислотном положении 31 (далее именуемый «DV05»), 75 (далее именуемый «DV06») или в обеих (далее именуемый «DV07»). В еще одном варианте осуществления мономер IL-10 представляет собой последовательность SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 14 или 16. Каждый первый и второй мономер молекулы IL-10 или молекулы варианта IL-10 расположен на терминальных концах слитого белка (т. е. первый мономер на аминоконце и второй мономер на карбоксиконце), как показано на фиг. 1.

[0065] В еще одном варианте осуществления VL- или VH-области происходят из антитела, фрагмента антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Антигенсвязывающий фрагмент включает, не ограничиваясь этим, scFv, Fab, F(ab')₂, V-NAR, диатело или нанотело. Предпочтительно VH и VL происходят из одноцепочечного переменного фрагмента («scFv»).

[0066] В еще одном варианте осуществления слитый белок на основе двух цитокинов, содержащий IL-10, включает пару VH и VL из одного антитела. Пара VH и VL функционирует в качестве каркаса, к которому могут быть присоединены мономеры IL-10 или его варианты, так что мономеры IL-10 или его варианты могут гомодимеризоваться в функциональную молекулу IL-10. Таким образом, специалистам в данной области должно

быть понятно, что VH и VL каркаса, используемые в слитом белке, могут быть выбраны на основе желаемых физических характеристик, необходимых для правильной гомодимеризации мономеров IL-10 или вариантов мономера IL-10, и/или желания сохранить нацеливающую способность VH и VL. Аналогичным образом, специалистам в данной области также будет понятно, что 6 CDR в паре VH и VL (3 CDR из VH и 3 CDR из VL) также могут быть замещены 6 CDR из других антител для получения специфически нацеленного слитого белка. В одном варианте осуществления 3 CDR из VH и 3 CDR из VL (т. е. пара VH и VL) любого моноклонального антитела могут быть привиты в каркасную систему, содержащую SEQ ID NO: 18, 20, 21, 23, 24 или 25. Также предусматривается, что, если слитый белок не предназначен для нацеливания на какой-либо конкретный антиген, то пара VH и VL может быть выбрана в качестве каркаса, который не нацелен на какой-либо конкретный антиген (или представляет собой антиген с низким содержанием *in vivo*), например, пара VH и VL из антитела против ВИЧ и/или антитела против вируса Эбола. Таким образом, в одном варианте осуществления слитый белок IL-10 по настоящему изобретению может включать пару VH и VL из человеческого антитела против вируса Эбола, более предпочтительно последовательность SEQ ID NO: 18, 21 или 25. Слитый белок может включать 1-4 переменных областей. В другом варианте осуществления переменные области могут происходить из одного и того же антитела или по меньшей мере из двух разных антител.

[0067] В еще одном варианте осуществления целевая специфичность переменных цепей антитела или пары VH и VL или 6 CDR пары VH и VL может включать, не ограничиваясь этим, нацеливающие белки, клеточные рецепторы и/или опухоль-ассоциированные антигены. В другом варианте осуществления CDR-участки любой пары VH и VL могут быть привиты в каркасную систему, описанную выше, где такая каркасная структура предпочтительно включает систему, называемую Debo (схематически представленную на фиг. 1), в которой мономеры IL-10 связаны с scFv, содержащим VL-или VH-области человеческого антитела против вируса Эбола, и второй цитокин связан в шарнирной области scFv (как схематично представлено на фиг. 2). Более предпочтительно прививка в каркасную систему Debo имеет место в каркасе, содержащем последовательность SEQ ID NO: 18, 20, 21, 23, 24 или 25. В еще одном варианте осуществления переменные области или пара VH и VL или 6 CDR пары VH и VL происходят из антител, нацеленных на антигены, ассоциированные с различными заболеваниями (например, раком), или антигены, которые обычно не обнаруживаются или редко обнаруживаются в сыворотке крови здорового субъекта, например, переменные области из антител, нацеленных на EGFR, PDGFR, VEGFR1, VEGFR2, Her2Neu, FGFR, GPC3 или другие опухоль-ассоциированные антигены, MAdCam, ICAM, VCAM, CD14 или другие ассоциированные с воспалением белки клеточной поверхности, ВИЧ и/или Эбола. Таким образом, в одном варианте осуществления переменные области получены или происходят из анти-EGFR, анти-MAdCam, анти-ВИЧ антител (Chan et al., J. Virol., 2018, 92(18):e006411-19), анти-ICAM, анти-VCAM, анти-CD14 или анти-вирус Эбола

антител (опубликованная заявка США 2018/0180614, которая включена посредством ссылки в полном объеме, в частности mAb, приведенные в таблицах 2, 3 и 4. В другом варианте осуществления переменные области получены или происходят из антител, способных повышать концентрацию цитокинов, таких как IL-10, в специфической области-мишени, чтобы позволить IL-10 проявлять свое биологическое действие. Такие антитела могут включать антитела, нацеленные на сверхэкспрессируемые или активированные рецепторы или антигены в определенных очагах поражения, или антитела, которые специфически экспрессируются в определенных очагах поражения. Например, переменные области могут быть получены из антител, специфичных к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR); CD52; CD14; различным иммунным контрольным точкам-мишеням, таким как, не ограничиваясь этим, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD20; CD47; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EPCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; ловушке TGF β ; MAdCam, субъединице интегрин β 7; интегрину α 4 β 7; интегрину α 4 SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-11 и SR-J1, если назвать только некоторые из возможных. Мономер IL-10 (например, человеческий, CMV или EBV) или молекула вариантного IL-10 (описанная в настоящем документе) конъюгирован либо с аминоконцом, либо с карбоксиконцом переменной области (VH или VL), так что мономер IL-10 или молекула варианта IL-10 способны димеризоваться друг с другом. В предпочтительном варианте осуществления мономеры IL-10 (или вариант IL-10) сливают с парой VH и VL в соответствии с формулой I или II, где мономер IL-10 представляет собой EBV IL-10, форму DV05, DV06 или DV07 IL-10.

[0068] Слитый белок на основе двух цитокинов или комплекс слитого белка на основе двух цитокинов может также иметь функцию нацеливания на антиген. Слитый белок на основе двух цитокинов или комплекс слитого белка на основе двух цитокинов будет содержать пару VH и VL, которые способны связываться друг с другом с образованием антигенсвязывающего сайта или ABS. В некоторых конфигурациях мономеры IL-10 или его вариантные мономеры IL-10 будут ковалентно связаны с концом, содержащим антигенсвязывающий сайт. Переменные области могут быть дополнительно модифицированы (например, добавлением, удалением или заменой) путем изменения одной или более аминокислот, что снижает антигенность у субъекта. Другие модификации переменной области могут включать аминокислотные замены, делеции или добавления, которые обнаруживаются за пределами 6 участков CDR VL- или VH-областей и служат для повышения стабильности и экспрессии VL- или VH-областей scFv. Например, модификации могут включать модификации, показанные в SEQ ID NO: 27, 29, 31 или 33, где участки CDR получены из VL- или VH-областей анти-EGFR антитела, и области за пределами CDR оптимизированы для стабилизации scFv и/или оптимизированы для повышения экспрессии, которые можно использовать в качестве основы для связывания второго цитокина между VL- или VH-областями scFv. Для демонстрации того, что эти типы модификаций входят в компетенцию специалистов в

данной области, аналогичные модификации участков CDR и областей за пределами CDR были сделаны для молекулы в форме DK2¹⁰, содержащей DV07 и нацеленной на человеческий HER2 (т.е. DK2¹⁰her2), такие как показанные в SEQ ID NO: 52-54 или 55, более предпочтительно SEQ ID NO: 54 (вариант 4) или 55 (вариант 5). Более того, в молекулу в форме DK4¹⁰, содержащую DV06 и нацеленную на человеческий CD14 (т.е. DK4¹⁰CD14DV06), были внесены модификации участков CDR и областей за пределами CDR, такие как показанные в SEQ ID NO: 56-58 или 59, более предпочтительно SEQ ID NO: 56 (вариант 2). Эти и другие модификации также могут быть введены в молекулу в форме DK2¹⁰, содержащую DV07 и нацеленную на VEGFR1 или VEGFR2 человека; или молекулу в форме DK4¹⁰, содержащую DV06 и нацеленную на VEGFR1 или VEGFR2 человека. Специалисты в данной области могут определить другие модификации, которые стабилизируют scFv и/или оптимизируют последовательность для целей экспрессии.

[0069] Пара VH и VL образует каркас, на который могут быть привиты или трансплантированы участки CDR, полученные для множества антител. Такие участки CDR антител включают антитела, известные и описанные выше. Участки CDR в описанных выше каркасах VH и VL будут включать следующее количество аминокислотных положений, доступных для прививки/вставки CDR:

Тяжелая цепь CDR1	3-7 аминокислот
Тяжелая цепь CDR2	7-11 аминокислот
Тяжелая цепь CDR3	7-11 аминокислот
Легкая цепь CDR1	9-14 аминокислот
Легкая цепь CDR2	5-9 аминокислот
Легкая цепь CDR3	7-11 аминокислот

В предпочтительном варианте осуществления слитый белок на основе двух цитокинов, содержащий IL-10, будет включать ранее описанный каркас слитого белка IL-10, где пара VH и VL получена из антитела против вируса Эбола (например, показанные в SEQ ID NO: 19, 27, 29, 31 и 33), посредством чего 6 участков CDR из антитела против вируса Эбола удаляются и прививаются парой VH и VL специфического нацеливающего антитела, такого как, не ограничиваясь этим, антитела против EGFR; CD52; CD14; различных иммунных контрольных точек-мишеней, таких как, не ограничиваясь этим, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD20; CD47; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, CD14, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN; ловушки TGF β ; MAdCam, субъединицы интегрин β 7; интегрин α 4 β 7; интегрин α 4 SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-11 и SR-J1. В одном варианте осуществления 6 участков CDR антитела против вируса Эбола замещены 6 участками CDR анти-EGFR, анти-MAdCAM, анти-VEGFR1, анти-VEGFR2, анти-PDGFR или анти-CD14 антител. В предпочтительном варианте осуществления слитый белок IL-10 представляет собой последовательность SEQ ID NO: 18, 20, 21, 23, 24 или 25, к которой может быть привит

любой из CDR из вышеописанных антител. В более предпочтительном варианте осуществления слитый белок IL-10 представляет собой последовательность SEQ ID NO: 19, 22 или 26. В предпочтительном варианте осуществления второй цитокин, такой как, не ограничиваясь этим, IL-2, IL-4, IFN α связан в шарнирной области между VH и VL scFv, полученного из человеческого антитела против вируса Эбола из слитого белка IL-10, имеющего последовательность SEQ ID NO: 18-27, 29, 31 или 33.

[0070] В еще одном варианте осуществления второй цитокин слит между VH и VL scFv, как показано на фиг. 2. Второй цитокин конъюгирован между VL- или VH-областью, так что второй цитокин сохраняет свои функциональные свойства. В одном варианте осуществления второй цитокин отличается от мономера IL-10. В другом аспекте второй цитокин представляет собой IL-10. В одном варианте осуществления второй цитокин представляет собой IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, интерфероны- α , - β , - γ , TGF- β , или факторы некроза опухолей - α , - β , основной FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11 или IL-13. В предпочтительном варианте осуществления второй цитокин в слитом белке на основе двух цитокинов содержит IL-10 и IL-2 или IL-4. В более предпочтительном варианте осуществления слитый белок на основе двух цитокинов представляет собой последовательность SEQ ID NO: 35, 46-58 или 59. В еще одном варианте осуществления слитый белок на основе двух цитокинов будет содержать молекулу варианта IL-10, выбранную из DV05, DV06 или DV07; молекула варианта IL-10, связанная с каркасной системой, включает VL- или VH-области человеческого антитела против вируса Эбола (т.е. Debo), где CDR антитела, выбранного из анти-EGFR, анти-HER2, анти-CD14, анти-VEGFR1, анти-VEGFR2, анти-MAdCAM или анти-PDGFR привиты в Debo; и второй цитокин, выбранный из IL-2, IL-4, IFN α , связан в шарнирной области пары VH и VL. В наиболее предпочтительном варианте осуществления двойной цитокин представляет собой слитый белок с последовательностью SEQ ID NO: 35, 46-58 или 59.

[0071] В еще одних вариантах осуществления слитый белок на основе двух цитокинов, содержащий IL-10, включает линкеры. Специалистам в данной области известно, что линкеры или спейсеры используются для достижения правильной пространственной конфигурации различных частей слитого белка, и, следовательно, они могут выбрать подходящий линкер для использования при формировании слитого белка на основе двух цитокинов, содержащего IL-10. В более предпочтительном варианте осуществления линкер или спейсер может представлять собой произвольную аминокислотную последовательность (такую как SSGGGGS (SEQ ID NO: 39), GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 40) или SSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 41)) константную область антитела. Константная область может быть получена, не ограничиваясь этим, из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgD или IgE. В одном варианте осуществления линкер или спейсер представляет собой константную область 1 тяжелой цепи («CH»), CH2 или CH3. В более предпочтительном варианте осуществления линкер или спейсер представляет собой произвольную аминокислотную последовательность SEQ

ID NO: 40. В еще одном аспекте линкер или спейсер может дополнительно содержать по меньшей мере две межцепочечные дисульфидные связи.

[0072] В еще одних аспектах настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют слитый белок на основе двух цитокинов, содержащий IL-10 и второй цитокин. Следовательно, один вариант осуществления включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, показанный в SEQ ID NO: 35, 46-58 или 59. В предпочтительном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты включает DK2¹⁰egfr (SEQ ID NO: 60), DK2¹⁰her2 (SEQ ID NO: 62 или 63), DK4¹⁰CD14DV06 или DK4¹⁰ngDV06CD14 (SEQ ID NO: 61), или последовательности нуклеиновой кислоты, которые имеют гомологию последовательностей на уровне от 70% до 99%. В еще одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты кодирует форму DK2¹⁰, содержащую DV07 и нацеленную на VEGFR1 или VEGFR2 человека; или молекулу в форме DK4¹⁰, содержащую DV06 и нацеленную на VEGFR1 или VEGFR2 человека. Полинуклеотидные последовательности, которые кодируют слитый белок на основе двух цитокинов, содержащий IL-10 и второй цитокин, могут также включать модификации, которые не изменяют функциональных свойств описанного слитого белка на основе двух цитокинов. Для таких модификаций будут использоваться обычные методики и способы рекомбинантной ДНК. Например, добавление или замена специфических аминокислотных последовательностей может быть сделано в последовательность IL-10 на уровне нуклеиновой кислоты (ДНК) с использованием методов сайт-направленного мутагенеза с использованием синтетических олигонуклеотидов, которые также хорошо известны в данной области. В предпочтительном варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие слитый белок на основе двух цитокинов, содержащий IL-10 и второй цитокин, могут включать вставки, делеции или замены (например, вырожденный код), которые не изменяют функциональные свойства молекулы варианта IL-10. Нуклеотидные последовательности, кодирующие вариант IL-10 и слитые белки, описанные в настоящем документе, могут отличаться от аминокислотных последовательностей за счет вырожденности генетического кода и могут быть на 70-99%, предпочтительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологичными вышеуказанным последовательностям. Следовательно, вариант осуществления настоящего изобретения включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок с SEQ ID NO: 35, 46-58 или 59, но отличающуюся на 70-99% за счет вырожденности генетического кода.

[0073] Нуклеотидные последовательности, кодирующие слитые белки на основе двух цитокинов, описанные в настоящем документе, могут дополнительно включать хорошо известные последовательности, которые способствуют, например, экспрессии, продукции или секреции белков. Такие последовательности могут включать, например, лидерную последовательность, сигнальный пептид и/или сайты/последовательности инициации трансляции (например, консенсусную последовательность Козака).

Нуклеотидные последовательности, описанные в настоящем документе, могут также включать один или более сайтов рестрикции, которые позволяют встраивать их в различные экспрессионные системы/векторы.

[0074] В еще одном варианте осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие слитый белок на основе двух цитокинов, можно непосредственно использовать в генной терапии. В одном варианте осуществления вариантные молекулы IL-10 или слитый белок по настоящему изобретению могут быть доставлены любым способом, известным в данной области, включая прямое введение мутантного белка IL-10 и генную терапию с вектором, кодирующим мутантный белок IL-10. Генную терапию можно проводить с использованием плазмидной ДНК или вирусного вектора, такого как аденоассоциированный вирусный вектор, аденовирусный вектор, ретровирусный вектор и т. д. В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы по настоящему изобретению вводят в виде вирусных частиц, и в других их вводят в виде плазмид (например, в виде «голой» ДНК).

[0075] Другие способы доставки нуклеотидных последовательностей включают те, которые уже известны в данной области. Они могут включать доставку нуклеотидных последовательностей, таких как, не ограничиваясь этим, ДНК, РНК, миРНК, мРНК, олигонуклеотиды или их варианты, кодирующие IL-10 или вариантные молекулы IL-10 с использованием проникающего в клетки пептида, гидрофобного фрагмента, электростатического комплекса, липосомы, лиганда, липосомальной наночастицы, липопroteина (предпочтительно HDL или LDL), липосомы, нацеленной на фолаты, антитела (такого как фолатный рецептор, рецептор трансферрина), нацеливающего пептида или аптамера. Нуклеотидные последовательности, кодирующие вариантные молекулы IL-10, могут быть доставлены субъекту посредством прямой инъекции, инфузии, пластырей, повязок, тумана или аэрозоля или доставки посредством тонкой пленкой. Нуклеотид (или белок) может быть направлен в любую область, для которой требуется адресная доставка цитокинового стимула. К ним относятся, например, легкие, желудочно-кишечный тракт, кожа, печень, головной мозг с использованием внутримозговой инъекции, глубокие метастатические опухолевые поражения с использованием инъекций под ультразвуковым контролем.

[0076] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения и очистки слитого белка на основе двух цитокинов, содержащего IL-10. Например, последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют слитый белок на основе двух цитокинов, описанный в настоящем документе, можно использовать для рекомбинантного получения слитых белков. Например, используя обычные методы молекулярной биологии и экспрессии белков, слитый белок на основе двух цитокинов, описанный здесь, можно экспрессировать и выделить из клеточных систем млекопитающих. Такие системы включают хорошо известные экспрессионные векторные системы эукариотических клеток и клетки-хозяева. Можно использовать различные подходящие экспрессионные векторы, хорошо известные специалистам в данной области,

которые можно использовать для экспрессии и введения молекул вариантов IL-10 и слитых белков. Такие векторы включают, например, векторы типа pUC, векторы типа pBR, векторы типа pBI, векторы типа pGA, pBin19, pBI121, серии pGreen, серии pCAMBRIA, серии pPZP, pPCV001, pGA482, pCLD04541, серии pBIBAC, серии pYLTAС, pSB11, pSB1, серии pGPTV и вирусные векторы и т.п. Хорошо известные системы клеточных хозяев включают, не ограничиваясь этим, экспрессию в клетках СНО.

[0077] Экспрессионные векторы, содержащие слитый белок на основе двух цитокинов, могут также включать другие компоненты вектора, необходимые для функциональности вектора. Например, вектор может включать сигнальные последовательности, последовательности-метки, последовательности распознавания протеаз, селективируемые маркеры и другие регуляторные последовательности, такие как промоторы, необходимые для правильной репликации и экспрессии слитого белка на основе двух цитокинов. Конкретные промоторы, используемые в векторе, особым образом не ограничиваются, при условии, что они могут направлять экспрессию слитого белка на основе двух цитокинов в различных типах клеток-хозяев. Аналогичным образом, тип Tag промоторов не ограничивается, при условии, что последовательность Tag упрощает очистку экспрессированной молекулы варианта IL-10. Они могут включать, например, 6-гистидин, GST, MBP, НАТ, HN, S, TF, Trx, Nus, биотин, FLAG, мус, RCFP, GFP и т.п. Последовательности распознавания протеаз особым образом не ограничиваются, например, можно использовать последовательности распознавания, такие как фактор Ха, тромбин, HRV, протеаза 3С. Селективируемые маркеры особым образом не ограничиваются, при условии, что они могут обнаруживать трансформированные клетки растений риса, например, могут быть использованы гены устойчивости к неомицину, гены устойчивости к канамицину, гены устойчивости к гигромицину и т.п.

[0078] Слитый белок на основе двух цитокинов, описанный выше, также может включать дополнительные аминокислотные последовательности, которые помогают в выделении или очистке слитых белков в процессе производства. Они могут включать различные модификации последовательности или аффинные метки, такие как, помимо прочего, белок А, альбумин-связывающий белок, щелочную фосфатазу, эпитоп FLAG, галоктоза-связывающий белок, гистидиновые метки и любые другие метки, которые хорошо известны в данной области. См., например, публикацию Kimple et al (Curr. Protoc. Protein Sci., 2013, 73:Unit 9.9, таблица 9.91, которая включена здесь посредством ссылки в полном объеме). В одном аспекте аффинная метка представляет собой гистидиновую метку, имеющую аминокислотную последовательность НННННН (SEQ ID NO: 42). Гистидиновая метка может быть удалена или оставлена нетронутой из конечного продукта. В еще одном варианте осуществления аффинная метка представляет собой модификацию белка А, которая включена в слитый белок (например, в VH-область слитых белков, описанных в настоящем документе). Специалистам в данной области техники будет понятно, что любая последовательность слитого белка на основе двух цитокинов, описанная в настоящем документе, может быть модифицирована для

включения модификации белка А посредством вставки аминокислотных точечных замен в каркасные области антитела, как описано в данной области техники.

[0079] В еще одном аспекте белок и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие слитый белок на основе двух цитокинов, могут быть формулированы в виде фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество слитого белка на основе двух цитокинов и фармацевтический носитель и/или фармацевтически приемлемые эксципиенты. Фармацевтическая композиция может быть формулирована с обычно используемыми буферами, эксципиентами, консервантами, стабилизаторами. Фармацевтические композиции, содержащие слитый белок на основе двух цитокинов, смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом. Различные фармацевтические носители известны в данной области и могут быть использованы в фармацевтической композиции. Например, носитель может представлять собой любое совместимое нетоксичное вещество, подходящее для доставки пациенту композиций слитого белка на основе двух цитокинов. Примеры подходящих носителей включают физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и раствор Хенкса. Носители могут также включать любые полоксамеры, общеизвестные специалистам в данной области, включая, не ограничиваясь этим, те, которые имеют молекулярную массу 2900 (L64), 3400 (P65), 4200 (P84), 4600 (P85), 11400 (P85). F88), 4950 (P103), 5900 (P104), 6500 (P105), 14 600 (F108), 5750 (P123) и 12 600 (F127). Носители могут также включать эмульгаторы, включая, не ограничиваясь этим, полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60 и полисорбат 80, и это лишь некоторые из них. Можно также использовать неводные носители, такие как нелетучие масла и этилолеат. Носитель также может включать добавки, такие как вещества, повышающие изотоничность и химическую стабильность, например, буферы и консерванты, см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Составы терапевтических и диагностических средств могут быть приготовлены смешиванием с физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами, например, в форме лиофилизированных порошков, взвесей, водных растворов или суспензий.

[0080] Фармацевтическая композиция должна быть формулирована для введения пациенту в терапевтически эффективном количестве, достаточном для обеспечения желаемого терапевтического результата. Предпочтительно такое количество оказывает минимальные негативные побочные эффекты. В одном варианте осуществления количество вводимого слитого белка на основе двух цитокинов будет достаточным для лечения или профилактики воспалительных заболеваний или состояний. В другом варианте осуществления количество вводимого слитого белка на основе двух цитокинов будет достаточным для лечения или профилактики иммунных заболеваний или расстройств. В еще одном варианте осуществления количество вводимого слитого белка на основе двух цитокинов будет достаточным для лечения или профилактики рака. Вводимое количество может варьироваться от пациента к пациенту, и будет определяться

с учетом заболевания или патологического состояния субъекта или пациента, общего состояния здоровья пациента, способа введения, тяжести побочных эффектов и т.п.

[0081] Эффективное количество для конкретного пациента может варьироваться в зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, которое лечат, общее состояние здоровья пациента, способ введения и доза, а также тяжесть побочных эффектов. Подходящая доза, вводимая пациенту, обычно определяется клиницистом с использованием показателей или факторов, известных или предполагаемых в данной области, влияющих на лечение или предполагаемо влияющих на лечение. Как правило, доза начинается с количества, несколько меньшего, чем оптимальная доза, и затем ее повышают небольшими приращениями до тех пор, пока не будет достигнут желаемый или оптимальный эффект по сравнению с любыми негативными побочными эффектами. Важные диагностические показатели включают в себя симптомы, например, воспаления, или уровень продуцированных воспалительных цитокинов.

[0082] Способ определения дозы описываемого слитого белка на основе двух цитокинов будет по существу аналогичен способу, описанному в патенте США № 10858412. Как правило, описываемый слитый белок на основе двух цитокинов будет иметь дозировку в диапазоне от 0,5 мкг/кг до 100 мкг/кг. Слитый белок на основе двух цитокинов можно вводить ежедневно, три раза в неделю, два раза в неделю, раз в неделю, раз в два месяца или раз в месяц. Эффективное количество терапевтического средства будет оказывать влияние на степень выраженности воспаления, заболевания или состояния, облегчая их симптомы. Например, эффект лечения может включать эффект, составляющий, по меньшей мере, 10%; по меньшей мере, 20%; по меньшей мере, примерно 30%; по меньшей мере, 40%; по меньшей мере, 50% или более, так что в результате заболевание или патологическое состояние облегчается или полностью излечивается.

[0083] Композиции по изобретению можно вводить в организм перорально или инъекцией. Составы для перорального применения также могут включать соединения для дополнительной защиты молекул вариантов IL-10 от протеаз в желудочно-кишечном тракте. Инъекции обычно представляют собой внутримышечные, подкожные, внутрикожные или внутривенные. В качестве альтернативы, при соответствующих обстоятельствах можно использовать внутрисуставную инъекцию или другие пути введения. Слитый белок на основе двух цитокинов для парентерального введения предпочтительно формулируют в виде разовой инъекционной лекарственной формы (раствор, суспензия, эмульсия) в сочетании с фармацевтическим носителем и/или фармацевтически приемлемыми эксципиентами. В других вариантах композиции для применения могут быть введены в организм пациента с помощью имплантируемой или инъекционной системы доставки лекарственных препаратов.

Тестирование слитого белка на основе двух цитокинов

[0084] Множество скрининговых анализов известно и доступно специалистам в данной области для тестирования желаемой биологической функции. В одном варианте

осуществления желаемая биологическая функция включает, не ограничиваясь этим, снижение противовоспалительного ответа, уменьшение стимуляции Т-клеток, усиление функции Т-клеток, усиление функциональности клеток Купфера и уменьшение дегрануляции тучных клеток.

[0085] Например, известно, что воздействие IL-10 праймирует Т-клетки для генерации и секреции более высокого уровня IFN γ при стимуляции Т-клеточного рецептора. Одновременно воздействие IL-10 предотвращает секрецию TNF α , IL-6 и других провоспалительных цитокинов, секретируемых моноцитами/макрофагами в ответ на LPS. IL-10 также подавляет пролиферацию FOXP3⁺CD4⁺ T_{reg}. В одном варианте осуществления положительно выбран слитый белок на основе двух цитокинов, который максимально подавляет моноциты/макрофаги, но не оказывает влияния на Т-клетки, включая как стимуляторные, так и супрессорные ответные реакции. В одном варианте осуществления в результате скрининга будут положительно выбраны слитые белки на основе двух цитокинов, которые обладают повышенным противовоспалительным действием, для лечения аутоиммунного, противовоспалительного заболевания или того и другого. В других вариантах осуществления для лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) и/или неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) будут выбраны слитые белки на основе двух цитокинов, которые усиливают блокирование клеток Купфера и также не подавляют T_{reg}. В еще одном варианте осуществления для разработки лечения рака будут выбраны слитые белки на основе двух цитокинов, которые максимально воздействуют на биологию Т-клеток, включая как стимуляторные, так и супрессорные ответы, а также обладают свойством усиливать блокирование клеток Купфера. Различные анализы и способы скрининга слитых белков на основе двух цитокинов ранее описаны в одновременно находящемся на рассмотрении патенте США 10858412, который в полном объеме включен здесь посредством ссылки. См. заявку США 16/811, описание 718 на стр. 39-42.

Способы лечения и/или профилактики с использованием двух цитокинов

[0086] В еще одних аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения и/или профилактики злокачественных заболеваний или состояний или рака, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества слитого белка на основе двух цитокинов, содержащего IL-10, и второй цитокин. Такой белок будет находиться в форме DK2¹⁰, где слитый белок будет содержать мономеры DV07, связанные с каркасной системой VH и VL, полученной из человеческого антитела против вируса Эбола, в которое привиты CDR любого антитела, нацеленного на опухоль-ассоциированный антиген («ТАА»); со вторым цитокином, IL-2, связанным между шарнирной областью VH и VL. В предпочтительном варианте осуществления слитый белок с двумя цитокинами содержит мономеры EBV IL-10 DV07. В более предпочтительном варианте осуществления мономеры EBV IL-10 включают две замены в аминокислотных положениях 31 (V31L) и 75 (A75I) EBV IL-10 с SEQ ID NO: 3. В более предпочтительном варианте осуществления EBV IL-10 представляет собой SEQ ID NO: 11

или 16. В предпочтительном варианте осуществления слитый белок на основе двух цитокинов содержит пару VH и VL из антитела против вируса Эбола, где CDR замещены 6 CDR из любого антитела, нацеленного на TAA. В предпочтительном варианте осуществления VL- или VH-области слитого белка на основе двух цитокинов включают VH с SEQ ID NO: 37 и VL с SEQ ID NO: 38. В более предпочтительном варианте осуществления слитый белок на основе двух цитокинов содержит пару VH и VL из антитела против вируса Эбола, где CDR замещены 6 CDR из: анти-EGFR антитела (SEQ ID NO: 27, 29, 31 или 33), где второй цитокин связан между VL- или VH-областями scFv. В еще одних вариантах осуществления 6 участков CDR замещены 6 участками CDR анти-Her2 Neu; анти-PDGFR; анти-VEGFR1 и анти-VEGFR2, анти-FGFR; анти-HER3; или анти-GPC3. Предпочтительно 6 CDR получены из анти-EGFR или анти-HER2. В еще одном предпочтительном варианте осуществления второй цитокин представляет собой IL-2. В наиболее предпочтительном варианте осуществления слитый белок на основе двух цитокинов с SEQ ID NO: 35 (нацеленный на EGFR) или 52-55 (нацеленный на HER2) используют для лечения рака.

[0087] В еще одних аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения и/или профилактики воспалительных заболеваний или состояний, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества слитого белка на основе двух цитокинов, содержащего IL-10 (или его варианты, такой как DV06) и второй цитокин (такой как IL-4). В предпочтительном варианте осуществления воспалительные заболевания или расстройства включают, не ограничиваясь этим, болезнь Крона, псориаз и ревматоидный артрит («RA»). Такой белок будет находиться в форме DK4¹⁰, где слитый белок будет содержать мономеры DV06, связанные с каркасной системой VH и VL, полученной из человеческого антитела против вируса Эболы, в которое привиты CDR любого антитела, нацеленного на различные воспалительные/иммунные рецепторы или белки (такие как анти-CD14, анти-VEGFR2, анти-MAdCAM); со вторым цитокином, IL-4 (SEQ ID NO: 43) или негликозилированной формой IL-4 (SEQ ID NO: 44), связанными между шарнирной областью VL- или VH-областей. В одном варианте осуществления мономер IL-10 включает EBV IL-10 дикого типа, вариант EBV IL-10 с одной аминокислотной заменой в положении 75 EBV IL-10 (DV06) или вариант EBV IL-10 с двумя аминокислотными заменами в положениях 31 и 75 EBV IL-10 (DV07). В предпочтительном варианте мономеры EBV IL-10 представляют собой EBV IL-10 или DV06 дикого типа. В более предпочтительном варианте осуществления EBV IL-10 представляет собой SEQ ID NO: 3, 9, 10, 11, 14 или 16. В предпочтительном варианте осуществления слитый белок на основе двух цитокинов содержит каркасную систему с парой VH и VL из человеческого антитела против вируса Эбола. В более предпочтительном варианте осуществления слитый белок на основе двух цитокинов, используемый для лечения воспалительных заболеваний или состояний, содержит пару VH и VL из человеческого антитела против вируса Эбола, где CDR замещены 6 CDR из VH и VL анти-MAdCAM антитела (предпочтительно анти-MAdCAM

антитела человека) или анти-CD14 антитела (предпочтительно анти-CD14 антитела человека) или анти-VEGFR2 (предпочтительно анти-VEGFR2 антитела человека). В другом предпочтительном варианте второй цитокин представляет собой IL-4, предпочтительно вариант IL-4, имеющий замену N38A (SEQ ID NO: 44). В наиболее предпочтительном варианте осуществления воспалительное заболевание включает сепсис и/или септический шок, которые лечат слитым белком на основе двух цитокинов, содержащим мономеры DV06 или DV07 и IL-4, где CDR из анти-CD14 антитела привиты в каркасную систему анти-CD14 антитела против Эбола VH и VL scFv. В предпочтительном варианте осуществления слитый белок на основе двух цитокинов находится в форме DK4¹⁰ с SEQ ID NO: 56-58 или 59, более предпочтительно с SEQ ID NO: 56. В еще одном предпочтительном варианте осуществления воспалительное заболевание включает IBD, которое лечат с помощью слитого белка на основе двух цитокинов, содержащего мономеры DV06 и IL-4, в котором CDR анти-MAdCAM антитела привиты к каркасной системе VH и VL scFv против вируса Эбола. В еще одном предпочтительном варианте осуществления воспалительное заболевание включает псориаз или RA, которые лечат слитым белком на основе двух цитокинов, содержащим мономеры DV06 и IL-4, где CDR анти-VEGFR2 антитела вставлены в VH и VL каркасной системы человеческого scFv против вируса Эбола. В наиболее предпочтительном варианте осуществления слитый белок на основе двух цитокинов с SEQ ID NO: 46-50, 56-58 или 59 (нацеленный на CD14) или 51 (нацеленный на MAdCAM) используют для подавления воспаления или сепсиса.

[0088] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения и/или профилактики иммунных заболеваний или состояний, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества слитого белка на основе двух цитокинов, содержащего IL-10.

[0089] В еще одних вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к способам совместного введения или лечения со вторым терапевтическим средством, например, цитокином, стероидом, химиотерапевтическим препаратом, антибиотиком, противовоспалительным средством или лучевой терапией, которые хорошо известны в данной области. Они могут включать комбинированное лечение с другими терапевтическими средствами, такими как, помимо прочего, одним или более из следующего: химиотерапевтических препаратов, интерферона- β , например, IFN β -1 α и IFN- β -1 β ; белка, имитирующего основной белок миелина; кортикостероидов; ингибиторов IL-1; ингибиторов TNF; анти-TNF α антител, анти-IL-6 антител, слитого белка IL-1br-Ig, анти-IL-23 антител, антител к лиганду CD40 и CD80; антагонистов IL-12 и IL-23, например, антагонистов субъединицы p40 IL-12 и IL-23 (например, ингибирующие антитела против субъединицы p40); антагонистов IL-22; низкомолекулярных ингибиторов, например, метотрексата, лефлуномида, сиролимуса (рапамицина) и их аналогов, например, CCI-779; ингибиторов COX-2 и cPLA2; НПВП; ингибиторов p38; TPL-2; Мк-2; ингибиторов NF κ B; RAGE или растворимого RAGE; ингибиторов P-

селектина или PSGL-1 (например, низкомолекулярных ингибиторов, антител к ним, например, антител к Р-селектину); агонистов бета-рецепторов эстрогена (ERB) или антагонистов ERB-NFκβ.

[0090] Кроме того, комбинированное лечение, подходящее для применения со слитым белком на основе двух цитокинов, может включать ингибиторы TNF, в том числе, например, химерные, гуманизированные, эффективно человеческие, человеческие или полученные *in vitro* антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с TNF; растворимые фрагменты рецептора TNF, например, p55 или p75 рецептора TNF человека или их производные, например, 75 кДТNFR-IgG (слитый белок 75 кДа рецептор TNF-IgG, ENBREL™), слитый белок p55 кДа рецептор TNF-IgG; и ферментные антагонисты TNF, например, ингибиторы TNFα-превращающего фермента (TACE). Другое комбинированное лечение противовоспалительными агентами/лекарственными препаратами включает, помимо прочего, обычные нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) и ингибиторы циклооксигеназы-2. НПВП могут включать аспирин, целекоксиб, диклофенак, дифлунизал, этодолак, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, кеторолак, набуметон, напроксен, оксaproзин, пироксикам, салсалат, сулиндак и/или толметин. Ингибитором циклооксигеназы-2, используемым в композициях по настоящему изобретению, может быть, например, целекоксиб или рофекоксиб.

[0091] Дополнительные терапевтические средства, которые можно совместно вводить и/или совместно формулировать со слитым белком на основе двух цитокинов, включают одно или более из: интерферона-β, например, IFNβ-1α и IFNβ-1β; СОРАХОНЕ®; кортикостероидов; ингибиторов IL-1; антагонистов TNF (например, растворимый фрагмент рецептора TNF, например, p55 или p75 рецептора TNF человека или их производные, например, 75 кДТNFR-IgG; антител к лиганду CD40 и CD80; и антагонистов IL-12 и/или IL-23, например, антагонистов субъединицы p40 IL-12 и IL-23 (например, ингибирующие антитела, которые связываются с субъединицей p40 IL-12 и IL-23); метотрексата, лефлуномида и сиролимуса (рапамицина) или их аналогов, например, CCI-779. Другие терапевтические средства могут включать Имфинзи или Атезолизумаб.

[0092] Например, для лечения NASH слитый белок на основе двух цитокинов можно комбинировать с агентами, снижающими уровень холестерина, такими как статины и нестатиновые лекарственные средства. Данные агенты включают, не ограничиваясь этим, симвастатин, аторвастатин, розувастатин, ловастатин, правастатин, гемфиброзил, флувастатин, холестирамин, фенофибрат, ингибиторы абсорбции холестерина, смолы или секвестранты, связывающие желчные кислоты, и/или ингибиторы микросомального белка-переносчика триглицеридов (MTP).

[0093] Репрезентативные химиотерапевтические препараты, которые можно вводить совместно со слитым белком на основе двух цитокинов, описанным в настоящем документе, могут включать (в качестве неисчерпывающего списка): алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN™); алкилсульфонаты, такие как

бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид мехлорэтамина оксида, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабин, карминомицин, карзинофиллин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-ФУ; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестостерон; антиадреналовые агенты, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; заместитель фолиевой кислоты, такой как фолиевая кислота; ацеглатон; альдофосфамидгликозид; аминолевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK[®]; разоксан; сизофиран; спирогерманий; теназоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин, уретан, виндезин, дакарбазин, манномустин, митобронитол, митолактол, пипоброман, гацитозин, арабинозид (Ara-C), циклофосфамид, тиотепа, таксоиды, например, паклитаксел (TAXOL Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) и доксетаксел (Taxotere[™], Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид, митомицин С, митоксантрон, винкристин, винорелбин, навельбин, новантрон, тенипозид, дауномицин, аминоптерин, Xeloda[®] Roche, Швейцария; ибандронат; CPT11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (ДМФО); ретиноевая кислота; эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных препаратов. В это определение также включены антигормональные агенты, которые регулируют или ингибируют действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен,

ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Fareston); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных препаратов.

Примеры

Пример 1. Исследование слитого белка на основе двух цитокинов IL-10 и IL-2 in vitro

[0094] Для оценки *in vitro* влияния нацеливания двух цитокинов на опухоль, конструировали слитый белок на основе двух цитокинов, названный DK2¹⁰ (SEQ ID NO: 35) (см. фиг. 2 в качестве иллюстративного представления структуры), из следующих компонентов:

(а) двух мономеров DV07 (который представляет собой высокоаффинный связывающий рецептор IL-10, вариант EBV IL-10), соединенный с scFv через пару VH и VL, нацеленный на EGFR (слитый белок IL-10, обозначенный как «SLP» с SEQ ID NO: 31); и

(б) цитокина IL-2 (SEQ ID NO: 36); где цитокин IL-2 конъюгирован или связан в шарнирной (или линкере) области между VH (SEQ ID NO: 37) и VL (SEQ ID NO: 38) scFv, нацеленного на EGFR (вариант SLP с SEQ ID NO: 31).

[0095] Данный слитый белок на основе двух цитокинов был создан для оценки комбинированных эффектов этих двух цитокинов на IL-2-опосредованную индукцию секреции IFN γ из NK, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Также была сконструирована сравнительная конструкция, в которой IL-2 был связан с С-концом самого С-концевого мономера DV07 конструкции SLP, описанной выше, что привело к созданию конструкции под названием «SLP-IL-2» (фиг. 3).

[0096] Для тестирования влияния SLP-IL-2 (фиг. 3) и DK2¹⁰ (SEQ ID NO: 35, схематично представленного на фиг. 2) на иммунную систему моноциты периферической крови выделяли с использованием положительной селекции на магнитных шариках для оценки функции DV07, и затем аналогичным методом выделяли NK, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки для тестирования *in vitro*. Была проведена серия клеточных анализов *in vitro* для моделирования иммунологической функции на разные временные точки в цикле воздействия молекулы, введенной подкожно в организм человека.

[0097] В начале, эффекты IL-10, IL-2, комбинации IL-10 и IL-2 и SLP-IL-2 тестировали на моноцитах/макрофагах. Результаты данного теста показали, что IL-2 один не подавлял секрецию TNF α , провоспалительного цитокина, в ответ на LPS, тогда как конструкция SLP:IL-2, содержащая DV07, была способна подавлять секрецию провоспалительного цитокина. Проводили титрацию IL-10, IL-2, комбинации IL-10 и IL-2 и SLP-IL-2 (фиг. 4). Неожиданно полученные данные также дают основание предположить, что функция конструкции, содержащей DV07, нарушается за счет добавления цитокина IL-2 к С-концу мономера IL-10 (т.е. SLP-IL-2; фиг. 3).

[0098] Также оценивали влияние DK2¹⁰, который был сконструирован в качестве

варианта, содержащего DV07, с IL-2, включенным в линкер между VH и VL scFv, полученного из человеческого антитела против вируса Эбола (схематически представленный на фиг. 2), также оценивали на моноцитах/макрофагах для определения того, насколько конструкция сохраняет функцию IL-10. Было проведено титрование IL-10, SLP (оптимизированного варианта DegfrDV07 с SEQ ID NO: 31) и DK210egfr (SED ID NO: 35) (фиг. 5), и данные свидетельствуют о том, что в отличие от связывания IL-2 с С-концом самого С-концевого мономера IL-10 (SLP-IL-2), неожиданное включение IL-2 в линкер между VH и VL scFv не нарушает функцию SLP (DV07, содержащий слитый белок IL-10 с SEQ ID No: 31).

[0099] Для оценки прямых эффектов DK2¹⁰egfr на Т-клетки, проводили анализ, о котором сообщалось, что с его помощью можно непосредственно определить основную функцию IL-10 на CD8⁺ Т-клетках, преимущественно потенцирование IFN γ , который высвобождается только при вовлечении Т-клеточного рецептора (Chan, 2015; Mumm J., 2011; Emmerich, 2012).

[00100] Было установлено, что необходимая терапевтическая концентрация PEG-rHuIL-10 составляет 2-5 нг/мл (Mumm J., 2011; Naing A., 2018; Naing A., 2016) в системном кровотоке. Анализ IFN γ CD8⁺ Т-клеток показал максимальное потенцирование Т-клеточного IFN γ на уровне 1-10 нг/мл, что позволяет предположить, что это подходящая модельная система анализа для оценки специфической активности IL-10 при лечении рака.

[00101] Терапия высокими дозами IL-2 представляет собой введение от 600000 до 720000 Е/кг IL-2 каждые 8 ч в течение 5 суток (Buchbinder, 2019), что эквивалентно 37-45 мкг/кг (1,1 мг=18 $\times$ 10⁶ МЕ для IL-2). Концентрация C_{max} в системном кровотоке при высоких дозах IL-2 составляет от 37 до 45 нг/мл (Kirchner, 1998), где минимальная экспозиция равна примерно 10 нг/мл. Эти данные дают основание предположить о том, что использование данного анализа также подходит для оценки ответной реакции Т-клеток на IL-2, поскольку максимальная стимуляция под действием IL-2 антигенспецифической функции Т-клеток составляет примерно 10 нг/мл in vitro. Следовательно, авторы изобретения оценили ответную реакцию CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток на IL-10, IL-2, комбинацию IL-10 и IL-2, SLP и DK2¹⁰ в данном формате анализа (фиг. 6). Неожиданно оказалось, что связывание IL-2 и DV07 вместе (т. е. связывание IL-2 с SLP в линкере между VH и VL scFv) повышало активность по сравнению с любой молекулой по отдельности в 100 раз (примерно от 1-10 нг/мл до 0,01 нг/мл). Неожиданно оказалось, что добавление несвязанных IL-2 и IL-10 в этих же концентрациях не приводило к повышению секреции IFN γ , что свидетельствует о том, что эффект связывания IL-2 и DV07 вместе приводит к значительно большему эффекту, чем аддитивный или синергический на функцию Т-клеток.

[00102] Токсичность IL-2 (синдром сосудистой утечки) связана с секрецией NK (Assier, 2004) и CD4⁺ Т-клетками (Sivakumar, 2013) провоспалительных цитокинов (Guan, 2007; Baluna, 1997). Следовательно авторы изобретения оценили насколько, IL-10 может

подавлять провоспалительные эффекты IL-2 на NK-клетки, выделенные непосредственно из крови. CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки (1) непосредственно выделяли из крови, (2) подвергали воздействию анти-CD3/анти-CD20 плюс цитокины для моделирования праймирования антигеном, (3) подвергали воздействию цитокинами после праймирования антигеном для моделирования воздействия в опухоли и (4) воздействовали на функцию Т-клеток, праймированных антигеном, родственным антигеном (фиг. 7). NK-клетки, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, непосредственно выделенные из периферической крови, обрабатывали титрацией различных концентраций IL-10, IL-2, комбинации IL-10 и IL-2, SLP (оптимизированный вариант DegfrDV07 SEQ ID NO: 31) и DK2¹⁰egfr в течение 4 суток (фиг. 7). Ожидаемые требования к введению DK2¹⁰egfr составляют один раз каждые 4 суток, что позволяет предположить, что это воздействие *in vitro* моделирует высокую концентрацию цитокинов (до 100 нг/мл) в течение 4 суток, что намного превышает ожидаемую экспозицию C_{max} . Данные указывают на то, что добавление IL-10 к IL-2 в виде отдельных цитокинов или связанных вместе в виде DK2¹⁰egfr, подавляет IL-2-опосредованную индукцию секреции IFN γ из NK, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток на -50%, -80% и -50% соответственно при концентрации 5-10 нг/мл. При ожидаемой терапевтической дозе 0,01 нг/мл комбинация цитокинов DK2¹⁰egfr мало или практически не индуцирует секрецию IFN γ .

[00103] Также исследовали влияние воздействия цитокинов во время презентации модельного антигена (иммобилизованные 10 нг/мл анти-CD3/2 нг/мл анти-CD28) (Chan, 2015) (фиг. 8). Данные показывали, что добавление IL-10 к IL-2 и, в частности, добавление связанных IL-2 и IL-10 через DK2¹⁰egfr подавляло индукцию CD4⁺ и CD8⁺ IFN γ на -75% и -90% соответственно при 10 нг/мл и отсутствие индукции IFN γ при 0,01 нг/мл.

[00104] Наконец, исследовали индукцию секреции IFN γ в CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках после воздействия антигена на модельные Т-клетки, переносимые в опухоли до взаимодействия с родственным опухолевым антигеном (фиг. 9). Неожиданно полученные данные показали, что эффекты IL-2, IL-10 и IL-2, применяемых по отдельности, по сравнению с DK2¹⁰egfr, имеют разные функции на праймированные антигеном CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки. При ожидаемых терапевтических концентрациях DK2¹⁰egfr, DK2¹⁰egfr потенцирует секрецию IFN γ в большей степени, чем IL-2 или IL-10 и IL-2, применяемые по отдельности. При ожидаемых терапевтических концентрациях IL-10 и IL-2, DK2¹⁰egfr, IL-2 и IL-10 и IL-2, использованные по отдельности, одинаково индуцируют секрецию IFN γ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками. В совокупности полученные данные указывают на то, что связывание вместе IL-2 и IL-10 (в форме DK2¹⁰) потенцирует антигенспецифические ответы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, подавляя секрецию провоспалительных цитокинов, связанную с токсичностью IL-2. Примечательно, что на эти эффекты не оказывала влияния прививка анти-EGFR CDR в каркас scFv против вируса Эбола.

Пример 2. Исследование слитого белка на основе двух цитокинов IL-10 и IL-2 *in vivo*

[00105] Нацеливающий DV07 через анти-EGFR scFv (где DV07 слит с scFv, содержащим VH и VL, полученным из каркаса человеческого scFv против вируса Эбола,

содержащего 6 привитых анти-EGFR CDR; «Degfr:DV07» с SEQ ID NO: 31) в микроокружение опухоли, полученной клеточной линии мышинной колоректальной карциномы, стабильно экспрессирующей человеческий EGFR, CT26, как было показано ранее, проявляет превосходную противоопухолевую функцию по сравнению с PEG-rHuIL-10. См. патент США № 10858412. Используя аналогичное исследование с опухолью *in vivo*, DK2¹⁰egfr оценивали и сравнивали с Degfr:DV07 на клеточной линии мышинных опухолевых клеток, экспрессирующих человеческий EGFR, CT26.

[00106] Мышам Balb/C, дефицитным по В-клеткам, с опухолями CT26 (hEGFR⁺), со средним объемом опухолей 100 мм³ вводили испытуемые препараты в дозах и с кратностью, как показано в таблице 1. Все испытуемые препараты вводили подкожно в заднюю часть шеи. Все препараты вводили ежедневно в течение 15 суток.

Таблица 1

Испытуемые препараты, дозы и кратность

№.	Испытуемый препарат	Доза	Кратность
1	Растворитель	100 П (контроль)	ежедневно
2	Degfr:DV07	1 мг/кг	ежедневно
3	DK2 ¹⁰	1 мг/кг	ежедневно
4	DK210	2 мг/кг	ежедневно
5	DK2 ¹⁰	4 мг/кг	ежедневно

Длину и ширину опухолей измеряли каждые три дня электронным штангенциркулем и рассчитывали объем опухолей ($(L \times W^2)/2$). В этом примере термин «Degfr:DV07» означает DV07, нацеленный на человеческий EGFR; DK2¹⁰egfr обозначается аббревиатурой «DK2¹⁰» и представляет собой человеческий IL-2, связанный с DV07 через CDR-привитый каркас scFv против вируса Эбола, цетуксимаб.

Методы

[00107] Культивирование клеток *in vitro*: опухолевые клетки CT26^(hEGFR⁺) (ATCC) культивировали до 70% слияния в полной среде RPMI, 10%/FCS и 10 мкг/мл пуромицина. Клетки подвергали не более чем 3 пассажам *in vitro* перед имплантацией. Клетки удаляли из планшета для культивирования клеток с использованием Accutase (Biolegend) и промывали полной средой RPMI в течение 10 мин с центрифугированием при 400g при 4°C.

[00108] Имплантация опухолей: опухолевые клетки имплантировали из расчета 1×10^5 клеток/мышь в 100 мкл матригеля, обедненного на 50% факторами роста, 50% RPMI подкожно в правый бок мышам, дефицитным по В-клеткам.

Результаты

[00109] Сравнение Degfr:DV07 и DK2¹⁰ в отношении роста опухолей: ранее было показано, что нацеливание DV07 на микроокружение опухоли посредством связывания с EGFR, присутствующим в стабильно трансфектированных опухолевых клетках, является

эффективным. См. патент США № 10858412. С использованием той же опухолевой системы сравнивали Degfr:DV07 с DK2¹⁰.

[00110] Опухоли измеряли три раза в неделю (таблица 2). Самок мышей Balb/C, дефицитных по В-клеткам, с опухолями CT26^(hEGFR+) объемом 75 мм³ обрабатывали подкожно испытуемыми препаратами, и кратность введения показана в таблице 2.

Таблица 2

Необработанные данные

			Сутки после введения								
			Сутки 0	Сутки 1	Сутки 3	Сутки 6	Сутки 8	Сутки 10	Сутки 13	Сутки 15	Сутки 17
Животное #	Ушная метка #	Группа/Вв одимое вещество	TVM	TVM	TVM	TVM	TVM	TVM	TVM	TVM	TVM
D07-117-005	305	1.Раствори тель	57	107	379	921	1128	1664			
D07-117-011	311		52	75	194	373	651	1211			
D07-117-012	312		27	64	108	247	578	1230			
D07-117-013	313		33	152	407	542	725	1187			
D07-117-014	314		66	88	515	1274	1251	<u>2461</u>			
			47	97	321	671	867	1550			
D07-117-003	303	2. DegfDV07 1мг/кг	48	90	81	84	90	130	508	672	573
D07-117-006	306		62	105	218	396	656	1195	1709	<u>2291</u>	<u>3610</u>
D07-117-007	307		56	80	122	131	215	333	595	776	1008
D07-117-008	308		37	84	145	420	775	1124	2293	<u>2850</u>	<u>2781</u>
D07-117-017	317		35	83	132	146	212	343	412	637	833

			48	89	140	235	390	625	1103	1445	1761
D07-117-001	301	3. DK2 ¹⁰ 1мг/кг	57	107	286	478	638	927	1565	<u>2567</u>	<u>2584</u>
D07-117-004	304		55	183	241	192	145	392	735	788	1320
D07-117-015	315		38	68	78	88	30	167	564	678	984
D07-117-018	318		54	103	77	41	9	21	26	49	24
D07-117-020	320		38	65	45	0	0	0	0	0	0
			48	105	145	160	164	302	578	816	982
D07-117-024	324	4. DK2 ¹⁰ 2 мг/кг	69	116	57	9	0	0	0	0	0
D07-117-029	329		40	87	134	34	52	135	361	391	624
D07-117-030	330		32	37	141	96	118	339	641	912	1289
D07-117-031	331		66	83	68	0	0	0	0	0	0
D07-117-039	339		32	64	117	239	439	878	1394	1675	<u>2233</u>
			48	77	103	75	122	271	479	596	829
D07-117-019	319	5. DK2 ¹⁰ 4 мг/кг	21	77	34	61	95	261	550	732	1127
D07-117-032	332		56	111	34	0	0	0	0	0	0
D07-117-034	334		50	49	125	49	27	0	0	0	0
D07-117-037	337		56	120	135	146	133	272	655	886	1413
D07-117-038	338		59	114	74	63	36	97	270	380	553

	48	94	80	64	58	126	295	400	618
--	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----

[00111] Для данного эксперимента клетки CT26^(hEGFR+) имплантировали в количестве 1×10^5 клеток в матрикеле, обедненном на 50% факторами роста, для ограничения иммунизации мышей против опухолевых антигенов.

[00112] Противоопухолевый эффект Degfr:DV07 в дозе 1 мг/кг сравнивали с такой же дозой DK2¹⁰, а также с дозами 2 и 4 мг/кг (фиг. 10). Ежедневная доза DK2¹⁰ 1 мг/кг оказывала более выраженное противоопухолевое действие по сравнению с ежедневной дозой 1 мг/кг Degfr:DV07. Дозы 2 и 4 мг/кг DK2¹⁰ оказывали более выраженное противоопухолевое действие, чем 1 мг/кг.

[00113] Оценка безопасности DK2¹⁰: для тестирования безопасности введения DK2¹⁰ оценивали массу тела мышей с опухолями, обработанных Degfr:DV07 и DK2¹⁰ (фиг. 11). Отсутствовало явное негативное влияние введения Degfr:DV07 или DK2¹⁰ на массу тела мышей.

[00114] Влияние введения Degfr:DV07 и DK2¹⁰ на выживаемость: оценивали выживаемость мышей с опухолями CT26^(hEGFR+) при введении DK2¹⁰ (фиг. 12).

[00115] Все опухоли у мышей, получавших носитель, были слишком большими согласно положениям IAACUC к суткам 17. 100%, 80%, 80% и 60% мышей оставались живыми при введении DK2¹⁰ в дозах 4, 2 и 1 мг/кг и Degfr:DV07 в дозе 1 мг/кг в соответствующих группах обработки на сутки 30 соответственно.

[00116] В совокупности полученные данные позволяют предположить, что связывание высокоаффинного варианта IL-10 (DV07) с IL-2 и нацеливание обеих молекул на микроокружение опухоли (через DK2¹⁰egfr) предотвращает очевидную IL-2-опосредованную токсичность в терапевтически эффективных дозах. Прививка анти-EGFR CDR в каркас scFv, содержащий VH- и VL- области, полученные из человеческого каркаса против вируса Эбола, не влияет на комбинированные эффекты IL-10 и IL-2, скорее, анти-EGFR CDR функционируют в качестве средства для концентрирования молекулы DK2¹⁰ в микроокружении опухоли. Авторы изобретения полагают, что прививка CDR из любого антитела (с соответствующей оптимизацией), нацеленного на микроокружение опухоли, приведет к такому же или подобному наблюдаемому эффекту.

Пример 3. Слитый белок на основе двух цитокинов IL-10 и IL-4

[00117] У пациентов с болезнью Крона высокие дозы IL-10 приводили к уменьшению противовоспалительных реакций, сопровождавшихся повышением IFN γ . Для определения того, насколько комбинирование цитокина с IL-10 будет усиливать противовоспалительную функцию IL-10 и подавлять стимуляторную функцию IL-10 (потенцирование IFN γ), были созданы слитые белки на основе двух цитокинов IL-10 и IL-4. Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что комбинированная обработка моноцитов с IL-10 и IL-4 более эффективно подавляла воспалительные реакции, индуцированные LPS, чем IL-10 или IL-4 по отдельности (более подробно обсуждается ниже). Кроме того, IL-4 подавлял IL-10-опосредованное потенцирование IFN γ в CD8⁺ Т-клетках. Используя аналогичные методы и логическое обоснование для конструирования

DK2¹⁰egfr (описанный выше в примерах 1 и 2), IL-4 или различные варианты IL-4 связывали с IL-10 или вариантами IL-10 в виде слитой конструкции (см. фиг. 17 в качестве иллюстративного представления) для усиления супрессорной функции IL-10. Полученная группа молекул получила название DK4¹⁰.

[00118] В таблице 3 представлены обобщенные данные по различным тестируемым молекулам, включающим цитокины и различные слитые молекулы DK4¹⁰.

Таблица 3

Тестируемые молекулы

Молекула	SEQ ID NO:	Формат	Мишень
rhIL-10	1	Цитокин	непригодно
rhIL-4	43	Цитокин	непригодно
DeboDV06	21	Каркас против вируса Эбола, связанный с мономерами DV06	Нет
DeboDV07	25	Каркас против вируса Эбола, связанный с мономерами DV07	Нет
DK4 ¹⁰ DV06	46	Каркас против вируса Эбола, связанный с IL-4 дикого типа и мономерами DV06	Нет
DK4 ¹⁰ HADegIyDV06mCD14	47	Каркас против вируса Эбола с привитыми анти-mCD14 CDR, связанными с высокоаффинным негликозилированным IL-4 (T13D) и мономерами DV06	Мышиный CD14
DK4 ¹⁰ HADegIyDV07mCD14	48	Каркас против вируса Эбола с привитыми анти-mCD14 CDR, связанными с высокоаффинным негликозилированным IL-4 (T13D) и мономерами DV07	Мышиный CD14

DK4 ¹⁰ ngDV06mCD14	49	Каркас против вируса Эбола с привитыми анти-mCD14 CDR, связанными с негликозилированным IL-4 (N38A) и мономерами DV06	Мышиный CD14
DK4 ¹⁰ ngDV07mCD14	50	Каркас против вируса Эбола с привитыми анти-mCD14 CDR, связанными с негликозилированным IL-4 (N38A) и мономерами DV07	Мышиный CD14
DK4 ¹⁰ ngDV06mMAdCAM	51	Каркас против вируса Эбола с привитыми анти-mMAdCAM CDR, связанными с негликозилированным IL-4 (N38A) и мономерами DV06	Мышиный mMAdCAM

Следующие молекулы и комбинации молекул тестировали в отношении их влияния на моноциты/макрофаги и CD8⁺ Т-клетки, выделенные с использованием положительной селекции на магнитных шариках, полученные из препаратов мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) здоровых доноров:

1. IL-4;
2. IL-10;
3. IL-4 в комбинации с IL-10;
4. DeboWtEBV;
5. DeboWtEBV в комбинации с IL-4;
6. DeboDV06;
7. DeboDV06 в комбинации с IL-4;
8. DeboDV07;
9. DeboDV07 в комбинации с IL-4;
10. DK4¹⁰, содержащий IL-4 дикого типа и DV06 («4DeboDV06»);
11. DK4¹⁰, содержащий высокоаффинный негликозилированный IL-4 (T13D) и DV06, нацеленным на mCD14;
12. DK4¹⁰, содержащий высокоаффинный негликозилированный IL-4 (T13D) и DV07, нацеленным на mCD14;
13. DK4¹⁰, содержащий негликозилированный IL-4 (N38A) с DV06, нацеленным на mCD14;
14. DK4¹⁰, содержащий негликозилированный IL-4 (N38A) с DV07, нацеленным на

mCD14; и

15. DK4¹⁰, содержащий негликозилированный IL-4 с DV06, нацеленным на mMAdCAM.

Методы

[00119] Выделение PBMC и CD8⁺ Т-клеток: макрофаги и CD8⁺ Т-клетки выделяли из PBMC или лейкопака с использованием анти-CD14 (моноциты) или анти-CD8 (CD8⁺ Т-клетки) магнитных шариков посредством магнитно-активированной сортировки клеток.

[00120] Клеточный анализ - ответная реакция моноцитов/макрофагов на цитокины и липополисахарид (LPS): в данном анализе моноциты, полученные из PMBC, выделяли с использованием CD14-положительных селекционных шариков, высекали из расчета 2×10^5 клеток/лунку и подвергали титрации цитокинами и 10 нг/мл LPS. Через 18 ч супернатанты анализировали с использованием ELISA на секретированные провоспалительные цитокины. Строили график зависимости процентного снижения TNF α для определения эффекта, который цитокин или испытываемое вещество оказывает на LPS. Данный анализ наиболее точно имитирует реакцию моноцитов на цитокины и провоспалительные продукты бактериального происхождения в периферической крови.

[00121] Клеточный анализ - CD8⁺ Т-клетки: использовали многочисленные анализы CD8⁺ Т-клеток. Первоначально CD8⁺ Т-клетки получали из PBMC с использованием CD8⁺-положительных магнитных селекционных шариков, высекали из расчета 2×10^5 клеток/лунку и подвергали титрации цитокинами или испытываемыми образцами в следующих условиях:

- (i) только 4 суток,
- (ii) 3 суток для связывания анти-CD3/анти-CD20 в планшете в присутствии цитокинов, чтобы имитировать, как эти молекулы влияют на ответную реакцию клеток на презентацию родственного антигена,
- (iii) затем анти-CD3/анти-CD20 в течение 3 суток, чтобы имитировать, как антиген-стимулированные клетки реагируют на эти цитокины и новые факторы, когда клетки попадают в опухоли, и
- (iv) запускаемую Т-клеточным рецептором секрецию IFN γ оценивали через 4 ч из клеток, подвергшихся воздействию *in vitro*, чтобы имитировать реакцию Т-клеток в микроокружении опухоли на воздействие родственного антигена.

[00122] Моноциты/макрофаги, и CD8⁺ Т-клетки подвергали титрации концентраций человеческого IL-4, IL-10, DeboWtEBV, DeboDV06 и различных слитых молекул DK4¹⁰ при 0,1, 1, 10, 100 нг/мл или 0,001, 0,01, 0,1, 1 и 10 нг/мл (или молярный эквивалент) в течение ночи или 3-4 суток, как указано, с повторами при каждом условии. Противовоспалительные (моноциты/макрофаги) и стимуляторные (CD8⁺ Т-клетки) эффекты этих молекул использовали для определения наиболее эффективной противовоспалительной пары цитокинов.

[00123] Анализ белков: среду для культивирования макрофагов анализировали с использованием ELISA на TNF α , и культуральную среду для CD8⁺ Т-клеток

анализировали с использованием ELISA на IFN γ . DeboDV06, 4DeboDV06 и различные слитые молекулы DK4¹⁰ оценивали анализом Nanodrop при 280 нМ с использованием соответствующего коэффициента экстинкции для каждого белка, и концентрацию подтверждали интенсивностью окраски полосы при окрашивании SDS-PAGE геля по Кумасси.

Результаты

[00124] Разработка Rational для комбинирования IL-10 и IL-4: сообщалось, что IL-10 подавляет секрецию TNF α макрофагами в ответ на LPS (Malefyt, Interleukin 10 Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes, 1991; Moore, 2001). Сообщалось, что IL-4 подавляет LPS-индуцированную секрецию TNF α из моноцитов человека (Hart, Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: Suppression of human monocyte tumor necrosis factor α , interleukin 1, and prostaglandin E2, 1989) и перитонеальных макрофагов человека (Hart, 1991).

[00125] Для определения влияния комбинирования IL-4 и IL-10 на подавление моноцитарной секреции провоспалительных цитокинов в ответ на LPS, использованного в качестве воспалительного стимула, моноциты периферической крови выделяли из PBMC здорового донора с использованием положительной селекции на магнитных шариках. Выделенные моноциты подвергали титрации IL-10, IL-4 и комбинации IL-10 и IL-4 (фиг. 13). Оценка ответной реакции макрофагов здорового человека на титрацию (0,1, 1, 10, 100 нг/мл) человеческого IL-10, IL-4 и комбинации IL-10 и IL-4 демонстрирует, что IL-10 один и IL-4 один способны подавлять индуцированную LPS секрецию TNF α . Однако комбинация IL-10 и IL-4 лучше подавляла секрецию TNF α , чем каждый из цитокинов по отдельности.

[00126] Влияние IL-4 и DeboWtEBV на моноциты/макрофаги: DeboWtEBV состоит из IL-10 EBV дикого типа, связанного с каркасной системой VH и VL с пролонгированным периодом полураспада, полученной из человеческого антитела против вируса Эбола (ранее описанной в патенте США № 10858412). Было показано, что DeboWtEBV подавляет секрецию TNF α . Выделенные моноциты подвергали титрации концентраций IL-10, IL-4, DeboWtEBV и DeboWtEBV в комбинации с IL-4 (фиг. 14). Комбинация IL-4 вместе с DeboWtEBV подавляла индуцированную LPS секрецию TNF α из моноцитов в большей степени, чем IL-4 или DeboWtEBV по отдельности.

[00127] Влияние IL-4 и DeboWtEB V на Т-клетки: в дополнение к оценке комбинированного супрессорного действия IL-10 и IL-4 на моноциты/макрофаги также исследовали комбинированное действие IL-4 и DeboWtEBV на Т-клетки (фиг. 15). DeboWtEBV индуцирует более низкий уровень IFN γ из CD8⁺ Т-клеток по сравнению с той же молярной концентрацией IL-10. Комбинация IL-4 с DeboWtEBV снижает уровень IFN γ в большей степени, чем индуцированный только DeboWtEBV в дозе 100 нг/мл.

[00128] Влияние IL-4 и DeboDV06 на моноциты/макрофаги: для определения того, насколько можно усилиться супрессорное действие IL-10, оценивали высокоаффинный вариант EBV IL-10, обозначенный как DV06. DV06 содержит точечную мутацию (A75I) и

связан с каркасной системой VH и VL с пролонгированным периодом полураспада, полученной из человеческого антитела против вируса Эбола (ранее описанной в патенте США № 10858412) путем замены EBV IL-10 дикого типа на DV06. Выделенные моноциты подвергали титрации IL-10, IL-4, DeboDV06 и DeboDV06 в комбинации с IL-4 (фиг. 16). DeboDV06 проявлял повышенную супрессорную активность по сравнению с DeboWtEBV (по сравнению с фиг. 15), и комбинирование DeboDV06 с IL-4 аналогичным образом повышало супрессорное действие на ответную реакцию моноцитов/макрофагов на LPS. Комбинация IL-4 с DeboDV06 подавляла индуцированную LPS секрецию TNF α из моноцитов в большей степени, чем IL-4 или DeboDV06 по отдельности.

[00129] Оценка IL-4, связанного с DeboDV06 (в форме DK4¹⁰): данные свидетельствуют о том, что комбинирование IL-4 с вариантом IL-10, DV06 (который представляет собой вариант с повышенной аффинностью EBV IL-10 дикого типа), подавляло LPS-опосредованные воспалительные реакции моноцитов в большей степени, чем любая молекула по отдельности. Следовательно, IL-4 связывали с молекулой DeboDV06 путем экспрессии IL-4 в линкере между VH и VL каркасной молекулы с пролонгированным периодом полураспада (фиг. 17), с получением первого члена группы молекул DK4¹⁰, обозначенного как «IL-4DeboDV06» или «4DeboDV06», которые представляют собой нецелевые формы слитого белка на основе двух цитокинов (т.е. содержащие 6 участков CDR из антитела против вируса Эбола).

[00130] Влияние IL-4DeboDV06 (в форме DK4¹⁰) на моноциты/макрофаги: для определения того, насколько IL-4DeboDV06 в форме DK4¹⁰ подавляет воспалительные реакции, индуцированные LPS, выделенные моноциты подвергали титрации различных концентраций IL-10, IL-4, DeboDV06, IL-10 в комбинации с IL-4 и IL-4DeboDV06 (фиг. 18). IL-4DeboDV06 в форме DK4¹⁰ подавлял LPS-индуцированную секрецию TNF α из моноцитов в большей степени, чем IL-4 или DeboDV06 по отдельности, но не так эффективно, как IL-4 плюс IL-10, особенно в более низких концентрациях.

[00131] Влияние IL-4DeboDV06 (в форме DK4¹⁰) на CD8⁺ Т-клетки: исследовали способность IL-4DeboDV06 потенцировать и индуцировать секрецию IFN γ из CD8⁺ Т-клеток и сравнивали с IL-10, IL-4, DeboDV06 и DeboDV06 в комбинации с IL-4 (фиг. 19). IL-4DeboDV06 в форме DK4¹⁰ подавлял секрецию IFN γ CD8⁺ Т-клетками аналогично комбинации DeboDV06 плюс IL-4.

[00132] Влияние IL-4HADeglyDmCD14DV06 и IL-4HADeglyDmCD14DV07 (в форме DK4¹⁰) на моноциты/макрофаги: было определено, что аминокислотная последовательность IL-4, использованная в получении IL-4DeboDV06 в форме DK4¹⁰, оказалась гликозилированной. Анализ последовательности подтвердил, что предполагаемый вариант N-связанного гликозилирования находится в аминокислотном положении N38, но что гликозилирование не требуется для проявления функциональной активности (Li, 2013). Дальнейшие исследования показали, что замена аминокислоты T13 на аспартат (D) приводила к образованию высокоаффинного варианта IL-4 (патент США № 6028176). Обе точечные мутации с заменами в N38A и T13D вводили в IL-4, связывали

и прививали в каркас Debo с 6 CDR мышиногo CD14 (фиг. 20). Данные дают основание предположить, что высокоаффинный негликозилированный вариант IL-4 (т. е. содержащий точечные мутации N38A и T13D) проявляет более низкую активность в формате, связанном с DK4¹⁰, по сравнению с IL-4 дикого типа в том же формате.

[00133] Влияние IL-4ngDmCD14DV06 и IL-4ngDmCD14DV07 (в форме DK4¹⁰) на моноциты/макрофаги: оценивали влияние IL-4ngDmCD14DV06 и IL-4ngDmCD14DV07 в форме DK4¹⁰, которая включает вариант IL-4, содержащий замену N38A, в анализе подавления воспалительных реакций, индуцированных LPS, воздействием на выделенные моноциты титрации IL-10, IL-4ngDmCD14DV06 (также известного как «DK410mCD14DV06») и IL-4ngDmCD14DV07 (также известного как «DK410mCD14DV07») (фиг. 21)). Вариант IL-4, названный «IL-4ng», представляет собой негликозилированную форму IL-4 (содержащую замену N38A, SEQ ID No: 44), которую авторы изобретения получали для улучшения технологичности, и «mCD14» представляет собой прививку 6 CDR из анти-mCD14 антитела в каркас Debo. Обе молекулы DK4¹⁰ (содержащие варианты IL-10 DV06 и DV07) подавляли LPS-индуцированную секрецию TNF α .

[00134] Влияние IL-4ngDmCD14DV06 и IL-4ngDmCD14DV07 (в форме DK41) на Т-клетки: стимуляторные эффекты IL-10, IL-4ngDmCD14DV06 и IL-4ngDmCD14DV07 в форме DK4¹⁰ (как описано выше) оценивали на Т-клетках (фиг. 22). Обе молекулы DK4¹⁰ (содержащие варианты IL-10 DV06 и DV07) не индуцировали такой сильной секреции IFN γ из CD8⁺ Т-клеток, как IL-10. IL-4ngDmCD14DV06 индуцировал несколько более низкую секрецию IFN γ при 1-100 нг эквивалентном молярном воздействии по сравнению с IL-4ngDmCD14DV07.

[00135] Влияние IL-4ngDmMAdCAMDV06 (в формах DK4¹⁰) на моноциты/макрофаги: эффекты IL-4ngDmMAdCAMDV06 в форме DK4¹⁰ оценивали анализом подавления воспалительного ответа, индуцированного LPS, на моноциты/макрофаги. IL-4ngDmMAdCAMDV06 представляет собой слитый белок на основе двух цитокинов в форме DK4¹⁰, включающий: (1) вариант IL-4ng, который представляет собой негликозилированный вариант (содержащий замену N38A); (2) прививку 6 CDR мышиногo анти-MAdCAM антитела в каркас Debo; и (3) вариант IL-10 DV06. Выделенные моноциты/макрофаги подвергали титрации IL-10 или IL-4ngDmMAdCAMDV06 (фиг. 23). IL-4ngDmMAdCAMDV06 подавлял LPS-индуцированную секрецию TNF α в моноцитах/макрофагах.

[00136] Влияние IL-4ngDmMAdCAMDV06 (формат DK4¹⁰) на Т-клетки: авторы изобретения также оценили стимуляторные эффекты IL-10 и IL-4ngDmMAdCAMDV06 (формат DK4¹⁰) на Т-клетки (фиг. 24). IL-4ngDmMAdCAMDV06 не индуцировал секрецию IFN γ CD8⁺ Т-клетками в отличие от IL-10.

Заключение

[00137] Полученные данные дают основание предположить, что варианты IL-4 и варианты IL-10 могут коэкспрессироваться посредством связывания этих двух цитокинов

с каркасной системой VH/VL, полученной из человеческого антитела против вируса Эбола (т.е. в форме DK4¹⁰). Комбинация вариантов IL-4 и IL-10 подавляет LPS-индуцированные воспалительные реакции моноцитов/макрофагов, а также ингибирует индукцию секреции IFN γ CD8⁺ Т-клетками, независимо от нацеливающих CDR, присутствующих в каркасной системе VH и VL (сравните 4DeboDV06 с привитыми версиями DK4¹⁰, содержащими анти-mCD14 и анти-mMAdCAM CDR).

[00138] Каркас VH и VL, происходящий из вируса Эбола, эффективно связывает вариантные цитокины IL-4 и IL-10, и может принимать многочисленные трансплантаты нацеливающих CDR. Комбинация IL-4ng (вариант IL-4, приводящий к негликозилированному IL-4 в результате замены N38A) с DV06 эффективно подавляет LPS-опосредованную секрецию TNF α в концентрациях от 0,1 до 100 нг/мл и не индуцирует значительного уровня IFN γ из CD8⁺ Т-клеток в том же диапазоне доз.

Пример 4: DK4¹⁰ в лечении сепсиса

[00139] Установив, что IL-4ngDmCD14DV06 (также известный как «DK4¹⁰mCD14DV06») способен подавлять LPS-индуцированную секрецию TNF α и снижать индукцию секреции IFN γ CD8⁺ Т-клетками (см. фиг. 21 и фиг. 22), эту молекулу исследовали на хорошо известной и общепринятой модели сепсиса.

[00140] Вкратце, мышей Balb/C дикого типа получали и акклиматизировали в соответствии со стандартными протоколами IACUCU. Мышей содержали на стандартном корме и воде ad libitum с 12-ч циклом свет/темнота.

[00141] Носитель, DK4¹⁰mCD14DV06, вводили животным подкожно в указанной дозе в 100 мл буфера носителя на указанные временные точки до («до») или после («пост») внутрибрюшинного введения LPS (350 мг/мышь).

[00142] После 4 суток акклиматизации пять (5) мышей в каждой группе обрабатывали следующим образом:

1 мг/кг DK4¹⁰mCD14DV06 за 30 мин до введения LPS; и

1 мг/кг DK4¹⁰mCD14DV06 через 30 мин после введения LPS

[00143] Определяли выживаемость мышей через 48 ч после введения LPS. Обработка мышей DK4¹⁰mCD14DV06 за 30 мин до введения LPS приводила к 100% выживаемости, тогда как обработка мышей DK4¹⁰mCD14DV06 через 30 мин после введения LPS продемонстрировала защитные эффекты против септического шока (фиг. 25).

[00144] Данные свидетельствуют о том, что связывание варианта IL-10 с вариантом IL-4 (IL-4ng) и нацеливание двух молекул через каркасную систему Debo с 6 CDR из мышинового анти-CD14 антитела (например, с использованием DK4¹⁰mCD14DV06) достоверно ослабляла воспалительную реакцию и обеспечивает лечение септического шока.

[00145] В данном письменном описании используются примеры для раскрытия аспектов настоящего изобретения, включая предпочтительные варианты осуществления, а также для предоставления возможности любому специалисту в данной области техники

применять на практике его аспекты, включая создание и применение любых устройств или систем и выполнение любых включенных способов. Патентоспособный объем этих аспектов определяется формулой изобретения и может включать другие примеры, которые очевидны для специалистов в данной области. Предполагается, что такие другие примеры входят в объем формулы изобретения, если они имеют структурные элементы, которые не отличаются от буквального языка формулы изобретения, или если они включают эквивалентные структурные элементы с несущественными отличиями от буквального языка формулы изобретения. Аспекты из различных описанных вариантов осуществления, а также другие известные эквиваленты для каждого такого аспекта могут быть смешаны и совмещены специалистами в данной области техники для создания дополнительных вариантов осуществления и способов в соответствии с принципами настоящей заявки.

Список ссылок

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Emmerich J. (2012). IL-10 Directly Activates and Expands Tumor-Resident CD8g TCells without DeNovo Infiltration from Secondary Lymphoid Organs. *Cancer Research*, 3570-3581.

Fedorak R. (2000). Recombinant Human Interleukin 10 in the Treatment of Patients with Mild to Moderately Active Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 1473-1482. Gooch, J. L. (1998). Interleukin 4 Inhibits Growth and Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Cancer*

Research.

Greve J. M. (2000). *Патент США № 6028176*.

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

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

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

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

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

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

Lee H. L. (2016). Tumor growth suppressive effect of IL-4 through p21-mediated activation of STAT6 in IL-4Ra overexpressed melanoma models. *Oncotarget*. Li, R. (2013). Expression of recombinant human IL-4 in *Pichia pastoris* and relationship between its glycosylation and biological function. *Protein Expression and Purification*.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Spigel D. R. (2020). Randomized phase II study of pembrolizumab (P) alone versus pegilodecakin (PEG) in combination with P as first-line (1L) therapy in patients (pts) with stage IV non-small cell lung cancer (NSCLC) with high PD-L1 expression (CYPRESS 1). *ASCO*, (p. 9563).

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

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

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок на основе двух цитокинов, содержащий мономеры IL-10, слитые с одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv) или антигенсвязывающим фрагментом моноклонального антитела, и второй цитокин, где второй цитокин слит между VH- и VL-областями scFv или антигенсвязывающего фрагмента.

2. Слитый белок на основе двух цитокинов формулы (I):

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

где:

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

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

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

где, когда X¹ представляет собой VL, то X² представляет собой VH, или когда X¹ представляет собой VH, то X² представляет собой VL, «Z» представляет собой цитокин, отличный от IL-10;

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

3. Слитый белок на основе двух цитокинов по п.2, где X¹ и X² получены из первого моноклонального антитела, специфичного для рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различных иммунных контрольных точек-мишеней, таких как, не ограничиваясь этим, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD20; CD47; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAPα; 5T4; Trop2; EDB-FN; ловушки TGFβ; MAdCam, субъединицы интегрин β7; интегрин α4β7; интегрин α4 SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-11; SR-J1; ВИЧ или вируса Эбола.

4. Слитый белок на основе двух цитокинов по п.2, где VL и VH получены из первого моноклонального антитела, которое представляет собой антитело против ВИЧ или антитело против вируса Эбола.

5. Слитый белок на основе двух цитокинов по п.4, где VL и VH из моноклонального антитела против ВИЧ или против вируса Эбола включают 6 CDR, которые привиты (замещены) 6 CDR из второго антитела.

6. Слитый белок на основе двух цитокинов по п.5, где второе антитело представляет собой моноклональное антитело, выбранное из антитела против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различных иммунных контрольных точек-мишеней, таких как, не ограничиваясь этим, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD20; CD47; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAPα; 5T4; Trop2; EDB-FN; ловушки TGFβ; MAdCam, субъединицы интегрин β7; интегрин α4β7; интегрин α4 SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-11 или SR-J1.

7. Слитый белок на основе двух цитокинов по п.5, где 6 привитых CDR второго моноклонального антитела включают 6 CDR из анти-EGFR антитела, анти-HER2 антитела, анти-VEGFR1 антитела или анти-VEGFR2 антитела, где 6 CDR включают CDR 1-3 из VL и CDR 1-3 из VH.

8. Слитый белок на основе двух цитокинов по п.2, где Z представляет собой цитокин, выбранный из IL-6, IL-4, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-15, IL-21, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, GM-CSF, G-CSF, интерферонов- α , - β , - γ , TGF- β или факторов некроза опухолей - α , - β , основного FGF, EGF, PDGF, IL-4, IL-11, или IL-13.

9. Слитый белок на основе двух цитокинов по п.2, где Z представляет собой IL-2, IL-4 или IL-15.

10. Слитый белок на основе двух цитокинов по п.2, где Z представляет собой целое число, равное 1.

11. Слитый белок на основе двух цитокинов по п. 2, дополнительно содержащий линкеры.

12. Слитый белок на основе двух цитокинов по п.2, где IL-10 представляет собой SEQ ID NO: 3, 12, 14, 16.

13. Слитый белок на основе двух цитокинов по п.2, где слитый белок на основе двух цитокинов представляет собой SEQ ID NO: 35, 46-58 или 59.

14. Слитый белок IL-10 формулы (II):

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

где:

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

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

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

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

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

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

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

15. Слитый белок IL-10 по п.14, где VL и VH получены из первого антитела, специфичного для рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различных иммунных контрольных точек-мишеней, таких как, не ограничиваясь этим, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD20; CD47; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Trop2; EDB-FN;

ловушки TGF β ; MAdCam, субъединицы интегрин β 7; интегрин α 4 β 7; интегрин α 4 SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-11; SR-J1; ВИЧ или вируса Эбола.

16. Слитый белок IL-10 по п.15, где VL и VH получены из первого антитела, специфичного для ВИЧ или вируса Эбола.

17. Слитый белок IL-10 по п.16, где VL и VH из антитела против ВИЧ или антитела против вируса Эбола включают 6 CDR, которые привиты (замещены) 6 CDR из второго антитела.

18. Слитый белок IL-10 по п.17, где второе антитело представляет собой антитело, выбранное из антитела против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); CD14; CD52; различных иммунных контрольных точек-мишеней, таких как, не ограничиваясь этим, PD-L1, PD-1, TIM3, BTLA, LAG3 или CTLA4; CD20; CD47; GD-2; VEGFR1; VEGFR2; HER2; PDGFR; EpCAM; ICAM (ICAM-1, -2, -3, -4, -5), VCAM, FAP α ; 5T4; Троп2; EDB-FN; ловушки TGF β ; MAdCam, субъединицы интегрин β 7; интегрин α 4 β 7; интегрин α 4 SR-A1; SR-A3; SR-A4; SR-A5; SR-A6; SR-B; dSR-C1; SR-D1; SR-E1; SR-F1; SR-F2; SR-G; SR-H1; SR-H2; SR-11 или SR-J1.

19. Слитый белок на основе IL-10 по п.17, где 6 привитых CDR из второго антитела включают 6 CDR из анти-EGFR антитела, где 6 CDR включают CDR 1-3 из VL и CDR 1-3 из VH.

20. Слитый белок IL-10 по п.14, где слитый белок представляет собой SEQ ID NO: 35, 46-58 или 59.

21. Способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества слитого белка по пп.1, 2 или 14.

22. Способ по п.21, где слитый белок содержит VL- и VH-области из первого антитела, выбранного из антитела против ВИЧ или антитела против вируса Эбола, и где 6 участков CDR из первого антитела привиты 6 участками CDR из второго антитела, выбранного из анти-EGFR антитела, анти-HER2 антитела, анти-VEGFR1 антитела или анти-VEGFR2 антитела.

23. Способ по п.22, где первое антитело представляет собой антитело против вируса Эбола, и второе антитело выбрано из анти-EGFR антитела, анти-HER2 антитела, анти-VEGFR1 антитела или анти-VEGFR2 антитела.

24. Способ по п.21, где цитокин или «Z» представляет собой IL-2.

25. Способ по п.24, где «Z» имеет значение «n», равное 1.

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

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

28. Способ по п.21, где слитый белок представляет собой SEQ ID NO: 35, 52-54 или 55.

29. Способ лечения воспалительного заболевания, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества слитого белка по пп.1, 2 или 14.

30. Способ по п.29, где слитый белок содержит VL- и VH- области из первого

антитела, выбранного из антитела против ВИЧ или антитела против вируса Эбола, и где 6 участков CDR из первого антитела привиты 6 участками CDR из анти-EGFR антитела, анти-HER2 антитела, анти-VEGFR1 антитела или анти-VEGFR2 антитела.

31. Способ по пп.29 или 30, где цитокин «Z» представляет собой IL-4.

32. Способ по п.29, где «Z» имеет значение «n», равное 1.

33. Способ по п.29, где слитый белок вводят в дозе от 0,01 нг/мл до 100 нг/мл.

34. Способ по п.29, где воспалительное заболевание представляет собой сепсис, болезнь Крона, ревматоидный артрит, псориаз и/или воспалительное заболевание кишечника (IBD).

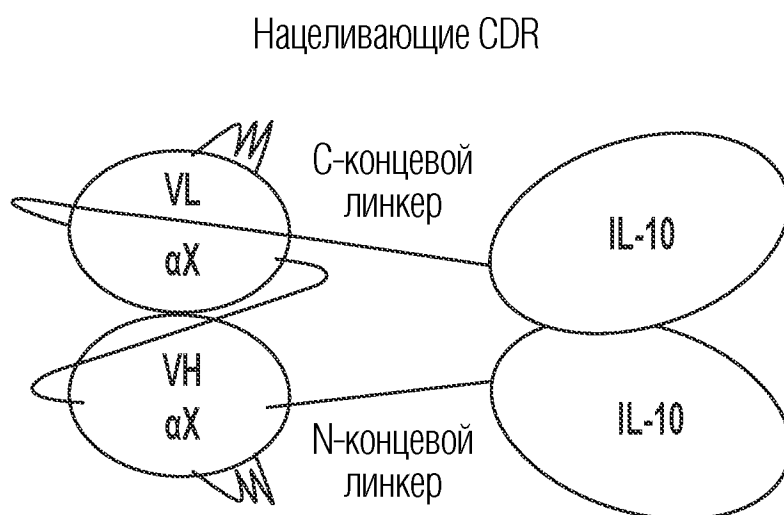
35. Способ по п.34, где мономер IL-10 представляет собой DV06 с SEQ ID NO: 14.

36. Способ по п.29, где слитый белок содержит VL- и VH- области из первого антитела, выбранного из антитела против вируса Эбола, и где 6 участков CDR из первого антитела привиты 6 участками CDR второго антитела, выбранного из анти-CD14 антитела, анти-MAdCAM антитела, анти-VEGFR1 антитела или анти-VEGFR2 антитела.

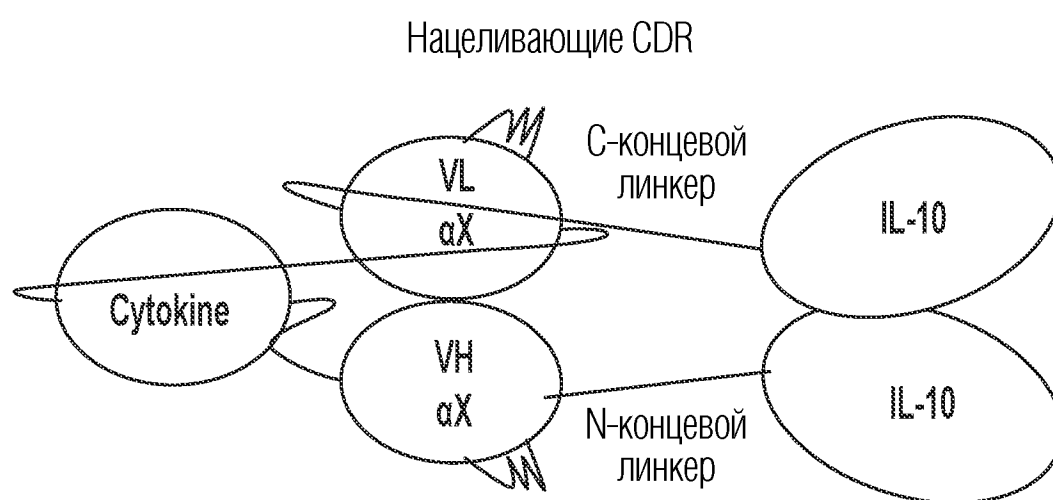
37. Способ по п.34, где мономер IL-10 представляет собой DV07 с SEQ ID NO: 16.

38. Способ по п.29, где слитый белок представляет собой белок с SEQ ID NO: 46-51, 56-58 или 59.

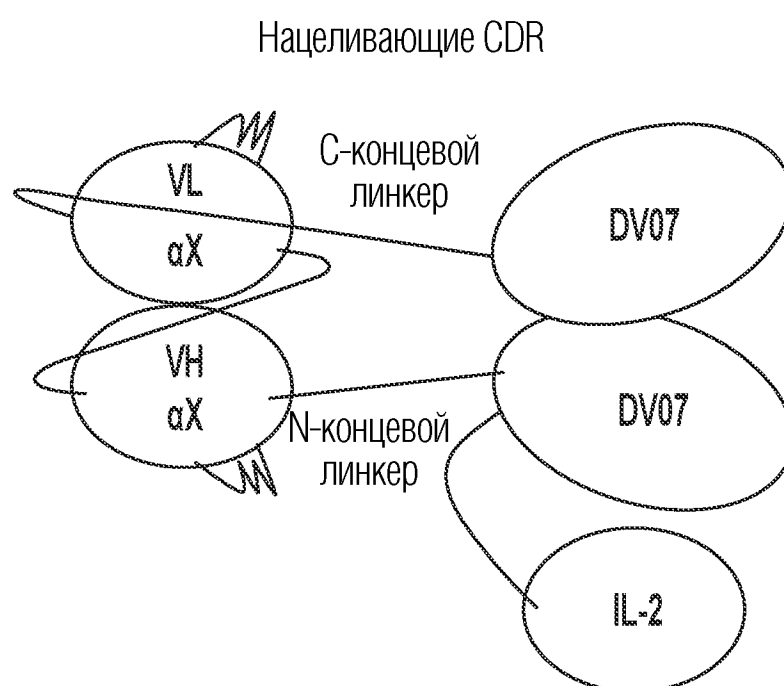
39. Способ лечения сепсиса, септического шока и/или ассоциированных с ними симптомов, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества слитого белка по пп.1, 2 или 14.



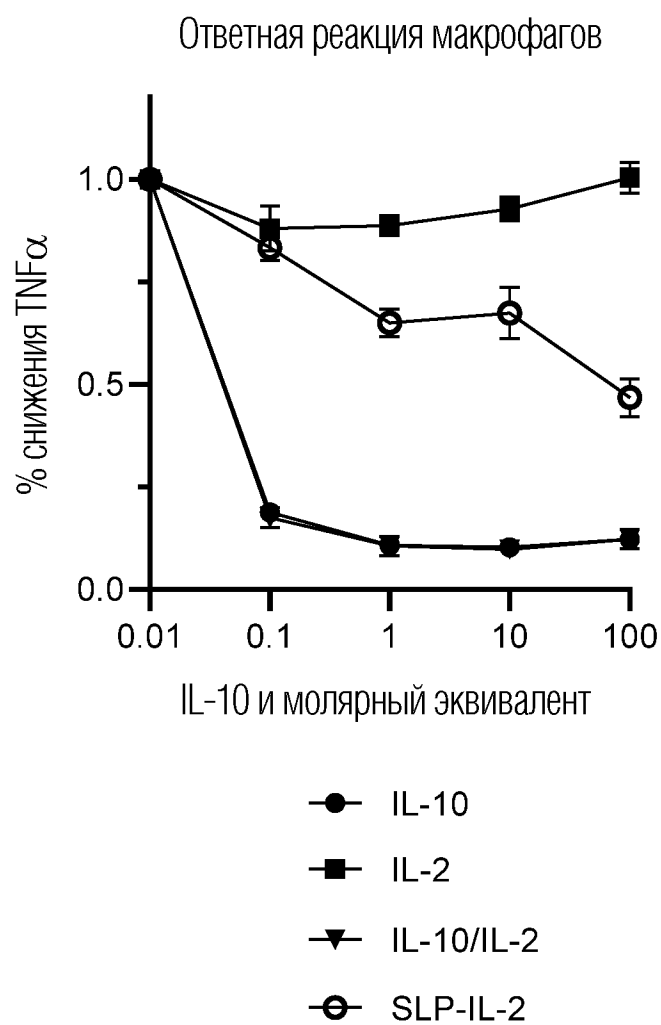
ФИГ. 1



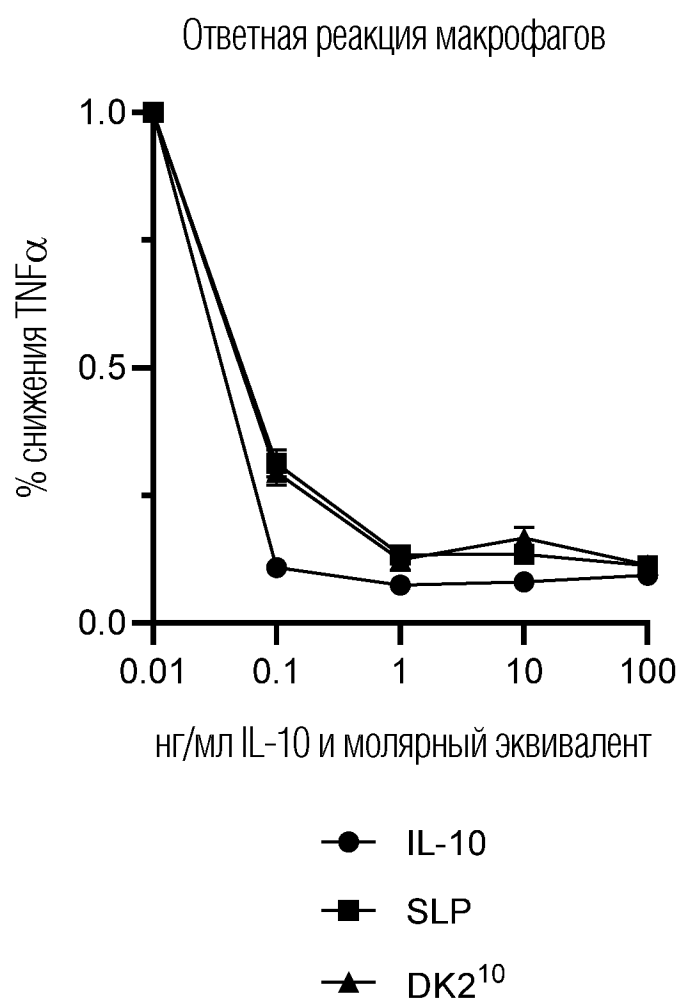
ФИГ. 2



ФИГ. 3

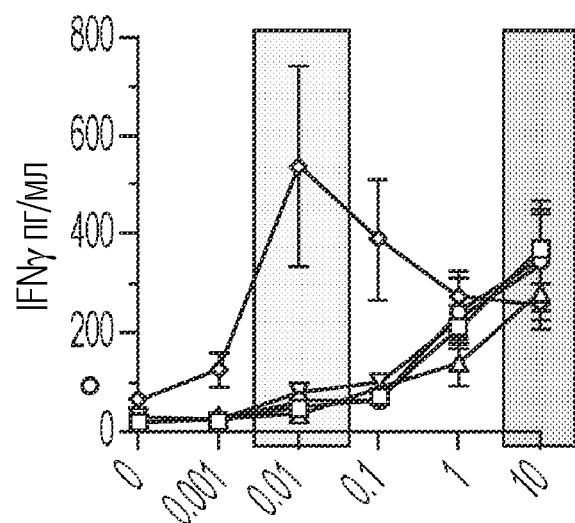


ФИГ. 4



ФИГ. 5

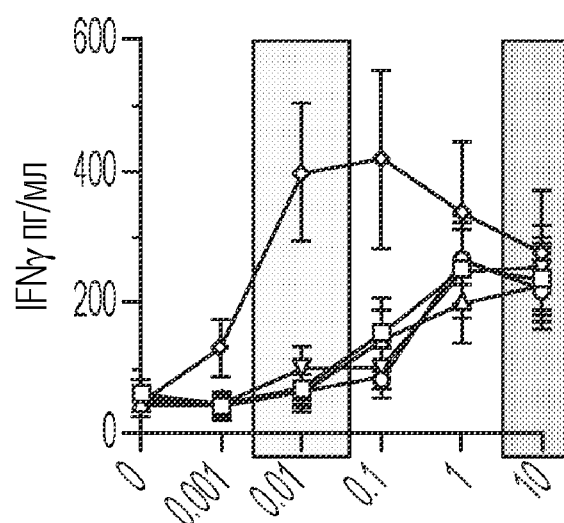
Ответная реакция CD8+ Т-клеток
(интратуморальных)



нг/мл IL-10 и молярный эквивалент

- IL-10
- IL-2
- △ IL-10/IL-2
- ▽ SLP
- ◇ DK210

Ответная реакция CD4+ Т-клеток
(интратуморальных)



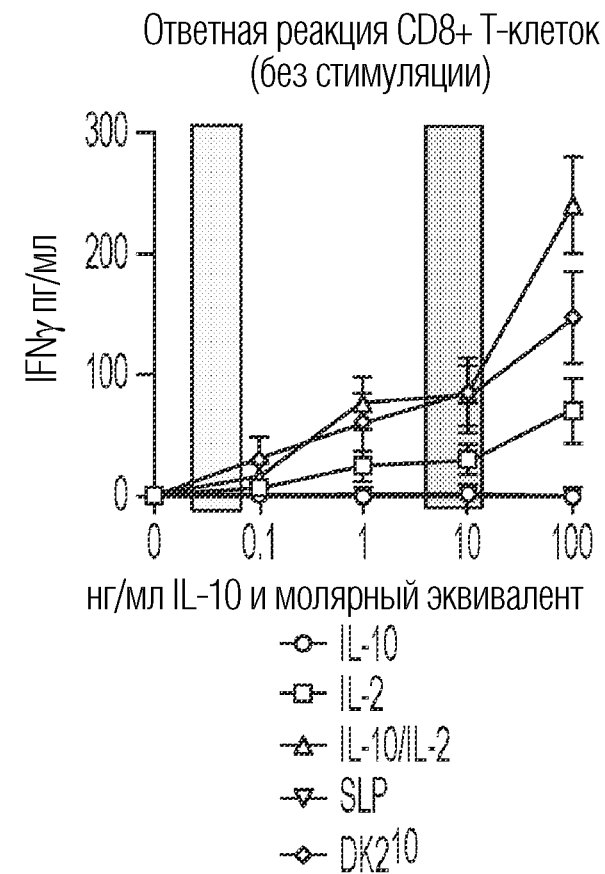
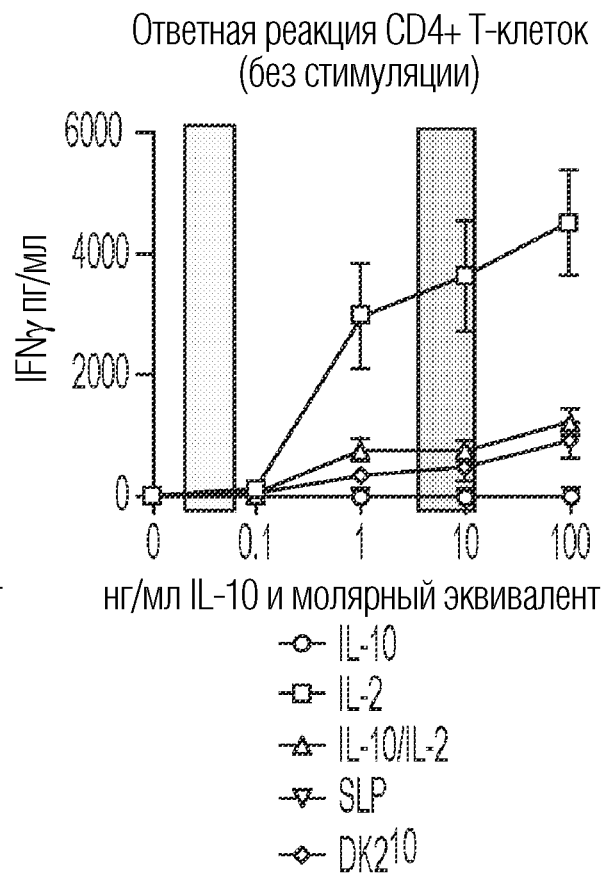
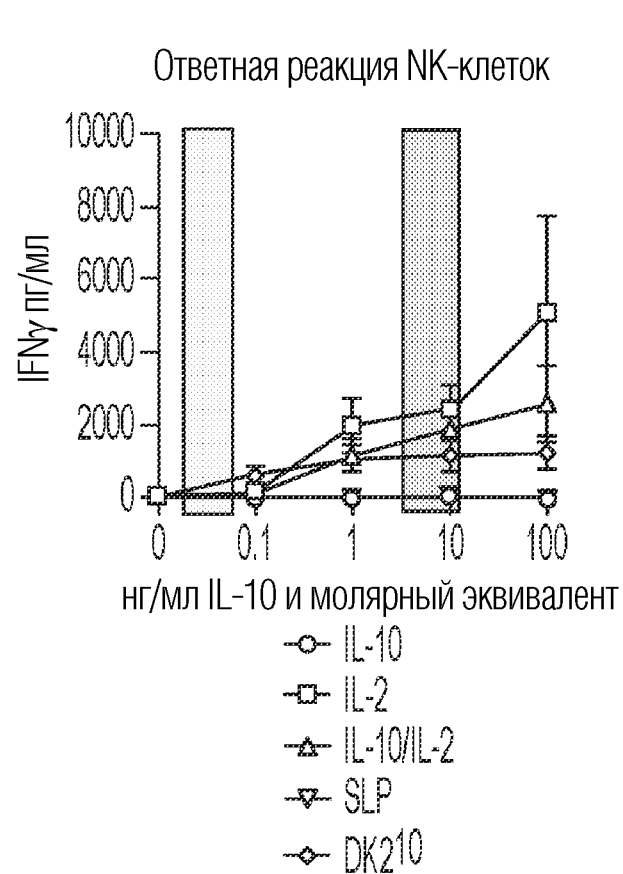
нг/мл IL-10 и молярный эквивалент

- IL-10
- IL-2
- △ IL-10/IL-2
- ▽ SLP
- ◇ DK210

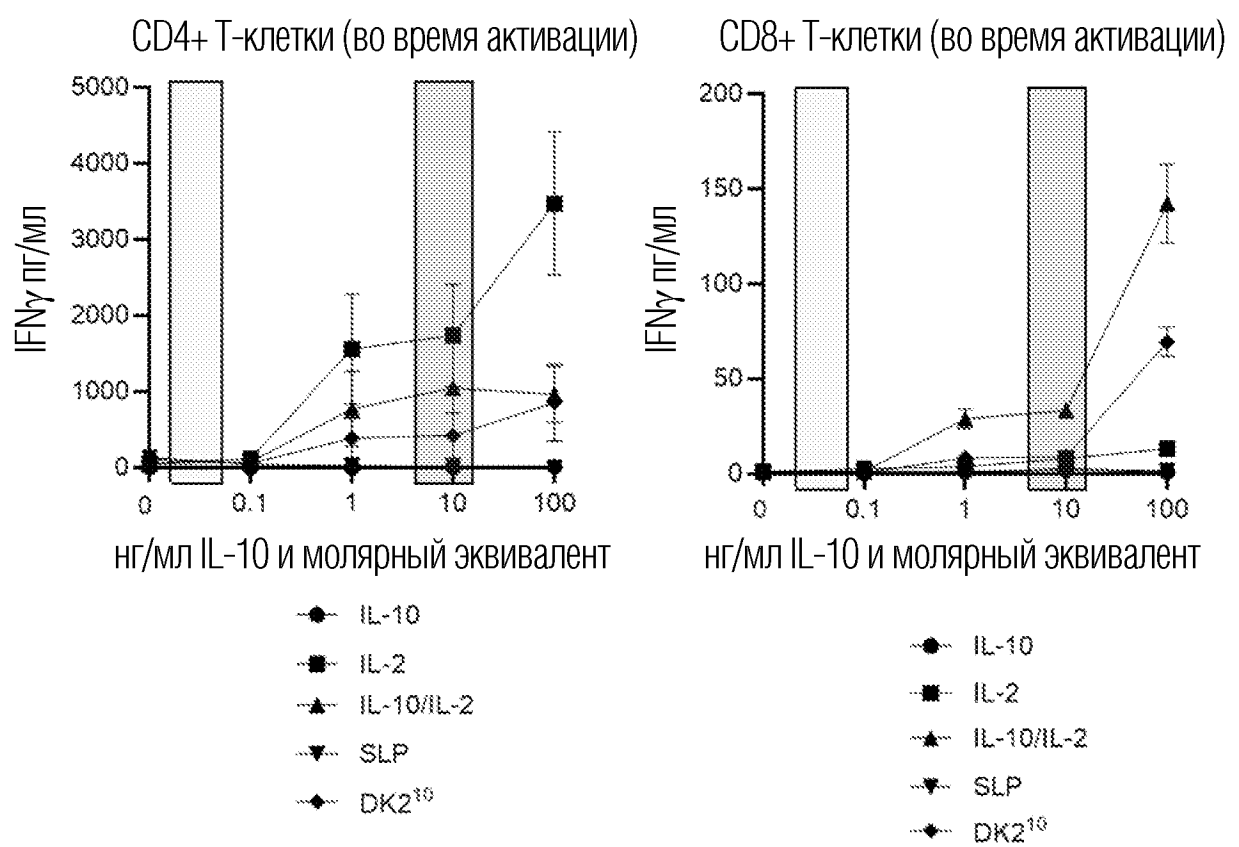
Концентрация цитокина для
максимальной активности:

- IL-2 и IL-10 5-20 нг/мл
- DK210 0,005-0,05 нг/мл

ФИГ. 6

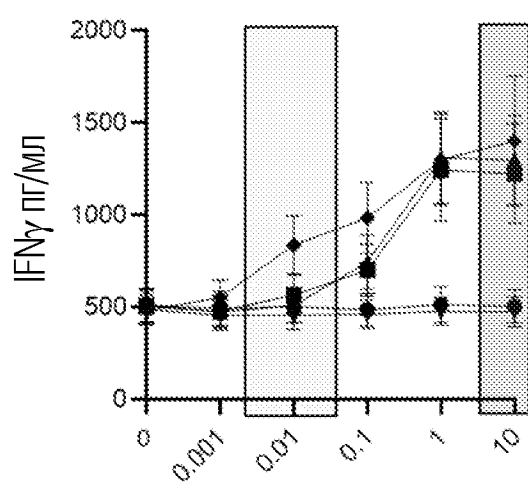


ФИГ. 7



ФИГ. 8

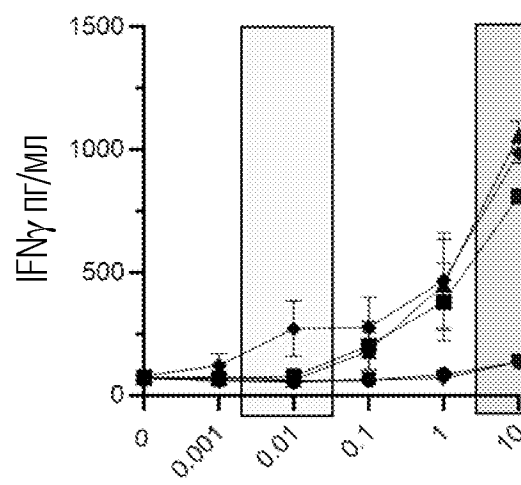
Ответная реакция CD4+ Т-клеток
(после активации-до конечного анти-CD3)



нг/мл IL-10 и молярный эквивалент

- IL-10
- IL-2
- ▲ IL-10/IL-2
- ▼ SLP
- ◆ DK2¹⁰

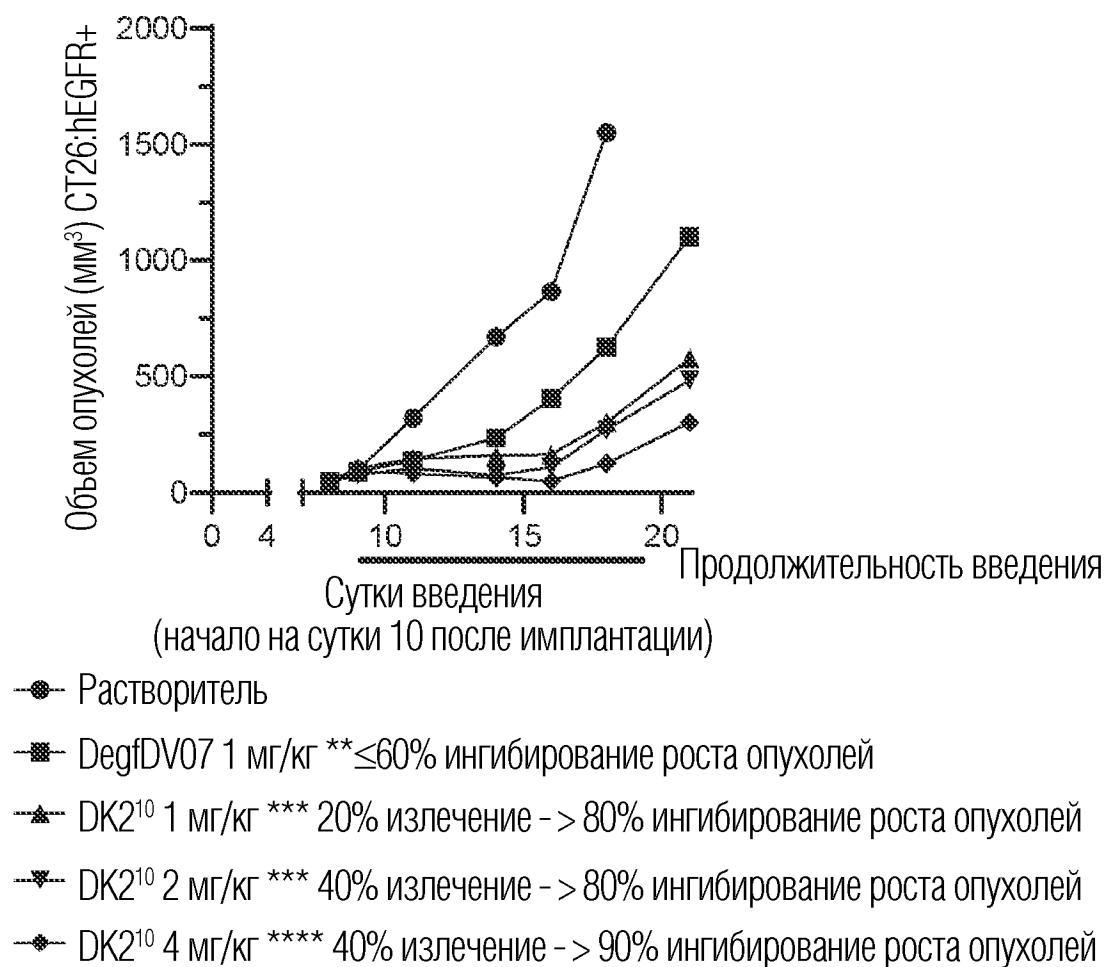
Ответная реакция CD8+ Т-клеток
(после активации-до конечного анти-CD3)



нг/мл IL-10 и молярный эквивалент

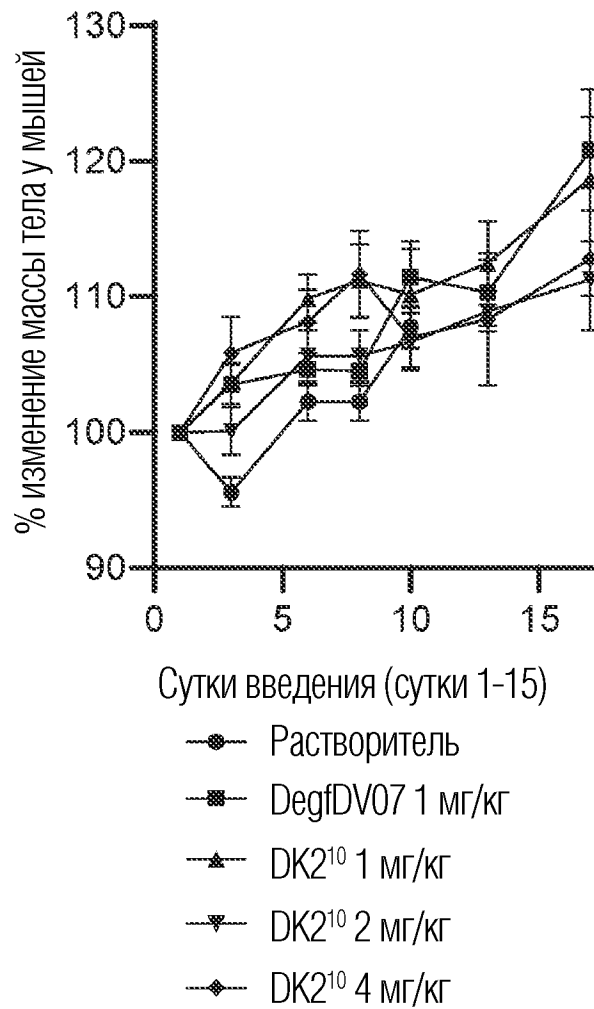
- IL-10
- IL-2
- ▲ IL-10/IL-2
- ▼ SLP
- ◆ DK2¹⁰

ФИГ. 9

Противоопухолевые эффекты DegfDV07 и DK2¹⁰

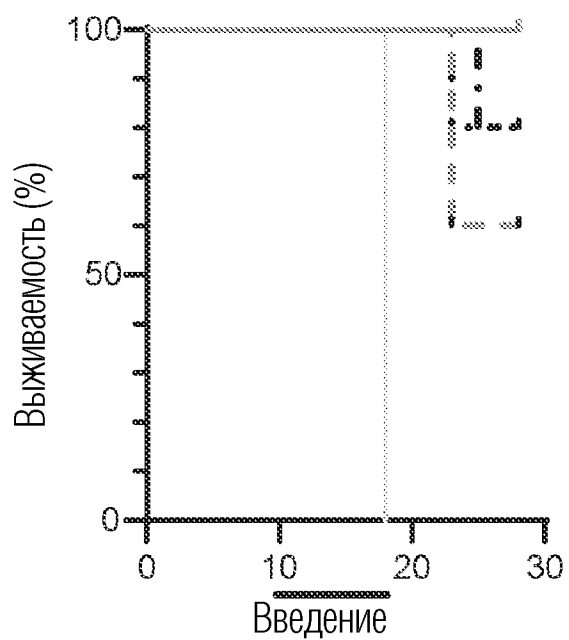
Статистика с суток 10 введения, когда мышей с введением растворителя подвергали эвтаназии

ФИГ. 10

Влияние DegfDV07 и DK2¹⁰ на массу тела

ФИГ. 11

Влияние DegfDV07 и DK2¹⁰ на выживаемость

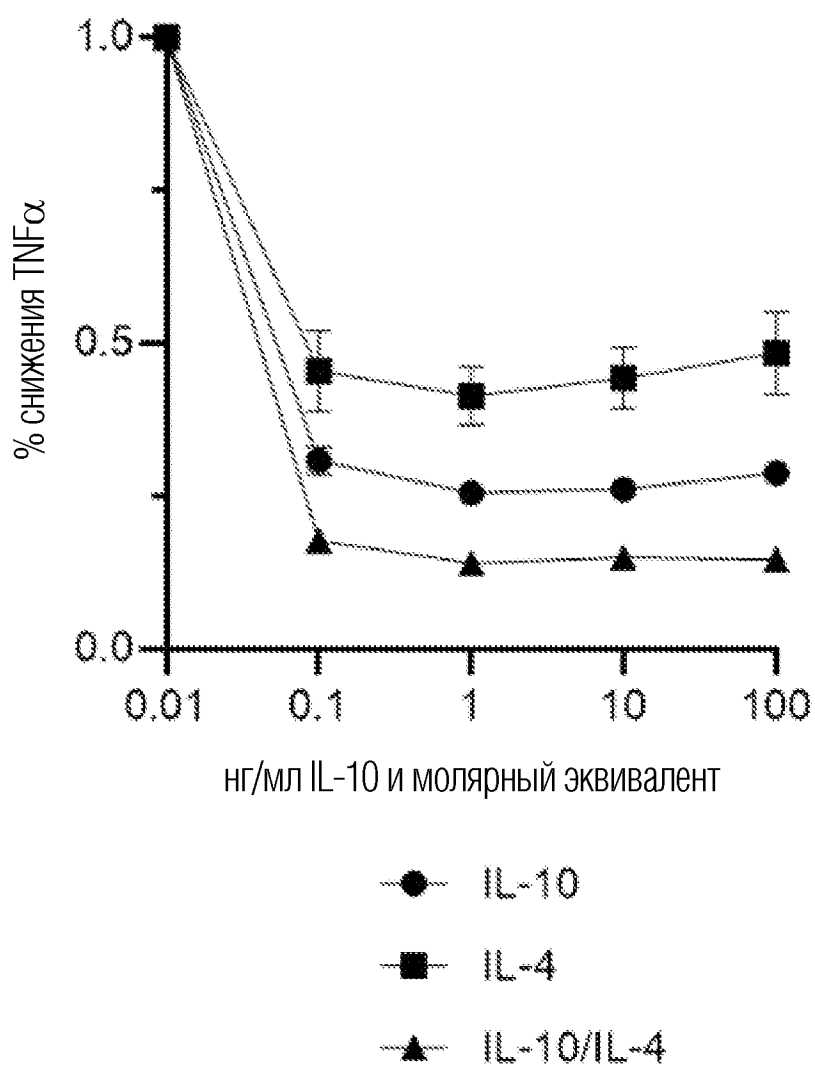


Сутки после имплантации опухолей

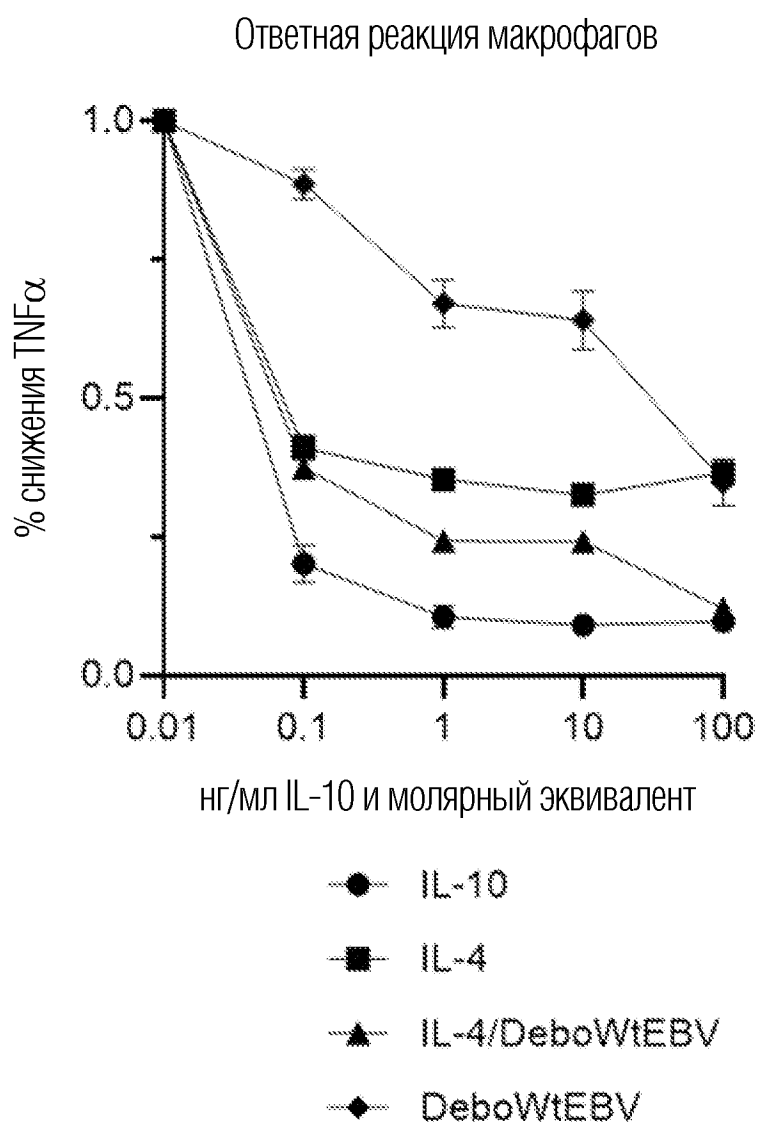
- Растворитель
- × × × × DegfDV07 1 мг/кг
- * * * DK2¹⁰ 1 мг/кг
- × × × × DK2¹⁰ 2 мг/кг
- × × × × DK2¹⁰ 4 мг/кг

ФИГ. 12

Ответная реакция макрофагов

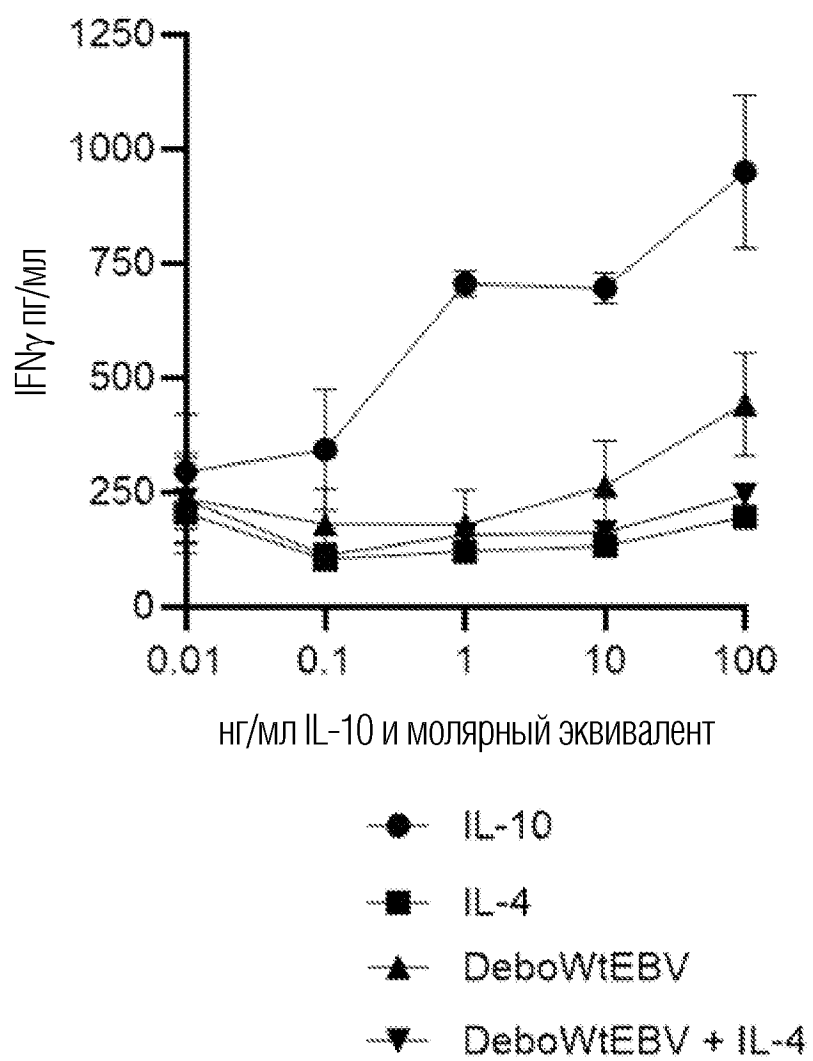


ФИГ. 13

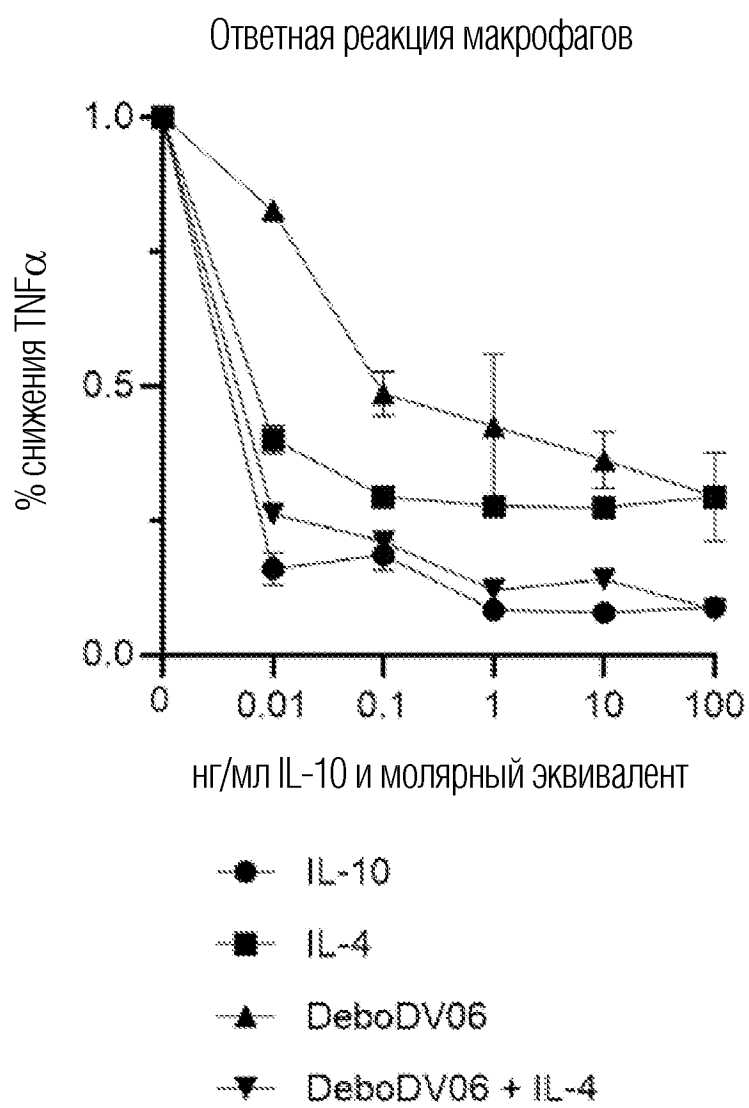


ФИГ. 14

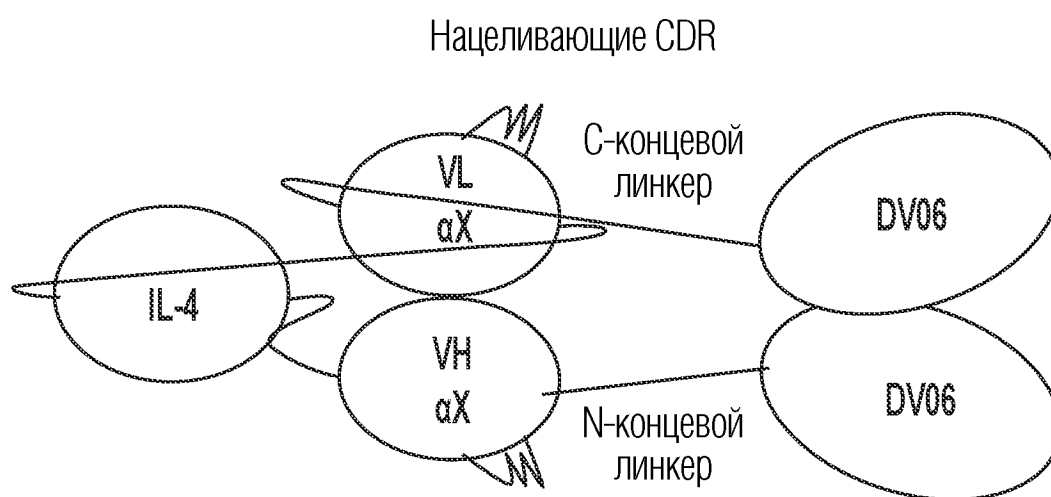
Ответная реакция Т-клеток



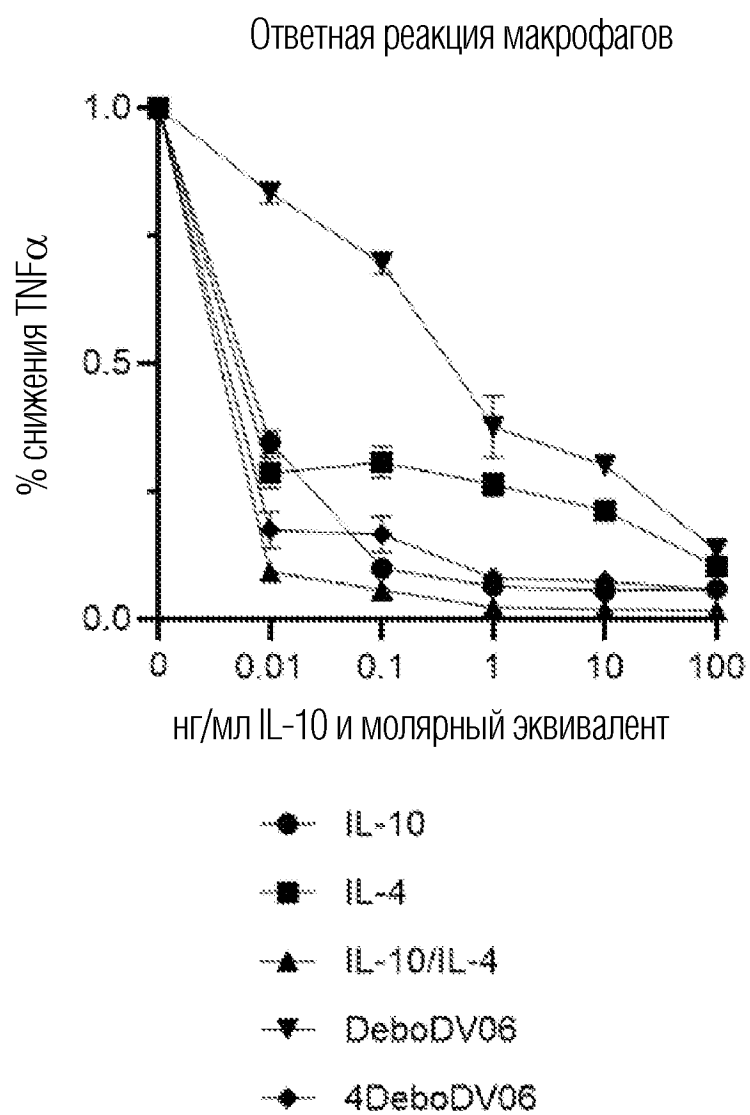
ФИГ. 15



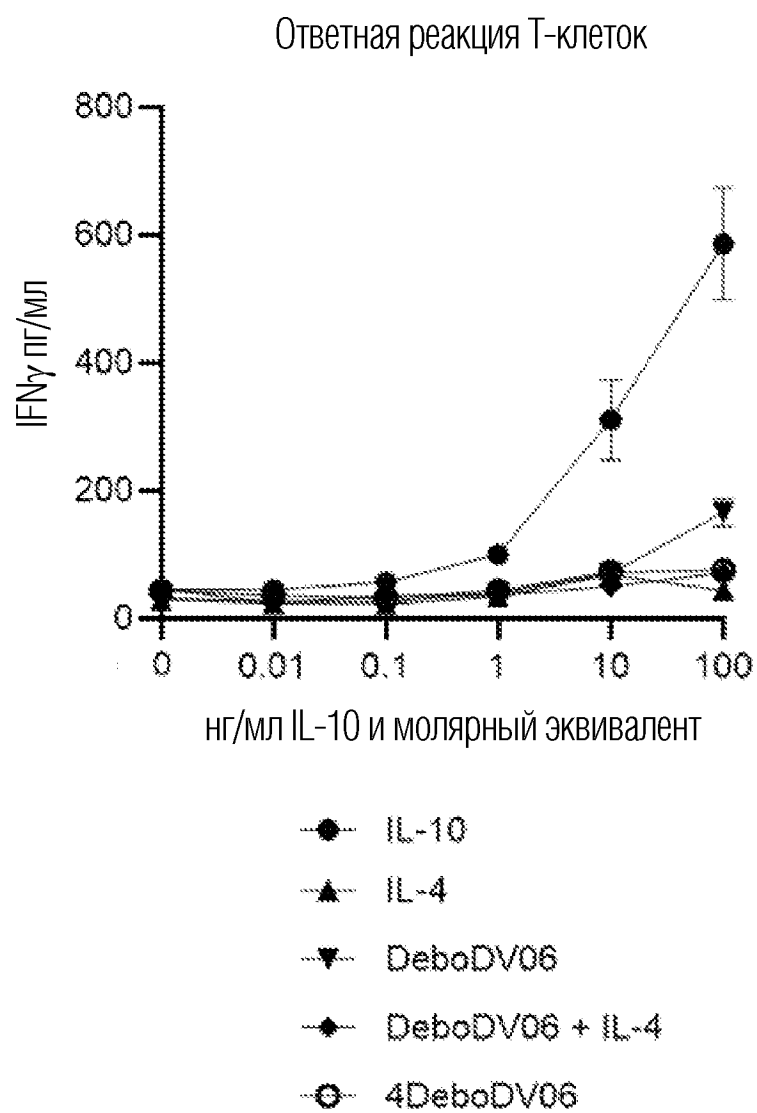
ФИГ. 16



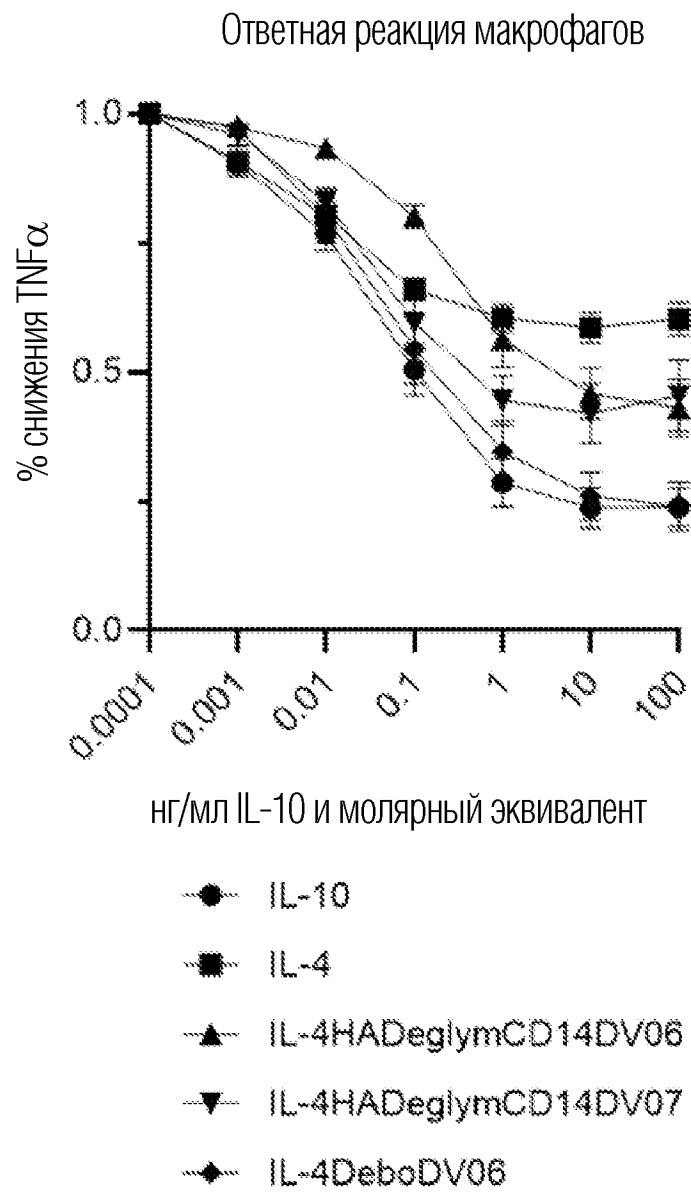
ФИГ. 17



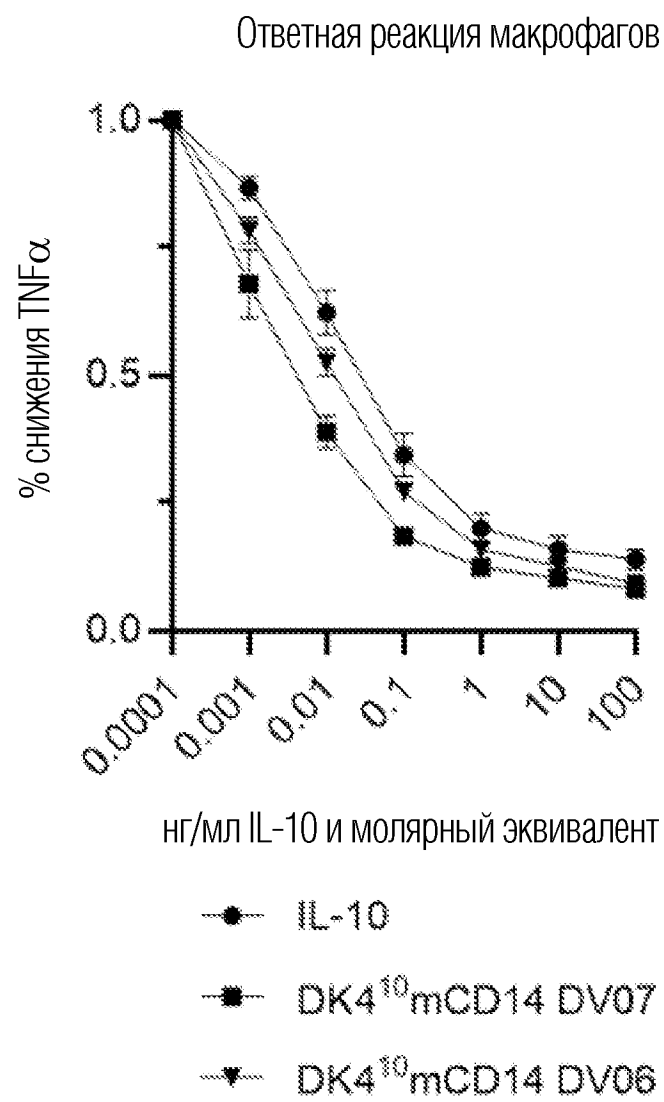
ФИГ. 18



ФИГ. 19

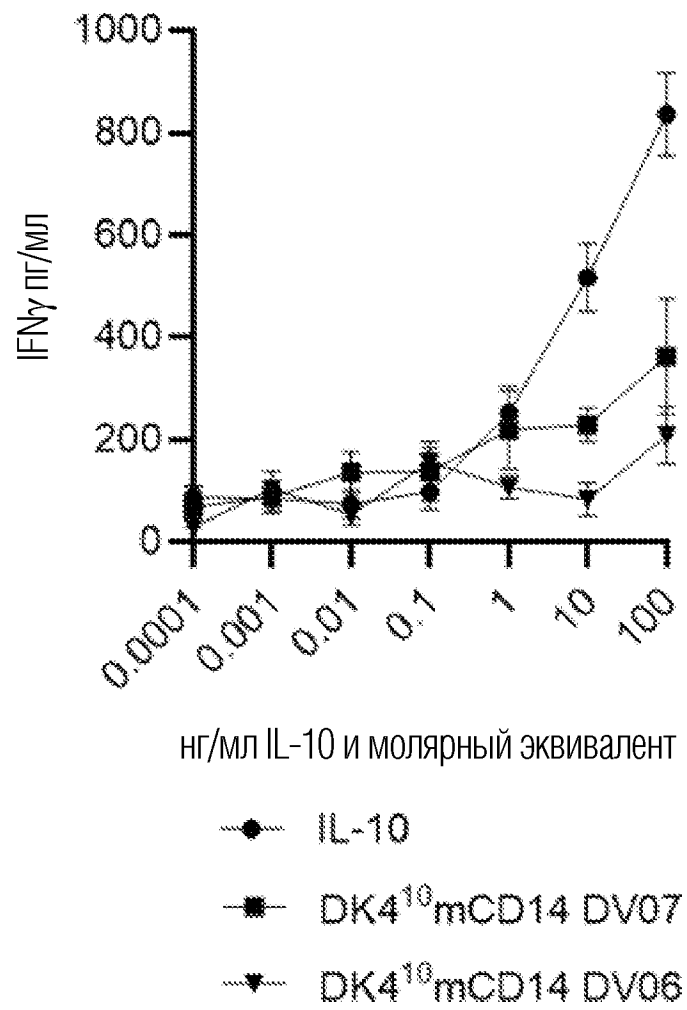


ФИГ. 20

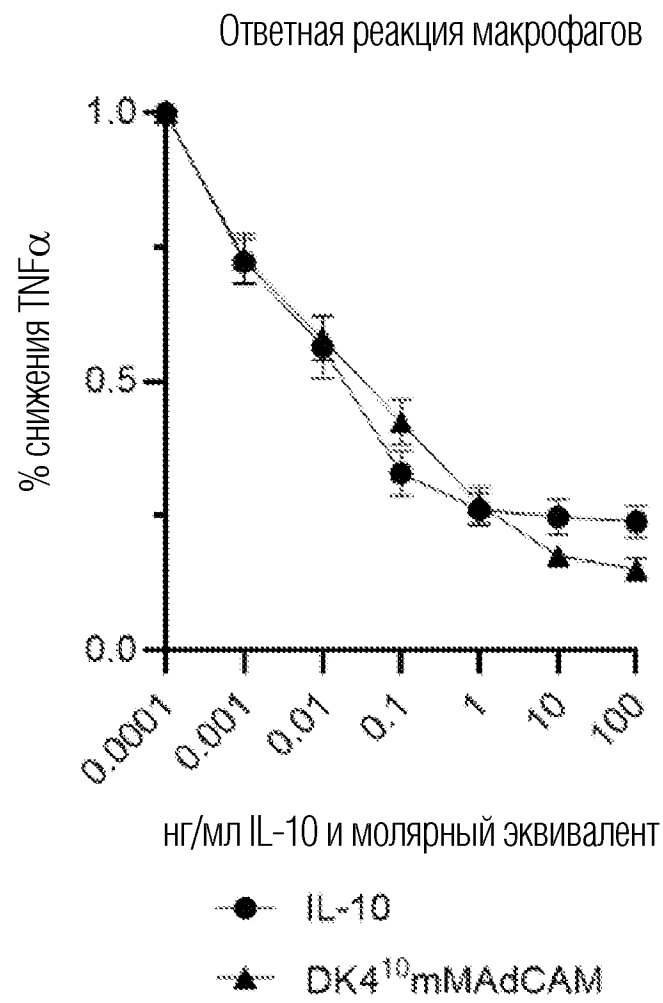


ФИГ. 21

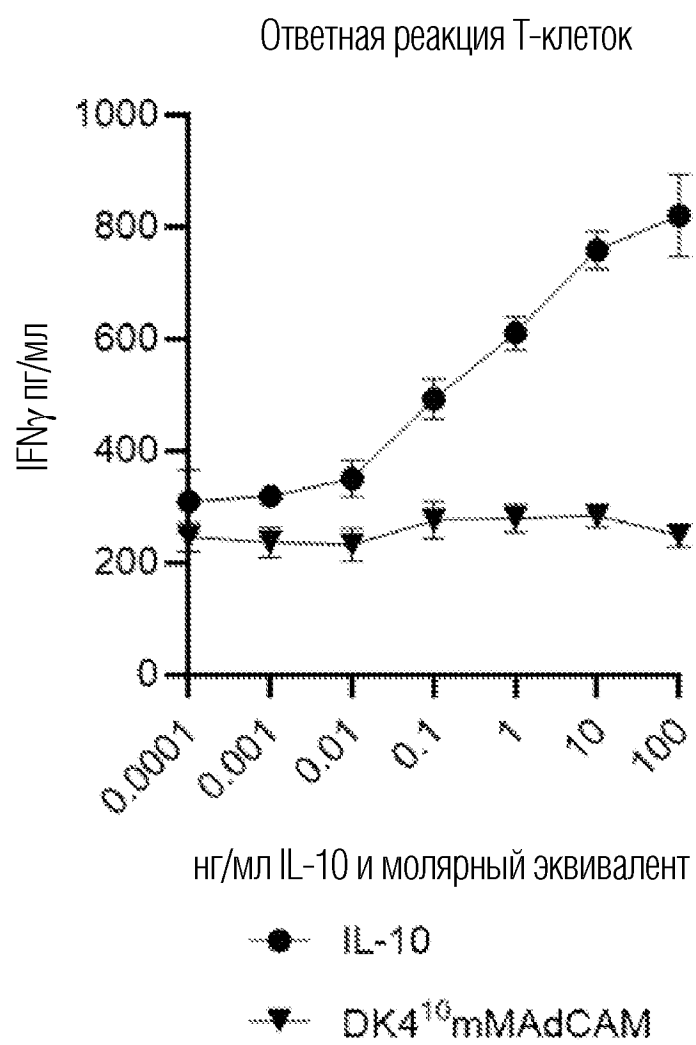
Ответная реакция Т-клеток



ФИГ. 22

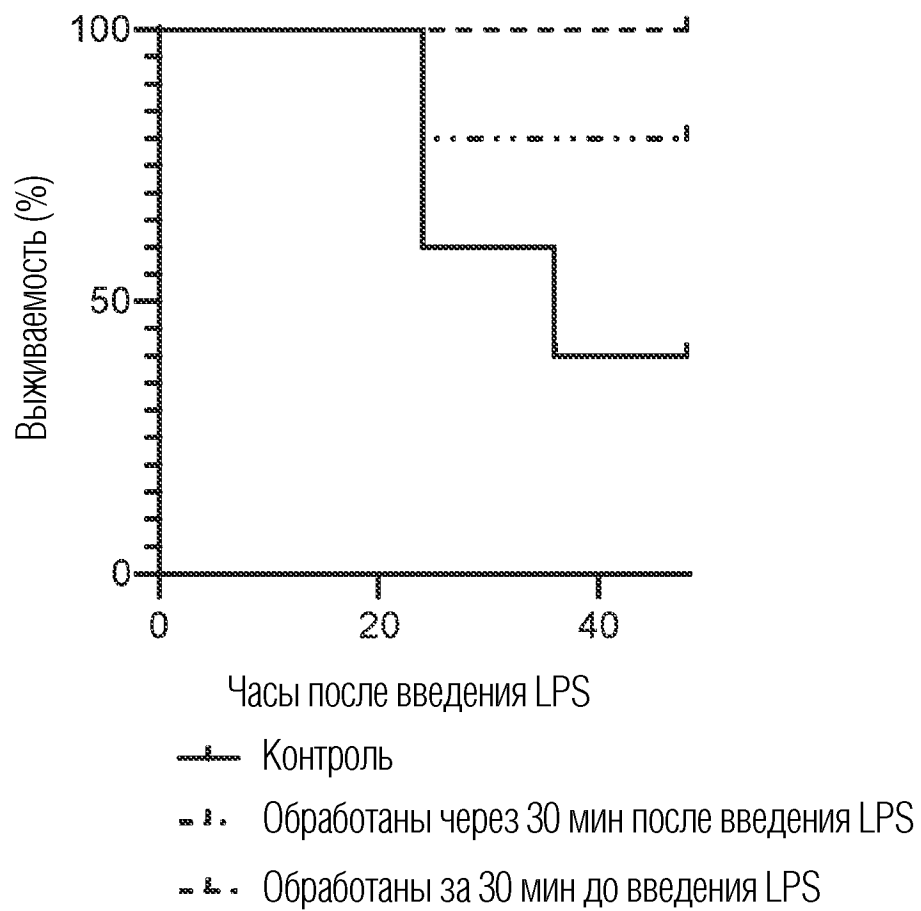


ФИГ. 23



ФИГ. 24

DK4¹⁰ (CD14) в разовой дозе 20 мкг обеспечивает
защитный эффект от септического шока



ФИГ. 25