

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2020116541, 04.01.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
04.01.2018 US 62/613,653

(43) Дата публикации заявки: 04.02.2022 Бюл. № 4

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 04.08.2020(86) Заявка РСТ:
IB 2019/000013 (04.01.2019)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2019/135159 (11.07.2019)Адрес для переписки:
119019, Москва, Гоголевский бульвар, 11,
Гизатулина Евгения Михайловна

(71) Заявитель(и):

**ШАНХАЙ ЛЮМОСА ТЕРАПЬЮТИКС
КО., ЛТД. (CN),
ЛЮМОСА ТЕРАПЬЮТИКС КО., ЛТД.
(TW)**

(72) Автор(ы):

**ЧЭНЬ, Пэй-Цзюнь (TW),
ЛИ, Шу-Хуа (TW)**(54) **СЛИТЫЕ БЕЛКИ ОДНОДОМЕННОЕ АНТИТЕЛО-ЦИТОЗИНДЕЗАМИНАЗА**

(57) Формула изобретения

1. Слитый белок, содержащий Формулу I или Формулу II, где:

Формула I представляет собой $N-(L)_n-C$; иФормула II представляет собой $C-(L)_n-N$;где N представляет собой однодоменное антитело (sdAb) или его функциональный вариант, L представляет собой пептидный линкер, $n = 0-50$, а C представляет собой белок цитозиндезаминазу (CD) или его функциональный вариант.2. Слитый белок по п. 1, где $n = 0$.3. Слитый белок по п. 1, где $n = 1$.4. Слитый белок по п. 1, где $n = 2$.

5. Слитый белок по любому из пп. 1-4, где слитый белок состоит по сути из Формулы I или Формулы II.

6. Слитый белок по любому из пп. 1-5, где слитый белок состоит из Формулы I или Формулы II.

7. Слитый белок по любому из пп. 1-6, где sdAb или его функциональный вариант связываются с мишенью, при этом мишень необязательно выбирают из группы, состоящей из молекулы клеточной мембраны, секретируемой молекулы и внутриклеточной молекулы.

8. Слитый белок по п. 7, где мишень представляет собой опухоль-ассоциированный антиген или опухоль-специфический антиген.

9. Слитый белок по п. 7 или 8, где мишень выбирают из группы, состоящей из EGFR, 5T4, A33, AFP, бета-катенина, BRCA1, BRCA2, C242, CCR4, CD152, CD19, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23, CD30, CD3, CD37, CD40, CD44, CD5, CD51, CD52, CD56, CD64, CD74, CD80, CDCP1, c-KIT, COX-2, cMET, CSF1R, CTLA-4, EGF2, ErbB2, ErbB3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, HER2, HER3, HIF-1 α , HLA-DR, IGF-IR, mTOR, NPC-1C, P53, PDGFR α , PDGFR β , PLGF, PSA, RGMa, RoN, TNF, TP53, TPD52, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, CA-IX, α v β 3, α 5 β 1, FAP, гликопротеина 75, TAG-72, MUC16, NR-LU-13, SLAMF7, EGP40, BAFF, PRL-3, карциноэмбрионального антигена (CEA), простат-специфического мембранного антигена, MART-1, gp100, раково-тестикулярных (CT) антигенов (например, NY-ESO-1, MAGE-A3, MAGE-A1), hTERT, мезотелина, MCC, Mum-1, ERBB2IP, EpCAM, TfR, интегрин α 6 β 4, HGFR, PTP-LAR, CD147, CDCP1, CEACAM6, JAM1, интегрин α 3 β 1, интегрин α v β 3, PD-L1, AXL, CDH6, DLL3, EDNRB, EFNA4, NEPP3, EPHA2, FOLR1, LewisY, GPNMB, GUCY2C, HAVCR1, интегрин α , LYPD3, MUC1, NECTIN4, NOTCH3, PTK7, SLC34A2, SLC39A6, SLC44A4, SLITRK6, STEAP1, TACSTD2, TPBG, TIM-1, GD2 и никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR).

10. Слитый белок по п. 7 или 8, где мишень выбирают из группы, состоящей из EGFR, c-KIT, cMET, HER2, HER3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, IGF-IR, P53, PDGFR α , VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, CA-IX, α v β 3, α 5 β 1, MUC16, карциноэмбрионального антигена (CEA), простат-специфического мембранного антигена, раково-тестикулярных (CT) антигенов (например, NY-ESO-1, MAGE-A3, MAGE-A1), мезотелина, EpCAM, интегрин α 6 β 4, CEACAM6, интегрин α 3 β 1, интегрин α v β 3, PD-L1, AXL, CDH6, DLL3, EDNRB, EFNA4, NEPP3, EPHA2, FOLR1, LewisY, GPNMB, GUCY2C, HAVCR1, интегрин α , LYPD3, MUC1, NECTIN4, NOTCH3, PTK7, SLC34A2, SLC39A6, SLC44A4, SLITRK6, STEAP1, TACSTD2, TPBG, TIM-1, GD2 и никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR).

11. Слитый белок по любому из пп. 7-10, где мишень представляет собой VEGFR2, EGFR, CEA, HER2 или HER3.

12. Слитый белок по п. 11, где мишень представляет собой VEGFR2.

13. Слитый белок по п. 11, где мишень представляет собой EGFR.

14. Слитый белок по п. 11 или 12, где sdAb или его функциональный вариант содержит область, определяющую комплементарность 1 (CDR1), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 31 и 34; CDR2, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 32 и 35; и CDR3, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 33 и 36.

15. Слитый белок по п. 14, где sdAb или его функциональный вариант содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23 (3VGR19).

16. Слитый белок по п. 14, где sdAb или его функциональный вариант содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24 (4VGR17).

17. Слитый белок по п. 14, где sdAb или его функциональный вариант содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25 (4VGR38).

18. Слитый белок по п. 11 или 13, где sdAb или его функциональный вариант содержит CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37 и 40; CDR2, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38 и 41; и CDR3, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39 и 42.

19. Слитый белок по п. 18, где sdAb или его функциональный вариант содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26 (VHH122).

20. Слитый белок по п. 18, где sdAb или его функциональный вариант содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27 (7D12).

21. Слитый белок по п. 11, где sdAb или его функциональный вариант содержит CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 199, 202 и 205; CDR2, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 200, 203 и 206; и CDR3, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 204 и 207.

22. Слитый белок по п. 21, где sdAb или его функциональный вариант содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 69 (2D3).
23. Слитый белок по п. 21, где sdAb или его функциональный вариант содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 70 (5F7).
24. Слитый белок по п. 21, где sdAb или его функциональный вариант содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 71 (47D5).
25. Слитый белок по п. 11, где sdAb или его функциональный вариант содержит CDR1 под SEQ ID NO: 208, CDR2 под SEQ ID NO: 209 и CDR3 под SEQ ID NO: 210.
26. Слитый белок по п. 25, где sdAb или его функциональный вариант содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 75 (BCD090-M2).
27. Слитый белок по п. 11, где sdAb или его функциональный вариант содержит CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 211 и 214; CDR2, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 212 и 215; и CDR3, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 213 и 216.
28. Слитый белок по п. 27, где sdAb или его функциональный вариант содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 77 (ABS29544.1).
29. Слитый белок по п. 27, где sdAb или его функциональный вариант содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 79 (NbCEA5).
30. Слитый белок по п. 1 или любому из пп. 3-29, где по меньшей мере один пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 188.
31. Слитый белок по любому из пп. 1-30, где белок CD или его функциональный вариант представляет собой (i) бактериальный белок CD или его функциональный вариант или (ii) дрожжевой белок CD или его функциональный вариант.
32. Слитый белок по п. 31, где белок CD или его функциональный вариант содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична, на по меньшей мере 91% идентична, на по меньшей мере 92% идентична, на по меньшей мере 93% идентична, на по меньшей мере 94% идентична, на по меньшей мере 95% идентична, на по меньшей мере 96% идентична, на по меньшей мере 97% идентична, на по меньшей мере 98% идентична, на по меньшей мере 99% идентична или на 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22, 186 и 187.
33. Слитый белок по п. 32, где белок CD или его функциональный вариант содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22, 186 и 187.
34. Слитый белок по п. 32, где белок CD или его функциональный вариант состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22, 186 и 187.
35. Слитый белок по п. 31 или 32, где белок CD или его функциональный вариант представляют собой функциональный вариант начальной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22, 186 и 187; при этом, если начальная аминокислотная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22, то функциональный вариант содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из Y84A, Y84H, T85D, T86E, M92N, M92A, M92K, M92Q, V128A, V128T, V129A, V129L, V129I, V129T, V130A и V130T; и при этом, если начальная аминокислотная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 186 или SEQ ID NO: 187, то функциональный вариант содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из Y85A, Y85H, T86D, T87E, M93N, M93A, M93K, M93Q, V129A, V129T, V130A, V130L, V130I, V130T, V131A и V131T.
36. Слитый белок по любому из пп. 1-12, где слитый белок содержит sdAb к VEGFR2

или его функциональный вариант и белок CD или его функциональный вариант.

37. Слитый белок по п. 36, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- (i) SEQ ID NO: 7,
- (ii) аминокислот 1-297 под SEQ ID NO: 7,
- (iii) SEQ ID NO: 9,
- (iv) аминокислот 1-297 под SEQ ID NO: 9,
- (v) SEQ ID NO: 11 и
- (vi) аминокислот 1-297 под SEQ ID NO: 11.

38. Слитый белок по любому из пп. 1-11 или п. 13, где слитый белок содержит sdAb к EGFR или его функциональный вариант и белок CD или его функциональный вариант.

39. Слитый белок по п. 38, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- (i) SEQ ID NO: 13,
- (ii) аминокислот 1-297 под SEQ ID NO: 13,
- (iii) SEQ ID NO: 15,
- (iv) аминокислот 1-297 под SEQ ID NO: 15,
- (v) SEQ ID NO: 17 и
- (vi) SEQ ID NO: 19.

40. Слитый белок по любому из пп. 1-11, где слитый белок содержит sdAb к HER2 или его функциональный вариант и белок CD или его функциональный вариант.

41. Слитый белок по п. 40, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- (i) SEQ ID NO: 72,
- (ii) аминокислот 1-297 под SEQ ID NO: 72,
- (iii) SEQ ID NO: 73,
- (iv) аминокислот 1-291 под SEQ ID NO: 73,
- (v) SEQ ID NO: 74 и
- (vi) аминокислот 1-292 под SEQ ID NO: 74.

42. Слитый белок по любому из пп. 1-11, где слитый белок содержит sdAb к HER3 или его функциональный вариант и белок CD или его функциональный вариант.

43. Слитый белок по п. 42, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- (i) SEQ ID NO: 76 и
- (ii) аминокислот 1-300 под SEQ ID NO: 76.

44. Слитый белок по любому из пп. 1-11, где слитый белок содержит sdAb к CEA или его функциональный вариант и белок CD или его функциональный вариант.

45. Слитый белок по п. 44, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- (i) SEQ ID NO: 78,
- (ii) аминокислот 1-293 под SEQ ID NO: 78,
- (iii) SEQ ID NO: 80 и
- (iv) аминокислот 1-296 под SEQ ID NO: 80.

46. Слитый белок по любому из предыдущих пунктов, где слитый белок содержит по меньшей мере одну деиммунизирующую мутацию в по меньшей мере одном Т-клеточном эпитопе, при этом по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп выбирают из группы, состоящей из эпитопа 1 (SEQ ID NO: 63), эпитопа 2 (SEQ ID NO: 64), эпитопа 3 (SEQ ID NO: 65), эпитопа 4 (SEQ ID NO: 66), эпитопа 5 (SEQ ID NO: 67) и эпитопа 6 (SEQ ID NO: 68).

47. Слитый белок по п. 1, где слитый белок состоит по сути из аминокислотной

последовательности любой из SEQ ID NO: 17, 19, 93-185 или аминокислот 1-297 любой из SEQ ID NO: 93-181.

48. Слитый белок по п. 47, где слитый белок состоит по сути из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 182, 183, 184 и 185.

49. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество по меньшей мере одного слитого белка по любому из предыдущих пунктов и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

50. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту по меньшей мере одного слитого белка по любому из пп. 1-48 или фармацевтической композиции по п. 49.

51. Способ по п. 50, где по меньшей мере один слитый белок или фармацевтическую композицию вводят парентерально.

52. Способ по п. 50 или 51, дополнительно включающий введение субъекту эффективного количества субстрата для цитозиндезаминазы.

53. Способ по п. 52, где субстрат представляет собой пролекарственное средство 5-фторурацила.

54. Способ по п. 53, где пролекарственное средство 5-фторурацила выбирают из группы, состоящей из 5-фторцитозина (5-FC), Тоса FC, аналогов 5-FC и фотоактивируемых соединений, их солей или их сложных эфиров.

55. Способ по п. 54, где пролекарственное средство представляет собой 5-FC.

56. Способ по любому из пп. 50-55, где рак выбирают из группы, состоящей из рака толстого кишечника, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, базально-клеточной карциномы, болезни Боуэна, рака шейки матки, плоскоклеточной неоплазии поверхности глаз, меланомы, почечно-клеточной карциномы, рака легкого, рака мочевого пузыря, рака желчного пузыря, рака гортани, рака печени, рака щитовидной железы, рака слюнных желез, рака предстательной железы, колоректального рака, рака головы и шеи, холангиокарциномы, рака пищевода, рака костей, рака эндометрия, рака яичника, карциномы мягких тканей и карциномы клеток Меркеля.

57. Способ по любому из пп. 50-56, где рак представляет собой солидную опухоль.

58. Способ по п. 57, где солидная опухоль представляет собой рак толстого кишечника, колоректальный рак, рак поджелудочной железы или рак головы и шеи.

59. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый белок по любому из пп. 1-48, при этом молекула нуклеиновой кислоты необязательно содержит кодон-оптимизированную последовательность нуклеиновой кислоты.

60. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 59, где молекула нуклеиновой кислоты состоит по сути из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 195, 196, 197 и 198.

61. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 59 или 60.

62. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 61.

63. Клетка-хозяин по п. 62, где клетка-хозяин представляет собой не принадлежащую млекопитающему клетку.

64. Клетка-хозяин по п. 63, где клетка-хозяин представляет собой дрожжевую клетку или бактериальную клетку.

65. Клетка-хозяин по п. 64, где клетка-хозяин представляет собой клетку E. coli, клетку археобактерий и клетку актинобактерий.

66. Клетка-хозяин по п. 65, где клетка-хозяин представляет собой штамм E. coli, которые обеспечивает цитоплазматическую среду для образования дисульфидных

связей.

67. Клетка-хозяин по п. 66, где штамм E. coli конститутивно экспрессирует хромосомную копию цитозольной изомеразы дисульфидных связей.

68. Клетка-хозяин по п. 67, где цитозольная изомераза дисульфидных связей представляет собой DsbC.

69. Клетка-хозяин по п. 66, где штамм E.coli представляет собой SHuffle® T7, SHuffle® T7 Express, SHuffle® Express, Origami™ или Rosetta-gami™.

70. Способ получения слитого белка, включающий экспрессию нуклеиновой кислоты по п. 59 или 60 в клетке-хозяине.

71. Способ по п. 70, где клетку-хозяина конструируют с целью повышения активности, цитоплазматического продуцирования и/или стабильности слитого белка.

72. Способ по п. 71, где способ приводит к образованию слитого белка, имеющего дисульфидные связи, для которого активность, цитоплазматическое продуцирование и/или стабильность слитого белка повышается в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз или 100 раз по сравнению со слитым белком, продуцируемым не сконструированной версией той же самой клетки-хозяина.