

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201990822** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.01.09

(51) Int. Cl. *C07K 19/00* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.09.27

(54) ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СЛИТЫЕ БЕЛКИ

(31) 62/400,338; 62/484,841

(32) 2016.09.27; 2017.04.12

(33) US

(86) PCT/US2017/053765

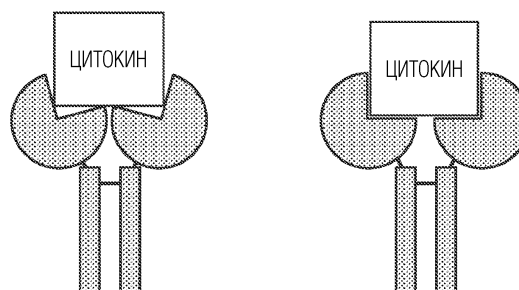
(87) WO 2018/064190 2018.04.05

(71) Заявитель:
ЭПИСЕНТАРИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ларсон Кристофер, Рид Тони,
Оронски Брайан Т. (US)

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

(57) Предлагается слитый белок, например слитый белок цитокинового рецептора, например ловушка TGF β , с новой линкерной последовательностью, позволяющей слитому белку оптимально функционировать, например позволяющей соответствующей цитокиновому рецептору части слитого белка цитокинового рецептора оптимально связываться со своим целевым цитокином. Данные слитые белки или векторы экспрессии, кодирующие данные слитые белки, например онколитические аденовирусные векторы экспрессии, можно использовать для лечения клеточных пролиферативных заболеваний и нарушений, включая некоторые формы рака и воспалительных нарушений.



201990822

A1

A1

201990822

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-555989ЕА/041

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СЛИТЫЕ БЕЛКИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США серийный номер 62/400338, поданной 27 сентября 2016 года, и предварительной патентной заявки США серийный номер 62/484841, поданной 12 апреля 2017 года, каждая из которых настоящим включена в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Областью техники, к которой относится изобретение, является молекулярная биология, в частности иммунология и слитые белки, например слитые белки цитокинового рецептора.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Цитокины представляют собой небольшие секретлируемые клеточные сигнальные белки, которые обладают широким спектром активности, включая регуляцию клеточного роста и дифференцировки и модуляцию иммунной функции. Цитокины, цитокиновые рецепторы и некоторые другие иммуномодулирующие белки используют в качестве терапевтических средств для лечения различных медицинских состояний. Однако введение таких белков, например подкожным или сосудистым путем, может приводить к неправильной клеточной и внеклеточной локализации, тем самым ограничивая терапевтическую активность и/или увеличивая риск токсичности.

[0004] Трансформирующий фактор роста- β (TGF β) представляет собой плеiotропный цитокин с иммунорегуляторными свойствами, такими как ограничение и прекращение воспалительных и аллергических иммунных реакций (Taylor (2009) J. LEUKOC. BIOL. 85(1):29-33). TGF β участвует в воспалительных, злокачественных, инфекционных и аутоиммунных заболеваниях, а также остеопорозе и фиброзе, включая цирроз и системный склероз. В частности, устойчиво высокие уровни TGF β в опухолях связаны с иммунной толерантностью, ангиогенезом, метастазированием и повышенным отложением внеклеточного матрикса в опухоли, которые могут

вызывать прогрессирование рака и устойчивость к терапии.

[0005] Было разработано несколько терапевтических средств для захвата или блокировки TGF β и, следовательно, уменьшения или модуляции активности TGF β . Примеры включают моноклональные антитела, направленные против TGF β , например фрезолимумаб, который вводили в нескольких клинических испытаниях для лечения рака и системного склероза (Connolly *et al.* (2012) INT. J. BIOL. SCI. 8(7): 964-78).

[0006] Альтернативный подход к моноклональным антителам включает применение рекомбинантных Fc-слитых белков, содержащих растворимую часть внеклеточного домена рецептора TGF β II типа (T β RII) или рецептора TGF β III типа (T β RIII или бетагликан) (Connolly *et al.* (2012) выше). Такие молекулы, известные как ловушки TGF β , обычно содержат внеклеточные домены двух цепей димерного рецепторного комплекса TGF β . Экспрессия растворимого слияния T β RII-Fc связана с онколитическим аденовирусом, и показано, что она приводит к значительному снижению роста первичной опухоли и остеолитическому разрушению кости (Hu *et al.* (2010) HUM. GENE THER. 21(11): 1623-9).

[0007] Несмотря на усилия, на сегодняшний день существует потребность в улучшенных слитых белках, например слитых белках цитокинового рецептора, в частности улучшенных слитых белках рецептора TGF β , которые нейтрализуют биологическую активность человеческого TGF β , для лечения у пациентов-людей нарушений, опосредуемых TGF β .

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Изобретение основано, в частности, на открытии линкерных последовательностей, которые улучшают функцию слитых белков, например слитых белков цитокинового рецептора, например слитых белков рецептора TGF β II типа (T β RII), например ловушек TGF β . Линкерные последовательности могут позволять лигандсвязывающей части слитого белка (например, цитокиновому рецептору) оптимально связываться с лигандом (например, цитокином), обеспечивать временную и пространственную

колокализацию двух или более компонентов слитого белка (например, двух субъединиц димерного цитокина), оптимизировать экспрессию с вектора экспрессии (например, вирусного вектора), уменьшать иммуногенность или предоставлять сайт расщепления для обеспечения высвобождения компонента слитого белка. Например, линкерные последовательности могут обеспечивать достаточную гибкость, чтобы позволять лигандсвязывающему домену цитокинового рецептора принимать нативную конформацию в контексте слитого белка, и минимизировать потенциальную иммуногенность слитого белка для применения в качестве терапевтического средства.

[0009] В одном аспекте настоящее изобретение предлагает выделенный слитый белок, который содержит, например, в направлении от N- к C-концу: первую часть внеклеточного домена, трансмембранного домена или внутриклеточного домена цитокина, цитокинового рецептора или иммуномодулирующего белка; аминокислотный линкер; и по меньшей мере одно из второй части внеклеточного домена, трансмембранного домена или внутриклеточного домена цитокина, цитокинового рецептора или иммуномодулирующего белка; шарнирной области иммуноглобулина (Ig); и Fc-домена иммуноглобулина (Ig). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислотных остатков.

[0010] В другом аспекте настоящее изобретение предлагает выделенный слитый белок, который содержит в направлении от N- к C-концу: растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора; аминокислотный линкер; шарнирную область иммуноглобулина (Ig); и Fc-домен иммуноглобулина (Ig); причем линкер содержит от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислотных остатков.

[0011] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных слитых белков аминокислотный линкер может содержать, например, от приблизительно 5 до приблизительно 15, от приблизительно 5 до приблизительно 20, от приблизительно 5 до приблизительно 30, от приблизительно 10 до приблизительно 15, от приблизительно 10 до приблизительно 20, от приблизительно 10 до приблизительно 30, от приблизительно 10 до приблизительно 40, от

приблизительно 15 до приблизительно 20, от приблизительно 15 до приблизительно 30 или от приблизительно 15 до приблизительно 40 аминокислотных остатков.

[0012] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных слитых белков аминокислотная линкерная последовательность происходит от эндогенного человеческого белка, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM, альбумина или казеина. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит С-концевую часть CH1-домена иммуноглобулина, например CH1-домена IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит С-концевую часть CH1-домена IgG1, например аминокислотный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61, например аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1.

[0013] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных слитых белков аминокислотный линкер содержит последовательность, происходящую от цитокина, сигнальной молекулы, иммуномодулирующего белка или пептида или биологически активного пептида.

[0014] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных слитых белков аминокислотный линкер содержит сайт расщепления, например сайт протеолитического расщепления, например сайт протеолитического расщепления, который расщепляется протеазой, присутствующей в эндоплазматическом ретикулуме или аппарате Гольджи эукариотической клетки. В некоторых вариантах осуществления сайт протеолитического расщепления представляет собой сайт расщепления фурином, например сайт расщепления фурином, содержащий последовательность RX_1X_2R (SEQ ID NO: 50), где X_1 представляет собой любую

аминокислоту, и X₂ представляет собой Lys или Arg, например сайт расщепления фурином, содержащий последовательность RAKR (SEQ ID NO: 51). В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных слитых белков аминокислотный линкер протеолитически стабилен в млекопитающем или растении.

[0015] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных слитых белков растворимая часть внеклеточного домена цитокинового рецептора представляет собой растворимую часть внеклеточного домена человеческого рецептора TβRII. Например, в некоторых вариантах осуществления растворимая часть внеклеточного домена цитокинового рецептора содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 12 или аминокислотные остатки 23-159 в соответствии с SEQ ID NO: 12.

[0016] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных слитых белков слитый белок содержит один или несколько из TGF-β, CD80, CD19, CD20, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-12B/p40, IL-23A/p19, IL27A/p28, IL-27B/EBI3, CD154, CD86, CD137, CD137L, IFN-α, IFN-β, BORIS/CTCFL, FGF, ICAM, IL-24, MAGE, NY-ESO-1, ангиостатина, эндостатина, ацетилхолина, интерферона-гамма, DKK1/Wnt, p53, тимидинкиназы, тяжелой цепи или легкой цепи анти-PD-1 антитела и тяжелой цепи или легкой цепи анти-PD-L1 антитела или их функционального фрагмента. Например, в некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать: CD80 и CD137L; IL-23A/p19 и IL-12B/p40; или IL-27A/p28 и IL-27B/EBI3.

[0017] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных слитых белков шарнирную область Ig выбирают из шарнирных областей IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM, а Fc-домен Ig выбирают из Fc-доменов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig и Fc-домен вместе содержат аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21. В

некоторых вариантах осуществления Fc Ig, шарнирная область Ig и CH1-домен Ig происходят от одного иммуноглобулина.

[0018] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных слитых белков слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 22.

[0019] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных слитых белков слитый белок содержит аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности больше 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63.

[0020] В другом аспекте настоящее изобретение предлагает димерный связывающий цитокин белок, содержащий два любых из вышеуказанных слитых белков, ковалентно связанных вместе, причем каждый слитый белок содержит внеклеточный домен цитокинового рецептора, и причем два внеклеточных домена вместе определяют сайт связывания для цитокина.

[0021] В другом аспекте настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует любой из вышеуказанных слитых белков.

[0022] В другом аспекте настоящее изобретение предлагает вектор экспрессии, содержащий любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот. Вектор экспрессии может представлять собой онколитический вирус, например, вирус может селективно реплицироваться в гиперпролиферативной клетке и/или селективно экспрессировать слитый белок в гиперпролиферативной клетке. В

некоторых вариантах осуществления онколитический вирус представляет собой онколитический аденовирус, например онколитический аденовирус 2 типа или 5 типа.

[0023] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных векторов экспрессии нуклеотидная последовательность, кодирующая слитый белок, вставлена в сайт вставки E1b-19K, расположенный между сайтом начала E1b-19K и сайтом начала E1b-55K. В некоторых вариантах осуществления сайт вставки E1b-19K расположен между сайтом начала E1b-19K и сайтом окончания E1b-19K. В некоторых вариантах осуществления сайт вставки E1b-19K содержит делецию приблизительно 200 нуклеотидов, например 203 нуклеотидов, прилегающих к сайту начала E1b-19K. В некоторых вариантах осуществления сайт вставки E1b-19K содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 1714-1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 52), или нуклеотидная последовательность, кодирующая слитый белок, вставлена между нуклеотидами, соответствующими 1714 и 1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая слитый белок, вставлена между CTGACCTC (SEQ ID NO: 53) и TCACCAGG (SEQ ID NO: 54), например аденовирус содержит в направлении от 5' к 3' CTGACCTC (SEQ ID NO: 53), нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок, и TCACCAGG (SEQ ID NO: 54).

[0024] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных векторов экспрессии аденовирус может содержать делецию по меньшей мере одного сайта связывания Rea3 или его функциональной части, например аденовирус может содержать делецию нуклеотидов, соответствующих от приблизительно -300 до приблизительно -250 выше сайта инициации E1a, или делецию нуклеотидов, соответствующих от -305 до -255 выше сайта инициации E1a. В некоторых вариантах осуществления аденовирус может содержать делецию нуклеотидов, соответствующих 195-244 генома Ad5 (SEQ ID NO: 52), и/или рекомбинантный аденовирус может содержать последовательность GGTGTTTTGG (SEQ ID NO: 55). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный онколитический аденовирус может содержать делецию по меньшей мере одного сайта

связывания Реа3 или его функциональной части, и не содержать делецию сайта связывания Е2F. В некоторых вариантах осуществления аденовирус может содержать делецию по меньшей мере одного сайта связывания Е2F или его функциональной части. В некоторых вариантах осуществления аденовирус может содержать делецию по меньшей мере одного сайта связывания Е2F или его функциональной части и не содержать делецию сайта связывания Реа3.

[0025] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных векторов экспрессии аденовирус может содержать делецию Е3. В некоторых вариантах осуществления делеция Е3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 3185, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2500, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3185, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2500, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500, от приблизительно 1500 до приблизительно 3185, от приблизительно 1500 до приблизительно 3000, от приблизительно 1500 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3185, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 2000 до приблизительно 2500, от приблизительно 2500 до приблизительно 3185, от приблизительно 2500 до приблизительно 3000 или от приблизительно 3000 до приблизительно 3185 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления сайт делеции Е3 расположен между сайтом окончания рVIII и сайтом начала Fiber. В некоторых вариантах осуществления сайт делеции Е3 расположен между сайтом окончания Е3-10.5К и сайтом окончания Е3-14.7К. В некоторых вариантах осуществления делеция Е3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 1551, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1551, от приблизительно 1000 до приблизительно

1500 или от приблизительно 1500 до приблизительно 1551 нуклеотида, прилегающего к сайту окончания E3-10.5K. В некоторых вариантах осуществления делеция E3 содержит делецию приблизительно 1050 нуклеотидов, прилегающих к сайту окончания E3-10.5K, например делеция E3 содержит делецию 1064 нуклеотидов, прилегающих к сайту окончания E3-10.5K. В некоторых вариантах осуществления делеция E3 содержит делецию, соответствующую делеции E3 dl309 Ad5. В некоторых вариантах осуществления делеция E3 содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 29773-30836 генома Ad5 (SEQ ID NO: 52).

[0026] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая слитый белок, вставлена в делецию E3, например нуклеотидная последовательность вставлена между CAGTATGA (SEQ ID NO: 56) и TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 57), например аденовирус содержит в направлении от 5' к 3' CAGTATGA (SEQ ID NO: 56), нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок, и TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 57).

[0027] В некоторых вариантах осуществления онколитический аденовирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок, вставленный в сайт вставки E1b-19K, причем сайт вставки расположен между сайтом начала E1b-19K и сайтом начала E1b-55K, и/или модифицированную регуляторную последовательность E1a, в которой удалены по меньшей мере один сайт связывания Рсa3 или его функциональная часть.

[0028] В другом аспекте настоящее изобретение предлагает клетку-хозяина, содержащую любой из вышеуказанных векторов экспрессии. В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ получения слитого белка, содержащий выращивание клетки-хозяина в условиях, приводящих к экспрессии слитого белка, и очистку слитого белка. В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ экспрессии слитого белка в клетке-мишени, содержащий подвергание клетки воздействию эффективного количества любого из вышеуказанных векторов экспрессии. В некоторых вариантах осуществления слитый белок посттрансляционно расщепляется на две полипептидные цепи.

[0029] В другом аспекте любой из вышеуказанных слитых белков или векторов экспрессии можно использовать, например, для снижения активности цитокина у субъекта, чем достигается лечение при различных медицинских показаниях, которые опосредуются цитокином, например $TGF\beta$. В другом аспекте любой из вышеуказанных слитых белков или векторов экспрессии можно использовать для ингибирования пролиферации опухолевых клеток *in vitro* и/или *in vivo*, ингибирования роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта или лечения рака у нуждающегося в этом субъекта. Субъект может представлять собой, например, животное, например млекопитающее, например человека, например ребенка. Например, при введении субъекту-человеку с раком слитые белки или векторы экспрессии ингибируют или уменьшают рост опухоли или снижают опухолевую нагрузку у субъекта.

[0030] В некоторых вариантах осуществления рак может быть выбран из меланомы, плоскоклеточной карциномы кожи, базальноклеточной карциномы, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака анального канала, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого, мезотелиомы, мелкоклеточного рака легкого, почечно-клеточной карциномы, рака предстательной железы, гастроэзофагеального рака, колоректального рака, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака яичника, рака печени, гепатоклеточной карциномы, холангиокарциномы, рака головного мозга и центральной нервной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы (например, карциномы паращитовидной железы), рака эндометрия, нейроэндокринного рака, лимфомы (например, ходжкинской и неходжкинской), лейкоза, карциномы из клеток Меркеля, гастроинтестинальных стромальных опухолей, множественной миеломы, рака матки, саркомы, рака почки, рака глаза, рака поджелудочной железы и герминогенного рака (например, герминогенного рака яичника). В некоторых вариантах осуществления рак может быть выбран из лейкоза, рака молочной железы, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака эндометрия, рака яичника, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака головного мозга, рака кожи, колоректального рака,

рака желудка, рака головы и шеи и лейкоза.

[0031] В некоторых вариантах осуществления слитый белок или вектор экспрессии вводят в комбинации с одной или несколькими терапиями, выбранными из хирургии, лучевой терапии, химиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии и виро-терапии. В некоторых вариантах осуществления слитый белок или вектор экспрессии вводят в комбинации с лимфоцитами, например Т-клетками, например Т-клетками с CAR.

[0032] Любой из вышеуказанных слитых белков или векторов экспрессии можно также использовать для лечения воспалительного состояния или инфекции у нуждающегося в этом субъекта.

[0033] Эти и другие аспекты и преимущества настоящего изобретения проиллюстрированы нижеследующими фигурами, подробным описанием и формулой изобретения.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0034] Настоящее изобретение может быть яснее понято при рассмотрении нижеследующих чертежей.

[0035] На **фигуре 1А** изображена схема димерного цитокинового рецептора на клеточной поверхности (слева), антитела (посередине) и слияния рецептор-Fc, которое оптимально связывает целевой цитокин (справа). На **фигуре 1В** изображено слияние рецептор-Fc, например ловушка цитокина, которая стерически ограничена в отношении оптимального связывания с целевым цитокином (слева), или которая принимает оптимальную конфигурацию связывания (справа).

[0036] На **фигуре 2** изображено выравнивание последовательностей аминокислотных последовательностей CH1-доменов (сверху) и CH2-доменов (снизу) человеческих IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM.

[0037] На **фигуре 3** изображен вестерн-блот для фосфорилированного Smad2 после обработки репортерных клеток TGFβ и/или слитыми белками рецептора TGFβ II типа hTGFβR-IgG-1 и hTGFβR-Fc, как указано. Общий Smad2 и Smad3 использовали в качестве контроля нагрузки. hTGFβR-IgG-1 заметно снижал активность TGFβ по сравнению с hTGFβR-Fc.

[0038] На **фигуре 4** изображен вестерн-блот для фосфорилированного Smad2 после обработки репортерных клеток TGF β и/или слитыми белками рецептора TGF β II типа hTGF β R-IgG1-1 (1), hTGF β R-IgG1-2 (2), hTGF β R-IgG1-3 (3) и hTGF β R-IgG1-4 (4), как указано. В качестве контроля нагрузки использовали β -актин.

[0039] На **фигурах 5А-5С** изображены объемы опухолей у мышей после обработки указанным вирусом. Каждая линия представляет объем опухоли у одной мыши.

[0040] На **фигурах 6А-6В** изображены вестерн-блоты для фосфорилированного Smad2 после обработки указанных клеточных линий TGF β и/или указанным вирусом. Общий Smad2 и Smad3 использовали в качестве контроля нагрузки.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0041] Настоящее изобретение предлагает выделенный слитый белок для применения в лечении различных медицинских состояний, например в ингибировании пролиферации опухолевых клеток, ингибировании роста опухоли, лечении рака, лечении воспалительного состояния или лечении инфекции, у субъекта. Типичные слитые белки содержат: первую часть внеклеточного домена, трансмембранного домена или внутриклеточного домена цитокина, цитокинового рецептора или иммуномодулирующего белка; аминокислотный линкер; и по меньшей мере одно из второй части внеклеточного домена, трансмембранного домена или внутриклеточного домена цитокина, цитокинового рецептора или иммуномодулирующего белка; шарнирной области иммуноглобулина (Ig); и Fc-домена иммуноглобулина (Ig). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислотных остатков. Типичные слитые белки настоящего изобретения включают ловушки цитокинов.

[0042] Ловушка цитокина, например ловушка TGF β , представляет собой молекулу, содержащую растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора, например рецептора TGF β , например рецептора TGF β II типа (T β RII), сконструированную для связывания или иного блокирования целевого цитокина. В ловушке цитокина внеклеточный домен цитокинового рецептора может быть слит с

шарнирной областью иммуноглобулина (Ig) и Fc-доменом иммуноглобулина (Ig), что может обеспечивать, например, увеличение стабильности, Fc-эффекторные функции и/или мультимеризацию, например димеризацию. Димеризация, обеспечиваемая слиянием с шарнирной областью Ig и Fc-доменом Ig, особенно выгодна для цитокиновых рецепторов, которые существуют в виде димерных рецепторных комплексов на клеточной поверхности, как, например, T β RII.

[0043] Обычные ловушки цитокинов, например ловушки TGF β , содержат две полипептидные цепи, причем каждая полипептидная цепь содержит растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора, слитую с шарнирной областью Ig и Fc-доменом Ig. Растворимая часть внеклеточного домена цитокинового рецептора обычно слита непосредственно с шарнирной областью Ig без какой-либо промежуточной последовательности. Эти две полипептидные цепи ковалентно связаны дисульфидными связями между остатками цистеина в каждой из трех шарнирных областей Ig. Каждая полипептидная цепь предоставляет растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора, например T β RII, и две растворимые части внеклеточного домена цитокинового рецептора вместе определяют сайт связывания для цитокина. Схематическое представление димерного цитокинового рецептора, молекулы иммуноглобулина (антитела) и димерного белка, содержащего два ковалентно связанных слитого белка, причем каждый содержит растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора, слитую с шарнирной областью Ig и Fc-доменом Ig, изображено на **фигуре 1A**.

[0044] Настоящее изобретение основано, в частности, на открытии, что обычные ловушки цитокинов, содержащие слитый белок растворимой части внеклеточного домена цитокинового рецептора с шарнирной областью Ig и Fc-доменом Ig, например ловушки TGF β , не оптимально связывают свой целевой цитокин. Например, обычная ловушка TGF β не обеспечивает достаточной гибкости между двумя лигандсвязывающими доменами T β RII для того, чтобы эти два лигандсвязывающих домена T β RII могли вместе принимать оптимальную

конфигурацию для определения сайта связывания TGF β .

[0045] Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение предлагает выделенный слитый белок, который содержит в направлении от N- к С-концу: растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора; аминокислотный линкер; шарнирную область иммуноглобулина (Ig); и Fc-домен иммуноглобулина (Ig); причем линкер содержит от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислотных остатков. Линкерная последовательность позволяет, например, связывающему домену во внеклеточном домене цитокинового рецептора оптимально связываться со своим целевым цитокином. Это особенно важно, когда связывающий цитокин белок представляет собой димер, который содержит два из вышеуказанных слитых белков, которые вместе определяют сайт связывания для связывания целевого цитокина. Без линкера два связывающих домена могут быть стерически ограничены в отношении формирования оптимального сайта связывания (**фигура 1B**). Различные признаки и аспекты настоящего изобретения более подробно рассмотрены ниже.

I. Слитые белки

[0046] Типичные слитые белки могут содержать: первую часть внеклеточного домена, трансмембранного домена или внутриклеточного домена цитокина, цитокинового рецептора или иммуномодулирующего белка; аминокислотный линкер; и по меньшей мере одно из второй части внеклеточного домена, трансмембранного домена или внутриклеточного домена цитокина, цитокинового рецептора или иммуномодулирующего белка; шарнирной области иммуноглобулина (Ig); и Fc-домена иммуноглобулина (Ig). Предполагается, что первая часть внеклеточного домена, трансмембранного домена или внутриклеточного домена цитокина, цитокинового рецептора или иммуномодулирующего белка может быть такой же как вторая часть внеклеточного домена, трансмембранного домена или внутриклеточного домена цитокина, цитокинового рецептора или иммуномодулирующего белка или отличаться от нее.

[0047] Например, раскрытый слитый белок может содержать в направлении от N- к С-концу: растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора; аминокислотный линкер; шарнирную

область иммуноглобулина (Ig); и Fc-домен иммуноглобулина (Ig); причем линкер содержит от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислотных остатков.

[0048] Типичные цитокины включают IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-4, IL-9, IL-13, IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, G-CSF, LIF, OSM, IL-10, IL-20, IL-14, IL-16, IL-17, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , CD154, LT- β , TNF- β , 4-1BBL APRIL, CD153, CD178, LIGHT, TALL-1, TRAIL, TWEAK, TRANCE, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, Epo, Tpo, Flt-3L, SCF, M-CSF и MSP.

[0049] Как используется в настоящем документе, "иммуномодулирующий" белок обозначает белок, который модулирует функцию иммунной системы субъекта. Иммуномодулирующие белки могут, например, модулировать функцию, например, В-клеток, Т-клеток и/или производство антител. Типичные иммуномодулирующие белки включают ингибиторы контрольных точек. Типичные иммуномодулирующие белки могут включать, например, PD-1 или PD-L1 или любой белок, который модулирует их активность. Другие типичные иммуномодулирующие белки могут включать анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело.

[0050] Как используется в настоящем документе, "растворимая часть внеклеточного домена цитокинового рецептора" относится к любому внеклеточному домену цитокинового рецептора или фрагменту внеклеточного домена цитокинового рецептора, который способен к связыванию с целевым цитокином. Следует понимать, что растворимая часть внеклеточного домена цитокинового рецептора также включает части внеклеточного домена, которые содержат связывающий домен, который или сам по себе, или в комбинации со вторым связывающим доменом (например, в случае димерных слитых белков) способен к связыванию с целевым цитокином.

[0051] Типичные цитокиновые рецепторы включают цитокиновые рецепторы I типа (например, рецепторы GM-CSF, рецепторы G-CSF, рецепторы IL I типа, рецепторы Epo, рецепторы LIF, рецепторы CNTF или рецепторы TPO), цитокиновые рецепторы II типа (например, рецепторы IFN-альфа (например, IFNAR1 или IFNAR2), рецепторы IFN-бета, рецепторы IFN-гамма (например, IFNGR1 или

IFNGR2), хемокиновые рецепторы (например, рецепторы хемокинов CC, рецепторы хемокинов CXС, рецепторы хемокинов CX3С или рецепторы хемокинов XC), рецепторы суперсемейства фактора некроза опухоли (TNFR; например, TNFRSF5/CD40, TNFRSF8/CD30, TNFRSF7/CD27, TNFRSF1A/TNFR1/CD120a или TNFRSF1B/TNFR2/CD120b), рецепторы суперсемейства TGF β (например, рецептор TGF β I типа или рецептор TGF β II типа) или рецепторы суперсемейства иммуноглобулинов (Ig) (например, рецепторы интерлейкина-1, CSF-1R, PDGFR (например, PDGFRA или PDGFRB) или SCFR). Предпочтительные цитокиновые рецепторы включают димерные цитокиновые рецепторы, например рецепторы суперсемейства TGF β , например человеческий рецептор TGF β II типа (T β RII). В некоторых вариантах осуществления растворимая часть внеклеточного домена цитокинового рецептора представляет собой растворимую часть внеклеточного домена человеческого рецептора TGF β II типа (T β RII), например, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 12, или аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности больше 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 12, и/или ее фрагмент, который содержит связывающий домен, который связывается с TGF β .

[0052] Растворимая часть внеклеточного домена цитокинового рецептора сохраняет его способность связывать свой нативный лиганд. В некоторых вариантах осуществления растворимая часть внеклеточного домена сохраняет по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% активности связывания своего нативного лиганда по сравнению с полноразмерным цитокиновым рецептором.

[0053] В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать, например, один или несколько из T β RII, TGF- β , CD80, CD19, CD20, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-12B/p40, IL-23A/p19, IL-27A/p28, IL-27B/EBI3, CD154, CD86, CD137, CD137L, IFN- α , IFN- β , BORIS/CTCFL, FGF, ICAM, IL-24, MAGE, NY-ESO-1, ангиостатина, эндостатина, ацетилхолина, интерферона-гамма, DKK1/Wnt, p53, тимидинкиназы, тяжелой цепи

или легкой цепи анти-PD-1 антитела и тяжелой цепи или легкой цепи анти-PD-L1 антитела или их функционального фрагмента. Например, слитый белок может содержать: CD80 и CD137L; IL-23A/p19 и IL-12B/p40; или IL-27A/p28 и IL-27B/EBI3.

[0054] Как используется в настоящем документе, термин "шарнирная область иммуноглобулина (Ig)" относится к аминокислотной последовательности, которая обычно соединяет домены CH1 и CH2 константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Шарнирная область Ig может включать в себя, например, один или несколько остатков цистеина, способных формировать дисульфидные связи с остатками цистеина в другой белковой цепи. Как используется в настоящем документе, термин "Fc-домен иммуноглобулина (Ig)" относится к фрагменту константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, который способен к связыванию с Fc-рецептором. Fc-домен Ig может включать, например, домен CH2 и CH3 иммуноглобулина (Ig). Границы между доменами CH1, CH2 и CH3 Ig хорошо известны в данной области техники и могут быть найдены, например, в базе данных PROSITE (доступна во всемирной паутине по адресу prosite.expasy.org). Для ясности выравнивания аминокислотных последовательностей доменов CH1 и CH2 человеческих IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM приведены на **фигуре 2**.

[0055] В некоторых вариантах осуществления шарнирную область Ig выбирают из шарнирных областей IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM, и Fc-домен Ig выбирают из Fc-доменов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig и Fc-домен вместе содержат аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig и Fc-домен вместе содержат аминокислотную последовательность с идентичностью больше 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21.

[0056] Аминокислотный линкер может позволять лигандсвязывающей части слитого белка (например, цитокиновому рецептору) оптимально связываться с лигандом (например, цитокином), обеспечивать временную и пространственную колокализацию двух или более компонентов слитого белка (например, двух субъединиц димерного цитокина), оптимизировать экспрессию с вектора экспрессии (например, вирусного вектора), уменьшать иммуногенность или предоставлять сайт расщепления для обеспечения высвобождения компонента слитого белка.

[0057] Аминокислотный линкер может содержать, например, от приблизительно 5 до приблизительно 15, от приблизительно 5 до приблизительно 20, от приблизительно 5 до приблизительно 25, от приблизительно 5 до приблизительно 30, от приблизительно 5 до приблизительно 35, от приблизительно 5 до приблизительно 40, от приблизительно 10 до приблизительно 15, от приблизительно 10 до приблизительно 20, от приблизительно 10 до приблизительно 25, от приблизительно 10 до приблизительно 30, от приблизительно 10 до приблизительно 35, от приблизительно 10 до приблизительно 40, от приблизительно 15 до приблизительно 20, от приблизительно 15 до приблизительно 25, от приблизительно 15 до приблизительно 30, от приблизительно 15 до приблизительно 35, или от приблизительно 15 до приблизительно 40 аминокислотных остатков. Аминокислоты в линкере могут быть природными аминокислотами или модифицированными аминокислотами.

[0058] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная линкерная последовательность происходит от эндогенного человеческого белка, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM, альбумина или казеина. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит С-концевую часть, например от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислот, CH1-домена иммуноглобулина, например CH1-домена IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9. SEQ ID NO: 10,

SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит последовательность с идентичностью последовательности больше 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61.

[0059] Белок или полипептид "происходит от" эталонного белка или полипептида, если он содержит аминокислотную последовательность, которая по существу сходна со всей или с соответствующей частью аминокислотной последовательности дикого типа эталонного белка или полипептида. В некоторых вариантах осуществления белок или полипептид, который происходит от белка или полипептида дикого типа, может иметь одну или несколько аминокислотных замен относительно белка или полипептида дикого типа. Например, предполагается, что белок или полипептид, который происходит от белка или полипептида дикого типа, может иметь идентичность последовательности больше 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с белком или полипептидом дикого типа. Кроме того, предполагается, что белок или полипептид, который происходит от белка или полипептида дикого типа, может содержать больше консервативных замен относительно белка или полипептида дикого типа. Как используется в настоящем документе, термин "консервативная замена" относится к замене на структурно сходную аминокислоту. Например, консервативные замены могут включать замены в следующих группах: Ser и Cys; Leu, Ile, и Val; Glu и Asp; Lys и Arg; Phe, Tyr и Trp; и Gln, Asn, Glu, Asp и His. Консервативные замены можно также определять с помощью алгоритма BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), матрицы замен BLOSUM (например, матрицы BLOSUM 62) или матрицы замен PAM (например, матрицы PAM 250).

[0060] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная линкерная последовательность происходит от цитокина, сигнальной молекулы, иммуномодулирующего белка или пептида или биологически активного пептида.

[0061] Также предполагается, что линкерные последовательности включают богатые глицином и серином линкеры, например $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO: 49). Дополнительные типичные линкерные последовательности раскрыты, например, в документе George et al. (2003) PROTEIN ENGINEERING 15:871-879 и патентах США №№ 5482858 и 5525491.

[0062] В некоторых вариантах осуществления аминокислотный линкер может содержать сайт расщепления, например сайт протеолитического или непротеолитического расщепления. В некоторых вариантах осуществления сайт протеолитического расщепления расщепляется протеазой, присутствующей в конкретной ткани, органелле или внутриклеточном компартменте. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит сайт протеолитического расщепления и два остатка цистеина, что приводит к дисульфидной связи после протеолитического расщепления. В некоторых вариантах осуществления сайт протеолитического расщепления расщепляется протеазой, выбранной из матриксной металлопротеиназы (ММР), фурина, PC1, PC2, PC3, катепсина В, протеиназы 3 и каспазы 3. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления представляет собой сайт протеолитического расщепления, который расщепляется протеазой, которая присутствует в эндоплазматическом ретикулуме или аппарате Гольджи эукариотической клетки. В некоторых вариантах осуществления сайт протеолитического расщепления представляет собой сайт расщепления фурином. Фурин является протеазой, которая экспрессируется повсеместно и локализуется в аппарате Гольджи, где она распознает консенсусную последовательность RX_1X_2R (SEQ ID NO: 50), где X_1 представляет собой любую аминокислоту, и X_2 представляет собой Lys или Arg, и расщепляет после конечного Arg. Фурин играет биологическую роль в расщеплении пропептидов белков, которые проходят через аппарат Гольджи. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления сайт протеолитического расщепления представляет собой сайт расщепления фурином, содержащий последовательность RX_1X_2R (SEQ ID NO: 50), где X_1 представляет собой любую аминокислоту, и X_2 представляет собой Lys или Arg, например, сайт расщепления фурином, содержащий последовательность RAKR (SEQ ID NO: 51).

[0063] В некоторых вариантах осуществления Fc Ig, шарнирная область Ig и CH1-домен Ig происходят от одного иммуноглобулина.

[0064] В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления раскрытый слитый белок содержит аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности больше 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63.

[0065] Идентичность последовательностей может быть определена различными способами, которые известны специалисту в данной области техники, например с помощью общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Анализ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) с помощью алгоритма, используемого программами blastp, blastn, blastx, tblastn и tblastx (Karlin et al., (1990) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 87:2264-2268; Altschul, (1993) J. MOL. EVOL. 36, 290-300; Altschul et al., (1997) NUCLEIC ACIDS RES. 25:3389-3402, включены посредством ссылки), адаптирован для поиска сходства последовательностей. Для обсуждения основных вопросов поиска в базах данных последовательностей смотри документ Altschul et al., (1994) NATURE GENETICS 6:119-129, который полностью включен посредством ссылки. Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Параметры поиска для гистограммы, описания, выравнивания, ожидание (т.е. порог статистической значимости для отчетов о совпадениях с последовательностями базы данных), порог, матрица и фильтр установлены по умолчанию. Матрицей

оценки по умолчанию, используемой blastp, blastx, tblastn и tblastx, является матрица BLOSUM62 (Henikoff et al., (1992) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 89:10915-10919, полностью включен посредством ссылки). Четыре параметра blastn могут быть скорректированы следующим образом: Q=10 (штраф создание за пропуска); R=10 (штраф за продление пропуска); wink=1 (генерирует совпадения слов в каждой позиции wink.sup.th вдоль запроса); и gapw=16 (устанавливает ширину окна, в пределах которой генерируются выравнивания с пропусками). Эквивалентными настройками параметров Blastp могут быть Q=9; R=2; wink=1; и gapw=32. Поиск также может проводиться с использованием параметра дополнительных настроек NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (например: -G, стоимость открытия пропуска [Integer]: по умолчанию=5 для нуклеотидов/11 для белков; -E, стоимость продления пропуска [Integer]: по умолчанию=2 для нуклеотидов/1 для белков; -q, штраф за несоответствие нуклеотидов [Integer]: по умолчанию=-3; -r, награда за совпадение нуклеотидов [Integer]: по умолчанию=1; -e, ожидаемое значение [Real]: по умолчанию=10; -W, размер слова [Integer]: по умолчанию=11 для нуклеотидов/28 для megablast/3 для белков; -y, спад (X) для расширений blast в битах: по умолчанию=20 для blastn/7 для других; -X, величина спада X для выравнивания с пропусками (в битах): по умолчанию=15 для всех программ, неприменимо к blastn; и -Z, конечная величина спада X для выравнивания с пропусками (в битах): 50 для blastn, 25 для других). Можно также использовать ClustalW для парных белковых выравниваний (параметры по умолчанию могут включать, например, матрицу Blosum62 и штраф за открытие пропуска=10 и штраф за продление пропуска=0,1). Сравнение Bestfit между последовательностями, доступное в пакете GCG версии 10.0, использует параметры ДНК GAP=50 (штраф за создание пропуска) и LEN=3 (штраф за продление пропуска), а эквивалентными настройками в сравнениях белков являются GAP=8 и LEN=2.

[0066] В одном аспекте настоящее изобретение предлагает связывающий цитокин белок, содержащий два слитого белка, причем каждый слитый белок содержит в направлении от N- к C-концу:

растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора; аминокислотный линкер; шарнирную область иммуноглобулина (Ig); и Fc-домен иммуноглобулина (Ig); причем линкер содержит от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислотных остатков, причем два слитого белка ковалентно связаны вместе, и причем два внеклеточных домена вместе определяют сайт связывания для цитокина.

[0067] Связывающий цитокин белок может содержать два из вышеуказанных слитых белков, ковалентно связанных вместе, причем каждый слитый белок содержит внеклеточный домен цитокинового рецептора, и причем два внеклеточных домена вместе определяют сайт связывания для цитокина. Слитые белки могут быть ковалентно связаны, например посредством дисульфидных связей между остатками цистеина в шарнирной области Ig каждого слитого белка. В некоторых вариантах осуществления слитые белки, или мономерные, или мультимерные (например, димерные), сохраняют по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% активности связывания целевого лиганда по сравнению с нативным полноразмерным цитокиновым рецептором.

[0068] В некоторых вариантах осуществления связывающий цитокин белок настоящего изобретения связывает цитокин с K_D 200 нМ, 100 нМ, 20 нМ, 15 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 50 пМ, 25 пМ или ниже. В некоторых вариантах осуществления связывающий цитокин белок настоящего изобретения связывает цитокин с K_D от 200 нМ до 100 нМ, от 200 нМ до 20 нМ, от 200 нМ до 10 нМ, от 200 нМ до 5 нМ, от 200 нМ до 1 нМ, от 200 нМ до 50 пМ, от 200 нМ до 25 пМ, от 100 нМ до 20 нМ, от 100 нМ до 10 нМ, от 100 нМ до 5 нМ, от 100 нМ до 1 нМ, от 100 нМ до 50 пМ, от 100 нМ до 25 пМ, от 20 нМ до 10 нМ, от 20 нМ до 5 нМ, от 20 нМ до 1 нМ, от 20 нМ до 50 пМ, от 20 нМ до 25 пМ, от 10 нМ до 5 нМ, от 10 нМ до 1 нМ, от 10 нМ до 50 пМ, от 10 нМ до 25 пМ, от 5 нМ до 1 нМ, от 5 нМ до 50 пМ, от 5 нМ до 25 пМ, от 1 нМ до 50 пМ, от 1 нМ до 25 пМ или от 50 пМ до 25 пМ. В некоторых вариантах осуществления связывающий цитокин белок настоящего изобретения связывает TGF β с K_D 200 нМ, 100 нМ, 20 нМ, 15 нМ, 10

нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 50 пМ, 25 пМ или ниже. В некоторых вариантах осуществления связывающий цитокин белок настоящего изобретения связывает $TGF\beta$ с K_D от 200 нМ до 100 нМ, от 200 нМ до 20 нМ, от 200 нМ до 10 нМ, от 200 нМ до 5 нМ, от 200 нМ до 1 нМ, от 200 нМ до 50 пМ, от 200 нМ до 25 пМ, от 100 нМ до 20 нМ, от 100 нМ до 10 нМ, от 100 нМ до 5 нМ, от 100 нМ до 1 нМ, от 100 нМ до 50 пМ, от 100 нМ до 25 пМ, 20 нМ до 10 нМ, от 20 нМ до 5 нМ, от 20 нМ до 1 нМ, от 20 нМ до 50 пМ, от 20 нМ до 25 пМ, от 10 нМ до 5 нМ, от 10 нМ до 1 нМ, от 10 нМ до 50 пМ, от 10 нМ до 25 пМ, от 5 нМ до 1 нМ, от 5 нМ до 50 пМ, от 5 нМ до 25 пМ, от 1 нМ до 50 пМ, от 1 нМ до 25 пМ или от 50 пМ до 25 пМ. Значения K_D могут быть определены с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, включая способы поверхностного плазмонного резонанса или биослойной интерферометрии.

[0069] Типичные слитые белки настоящего изобретения включают белки, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63. Для ясности последовательности отдельных элементов этих белков и белков, от которых происходят последовательности отдельных элементов, включая растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора, аминокислотный линкер, шарнирную область Ig и Fc-домен Ig, приведены в **ТАБЛИЦЕ 1**.

ТАБЛИЦА 1

Белок	Источник рецептора SEQ ID рецептора	Источник линкера SEQ ID линкера	Источник шарнира Ig/Fc Ig SEQ ID шарнира Ig/Fc Ig
SEQ ID NO: 22	TGF β IIR SEQ ID NO: 12	CH1-домен IgG1 SEQ ID NO: 1	IgG1 SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 62	TGF β IIR SEQ ID NO: 12	CH1-домен IgG1 SEQ ID NO: 60	IgG1 SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 63	TGF β IIR SEQ ID NO: 12	CH1-домен IgG1 SEQ ID NO: 61	IgG1 SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO:	TGF β IIR	CH1-домен IgG2	IgG2

23	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO:	TGFβIIR	CH1-домен IgG3	IgG3
24	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 15
SEQ ID NO:	TGFβIIR	CH1-домен IgG4	IgG4
25	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 16
SEQ ID NO:	TGFβIIR	CH1-домен IgA1	IgA1
26	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 17
SEQ ID NO:	TGFβIIR	CH1-домен IgA2	IgA2
27	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO:	TGFβIIR	CH1-домен IgD	IgD
28	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO:	TGFβIIR	CH1-домен IgE	IgE
29	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 20
SEQ ID NO:	TGFβIIR	CH1-домен IgM	IgM
30	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 21
SEQ ID NO:	TGFβIIR	Альбумин	IgG1
31	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO:	TGFβIIR	Казеин	IgG1
32	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO:	mTGFβIIR	CH1-домен mIgG1	mIgG1
33	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36

ТАБЛИЦА 2

Последовательность белка	Последовательность нуклеиновой кислоты
SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 37
SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 39
SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 40
SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 41
SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 42
SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 43
SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 44
SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 45
SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 46
SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 47

II. Получение слитого белка

[0070] В данной области техники известны способы получения слитых белков настоящего изобретения. Например, молекулы ДНК,

кодирующие раскрытый слитый белок, могут быть химически синтезированы с использованием информации о последовательности, представленной в настоящем документе. Молекулы синтетической ДНК можно лигировать с другими подходящими нуклеотидными последовательностями, включая, например, последовательности контроля экспрессии, для получения обычных конструкций экспрессии генов, кодирующих желаемый слитый белок. Получение определенных генных конструкций находится в пределах обычной квалификации в данной области техники. Типичные последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 37-47, которые кодируют слитые белки в соответствии с SEQ ID NO: 22-32, можно найти в **ТАБЛИЦЕ 2**.

[0071] Нуклеиновые кислоты, кодирующие желаемые слитые белки, могут быть включены (лигированы) в векторы экспрессии, которые могут быть введены в клетки-хозяева с помощью обычных методов трансфекции или трансформации. Типичными клетками-хозяевами являются клетки *E. coli*, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, клетки почки детеныша хомячка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоклеточной карциномы человека (например, Hep G2) и клетки миеломы. Трансформированные клетки-хозяева можно выращивать в условиях, которые позволяют клеткам-хозяевам экспрессировать гены, которые кодируют желаемый слитый белок.

[0072] Конкретные условия экспрессии и очистки будут варьироваться в зависимости от используемой системы экспрессии. Например, если ген должны быть экспрессирован в *E. coli*, его сначала клонируют в вектор экспрессии путем расположения сконструированного гена ниже подходящего бактериального промотора, например Trp или Tac, и прокариотической сигнальной последовательности. Экспрессированный секретлируемый белок накапливается в преломляющих тельцах или тельцах-включениях может быть собран после разрушения клеток с помощью френч-пресса или обработки ультразвуком. Затем преломляющие тельца солюбилизируют, и белки повторно сворачивают и расщепляют с помощью способов, известных в данной области техники.

[0073] Если сконструированный ген должен экспрессироваться

в эукариотических клетках-хозяевах, например клетках CHO, его сначала встраивают в вектор экспрессии, содержащий подходящий эукариотический промотор, сигнал секреции, поли-А-последовательность и стоп-кодон, который, необязательно, может содержать энхансеры и различные интроны. Генная конструкция может быть введена в эукариотические клетки-хозяева с использованием обычных методов.

[0074] Полипептид, содержащий раскрытый слитый белок, может быть получен путем выращивания (культивирования) клетки-хозяина, трансфицированной вектором экспрессии, кодирующим такой белок, в условиях, которые допускают экспрессию данного полипептида. После экспрессии полипептид может быть собран и очищен или выделен с использованием методов, известных в данной области техники, например аффинных меток, таких как белок А, белок G, глутатион-S-трансфераза (GST) и гистидиновые метки.

III. Вирусные векторы

[0075] В некоторых вариантах осуществления раскрытый вектор экспрессии представляет собой вирусный вектор. Термины "вирусный вектор" и "вирус" используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения любого из облигатных внутриклеточных паразитов, не имеющих механизма синтеза белка или генерирования энергии. Вирусный геном может быть из РНК или ДНК. Вирусы, применимые в реализации настоящего изобретения на практике, включают рекомбинантно модифицированные ДНК и РНК-вирусы с оболочкой или без оболочки, предпочтительно выбранные из baculoviridae, parvoviridae, picornoviridae, herpesviridae, poxyiridae или adenoviridae. Вирусы могут быть модифицированы методами рекомбинантной ДНК для включения экспрессии экзогенных трансгенов и могут быть сконструированы так, чтобы они были дефектными по репликации, условно реплицирующимися или компетентными по репликации. При осуществлении настоящего изобретения на практике также могут быть полезны химерные вирусные векторы, которые используют выгодные элементы каждого из свойств родительского вектора (смотри, например, Feng et al. (1997) NATURE BIOTECHNOLOGY 15:866-870). Хотя обычно предпочтительнее использовать вирус

подлежащих лечению видов, в некоторых случаях может быть выгодно использовать векторы, происходящие из других видов, которые обладают благоприятными патогенными свойствами. Например, векторы вируса герпеса лошади для генной терапии человека описаны в публикации РСТ № WO 98/27216. Данные векторы описаны как полезные для лечения людей, так как вирус лошадей не является патогенным для человека. Аналогично, аденовирусные векторы овец могут быть использованы в генной терапии человека, так как утверждается, что они избегают антител против аденовирусных векторов человека. Такие векторы описаны в публикации РСТ № WO 97/06826.

[0076] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой онколитический вирус, например вирус, который проявляет селективную для опухоли репликацию и/или опосредуемый вирусом лизис. В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус допускает селективную экспрессию раскрытого слитого белка, например вирус допускает экспрессию слитого белка в неопластических клетках, но ослабляет экспрессию в нормальных клетках. В некоторых вариантах осуществления экспрессия слитого белка в не гиперпролиферативной клетке составляет приблизительно 90%, приблизительно 80%, приблизительно 70%, приблизительно 60%, приблизительно 50%, приблизительно 40%, приблизительно 30%, приблизительно 20%, приблизительно 10% или приблизительно 5% от экспрессии в гиперпролиферативной клетке. В некоторых вариантах осуществления вирус не проявляет детектируемой экспрессии слитого белка в не гиперпролиферативной клетке. Экспрессия слитого белка может быть определена с помощью любого подходящего способа, известного в данной области техники, например вестерн-блота или ELISA. Гиперпролиферативная клетка может представлять собой раковую клетку, например клетку карциномы, саркомы, лейкоза, лимфомы, рака предстательной железы, рака легкого, рака желудочно-кишечного тракта, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака желудка, рака щитовидной железы, мезотелиомы, рака печени, рака почки, рака кожи, рака головы и шеи или рака головного мозга.

[0077] Предпочтительно, вирусный вектор представляет собой аденовирус. Аденовирусы представляют собой икосаэдрические вирусы среднего размера (90-100 нм) без оболочки (голые), состоящие из нуклеокапсида и двухцепочечного линейного ДНК-гена. Аденовирусы реплицируются в ядре клеток млекопитающих с использованием механизма репликации хозяина. Термин "аденовирус" относится к любому вирусу рода *Adenoviridae*, включая, но без ограничения, человеческие, бычьи, овечьи, лошадиные, собачьи, свиные, мышинные и обезьяньи подроды аденовирусов. В частности, аденовирусы человека включает подроды A-F, а также его отдельные серотипы, причем данные отдельные серотипы и подроды A-F включают, но без ограничения, человеческий аденовирус типов 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 (Ad11a и Ad11p), 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 19a, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 34a, 35, 35p, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 и 91. Предпочтительными являются векторы, происходящие от человеческого аденовируса 2 и 5 типов. Если не указано иное, все номера нуклеотидов аденовируса типа 5 даны относительно эталонной последовательности NCBI AC_000008.1, которая приведена в настоящем документе как SEQ ID NO: 52.

[0078] Цикл репликации аденовируса имеет две фазы: раннюю фазу, во время которой экспрессируются 4 единицы транскрипции (E1, E2, E3, и E4), и позднюю фазу, которая происходит после начала синтеза вирусной ДНК, и во время которой поздние транскрипты экспрессируются главным образом с главного позднего промотора (MLP). Поздние транскрипты кодируют большинство структурных белков вируса. Генные продукты E1, E2 и E4 отвечают за активацию транскрипции, трансформацию клеток, репликацию вирусной ДНК, а также за другие вирусные функции, и необходимы для вирусного роста.

[0079] Термин "функционально связанный" относится к связи полинуклеотидных элементов, состоящих в функциональной связи. Последовательность нуклеиновой кислоты является "функционально связанной", если она находится в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер функционально связан с геном, если он влияет на

транскрипцию гена. Функционально связанные нуклеотидные последовательности обычно являются соседними. Однако поскольку энхансеры обычно функционируют будучи отделены от промотора на несколько тысяч пар оснований, и интронные последовательности могут иметь переменную длину, некоторые полинуклеотидные элементы могут быть функционально связаны, но непосредственно не соприкасаться, и могут даже функционировать в транс-положении из другого аллеля или хромосомы.

[0080] В некоторых вариантах осуществления вирус имеет одну или несколько модификаций регуляторной последовательности или промотора. Модификация регуляторной последовательности или промотора содержит делецию, замену или добавление одного или нескольких нуклеотидов по сравнению с последовательностью дикого типа регуляторной последовательности или промотора.

[0081] В некоторых вариантах осуществления модификация регуляторной последовательности или промотора содержит модификацию последовательности сайта связывания фактора транскрипции, снижающую аффинность к фактору транскрипции, например путем удаления его части или путем вставки точечной мутации в сайт связывания. В некоторых вариантах осуществления дополнительная модифицированная регуляторная последовательность усиливает экспрессию в неопластических клетках, но ослабляет экспрессию в нормальных клетках.

[0082] В некоторых вариантах осуществления модифицированная регуляторная последовательность функционально связана с последовательностью, кодирующей белок. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из аденовирусных генов E1a и E1b (кодирующие области) функционально связан с модифицированной регуляторной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления ген E1a функционально связан с модифицированной регуляторной последовательностью.

[0083] Регуляторная последовательность E1a содержит пять сайтов связывания для фактора транскрипции Rea3, обозначаемых Rea3 I, Rea3 II, Rea3 III, Rea3 IV и Rea3 V, причем Rea3 I является наиболее проксимальным сайтом связывания Rea3 к сайту начала E1a, а Rea3 V является наиболее дистальным. Регуляторная

последовательность E1a также содержит сайты связывания для фактора транскрипции E2F, обозначаемые здесь E2F I и E2F II, причем E2F I является наиболее проксимальным сайтом связывания E2F к сайту начала E1a, а E2F II является наиболее дистальным. Относительно сайта начала E1a сайты связывания расположены следующим образом: Rea3 I, E2F I, Rea3 II, E2F II, Rea3 III, Rea3 IV и Rea3 V.

[0084] В некоторых вариантах осуществления удален по меньшей мере один из этих семи сайтов связывания или его функциональная часть. "Функциональная часть" представляет собой часть сайта связывания, удаление которой уменьшает или даже уничтожает функциональность, например аффинность связывания сайта связывания с соответствующим фактором транскрипции (Rea3 или E2F), например по меньшей мере на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% относительно полной последовательности. В некоторых вариантах осуществления удалены один или несколько полных сайтов связывания. В некоторых вариантах осуществления удалена функциональная часть одного или нескольких сайтов связывания. "Удаленный сайт связывания" охватывает как удаление всего сайта связывания, так и удаление его функциональной части. При удалении двух или более сайтов связывания можно использовать любую комбинацию удаления всего сайта связывания и удаления функциональной части.

[0085] В некоторых вариантах осуществления удалены по меньшей мере один сайт связывания Rea3 или его функциональная часть. Удаленным сайтом связывания Rea3 может быть Rea3 I, Rea3 II, Rea3 III, Rea3 IV и/или Rea3 V. В некоторых вариантах осуществления удаленным сайтом связывания Rea3 является Rea3 II, Rea3 III, Rea3 IV и/или Rea3 V. В некоторых вариантах осуществления удаленным сайтом связывания Rea3 является Rea3 IV и/или Rea3 V. В некоторых вариантах осуществления удаленным сайтом связывания Rea3 является Rea3 II и/или Rea3 III. В некоторых вариантах осуществления удаленным сайтом связывания Rea3 является как Rea3 II, так и Rea3 III. В некоторых вариантах осуществления сохранены сайт связывания Rea3 I или его функциональная часть.

[0086] В некоторых вариантах осуществления удалены по меньшей мере один сайт связывания E2F или его функциональная часть. В некоторых вариантах осуществления сохранены по меньшей мере один сайт связывания E2F или его функциональная часть. В некоторых вариантах осуществления сохраненным сайтом связывания E2F является E2F I и/или E2F II. В некоторых вариантах осуществления сохраненным сайтом связывания E2F является E2F II. В некоторых вариантах осуществления вся делеция состоит по существу из одного или нескольких из Pca3 II, Pca3 III, Pca3 IV и/или Pca3 V или их функциональных частей.

[0087] В некоторых вариантах осуществления вирус имеет делецию области размером 50 пар оснований, расположенной от -305 до -255 выше сайта инициации E1a, например соответствующей 195-244 генома Ad5 (SEQ ID NO: 52), далее называемую делецией TAV-255. В некоторых вариантах осуществления делеция TAV-255 приводит к промотору E1a, который содержит последовательность GGTGTTTTGG (SEQ ID NO: 55).

[0088] Аденовирусный ген E1b-19k функционирует в основном как антиапоптотический ген и является гомологом клеточного антиапоптотического гена BCL-2. Поскольку гибель клеток-хозяев до созревания вирусных частиц потомства ограничила бы вирусную репликацию, E1b-19k экспрессируется как часть кассеты E1 для предотвращения гибели незрелых клеток, что позволяет инфекции продолжаться и давать зрелые вирионы. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления предлагается рекомбинантный вирус, который включает в себя сайт вставки E1b-19K, например в аденовирус вставлена в сайт вставки E1b-19K экзогенная нуклеотидная последовательность, кодирующая раскрытый слитый белок.

[0089] В некоторых вариантах осуществления сайт вставки E1b-19K расположен между сайтом начала E1b-19K (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей старт-кодон E1b-19k, например соответствующий нуклеотидам 1714-1716 в соответствии с SEQ ID NO: 52) и сайтом начала E1b-55K (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей старт-кодон E1b-55k, например соответствующей нуклеотидам 2019-2021 в

соответствии с SEQ ID NO: 52). На протяжении настоящих описания и формулы изобретения следует понимать, что под вставкой между двумя сайтами, например вставкой между (i) сайтом начала первого гена (например, E1b-19k) и сайтом начала второго гена (например, E1b-55K), (ii) сайтом начала первого гена и сайтом окончания второго гена, (iii) сайтом окончания первого гена и сайтом начала второго гена или (iv) сайтом окончания первого гена и сайтом окончания второго гена, подразумевается, что все или часть нуклеотидов, составляющих данные сайт начала или сайт окончания, окружающие вставку, могут присутствовать или отсутствовать в конечном вирусе. Аналогично, следует понимать, что под вставкой между двумя нуклеотидами подразумевается, что нуклеотиды, окружающие вставку, могут присутствовать или отсутствовать в конечном вирусе.

[0090] В некоторых вариантах осуществления сайт вставки E1b-19K расположен между сайтом начала E1b-19K (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей старт-кодон E1b-19k, например соответствующей нуклеотидам 1714-1716 в соответствии с SEQ ID NO: 52) и сайтом окончания E1b-19K (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон E1b-19k, например соответствующей нуклеотидам 2242-2244 в соответствии с SEQ ID NO: 52). В некоторых вариантах осуществления сайт вставки E1b-19K содержит делецию от приблизительно 100 до приблизительно 305, от приблизительно 100 до приблизительно 300, от приблизительно 100 до приблизительно 250, от приблизительно 100 до приблизительно 200, от приблизительно 100 до приблизительно 150, от приблизительно 150 до приблизительно 305, от приблизительно 150 до приблизительно 300, от приблизительно 150 до приблизительно 250 или от приблизительно 150 до приблизительно 200 нуклеотидов, прилегающих к сайту начала E1b-19K. В некоторых вариантах осуществления сайт вставки E1b-19K содержит делецию приблизительно 200 нуклеотидов, например 203 нуклеотидов, прилегающих к сайту начала E1b-19K. В некоторых вариантах осуществления сайт вставки E1b-19K содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 1714-1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 52), или экзогенная нуклеотидная последовательность вставлена

между нуклеотидами, соответствующими 1714 и 1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 52). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеотидная последовательность вставлена между CTGACCTC (SEQ ID NO: 53) и TCACCAGG (SEQ ID NO: 54), например рекомбинантный аденовирус содержит в направлении от 5' к 3' CTGACCTC (SEQ ID NO: 53), экзогенную нуклеотидную последовательность и TCACCAGG (SEQ ID NO: 54). CTGACCTC (SEQ ID NO: 53) и TCACCAGG (SEQ ID NO: 54) определяют уникальные граничные последовательности для сайта вставки E1b-19K в геноме Ad5 (SEQ ID NO: 52). На протяжении настоящего описания и формулы изобретения следует понимать, что под делецией, прилегающей к сайту, например делецией, прилегающей к сайту начала гена, или делецией, прилегающей к сайту окончания гена, подразумевается, что эта делеция может включать делецию всех, части или ни одного из нуклеотидов, составляющих данный сайт начала или сайт окончания.

[0091] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус содержит делецию E3. В некоторых вариантах осуществления делеция E3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 3185, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2500, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3185, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2500, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500, от приблизительно 1500 до приблизительно 3185, от приблизительно 1500 до приблизительно 3000, от приблизительно 1500 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3185, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 2000 до приблизительно 2500, от приблизительно 2500 до приблизительно 3185, от приблизительно 2500 до приблизительно 3000 или от приблизительно 3000 до приблизительно 3185 нуклеотидов.

[0092] В некоторых вариантах осуществления делеция E3

содержит делецию, расположенную между сайтом окончания рVIII (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон рVIII, например соответствующей нуклеотидам 27855-27857 в соответствии с SEQ ID NO: 52) и сайтом начала Fiber (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей старт-кодон Fiber, например соответствующей нуклеотидам 31042-31044 в соответствии с SEQ ID NO: 52). В некоторых вариантах осуществления делеция E3 содержит делецию, расположенную между сайтом окончания E3-10.5K (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон E3-10.5K, например соответствующей нуклеотидам 29770-29772 в соответствии с SEQ ID NO: 52) и сайтом окончания E3-14.7K (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон E3-14.7K, например соответствующей нуклеотидам 30837-30839 в соответствии с SEQ ID NO: 52). В некоторых вариантах осуществления делеция E3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 1551, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1551, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1500 до приблизительно 1551 нуклеотида, прилегающих к сайту окончания E3-10.5K. В некоторых вариантах осуществления делеция E3 содержит делецию приблизительно 1050 нуклеотидов, прилегающих к сайту окончания E3-10.5K (т.е. нуклеотидной последовательности, кодирующей стоп-кодон E3-10.5K, например соответствующей нуклеотидам 29770-29772 в соответствии с SEQ ID NO: 52), например делеция E3 содержит делецию 1064 нуклеотидов, прилегающих к сайту окончания E3-10.5K. В некоторых вариантах осуществления делеция E3 содержит делецию, соответствующую делеции E3 dl309 Ad5. В некоторых вариантах осуществления делеция E3 содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 29773-30836 генома Ad5 (SEQ ID NO: 52).

[0093] В некоторых вариантах осуществления делеция E3 содержит делецию, расположенную между сайтом окончания E3-gr19K (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон E3-gr19K, например соответствующей нуклеотидам 29215-29217 в соответствии с SEQ ID NO: 52) и сайтом окончания E3-14.7K (т.е.

нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон E3-14.7K, например соответствующей нуклеотидам 30837-30839 в соответствии с SEQ ID NO: 52). В некоторых вариантах осуществления делеция E3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 1824, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1824, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1500 до приблизительно 1824 нуклеотидов, прилегающих к сайту окончания E3-grp19K. В некоторых вариантах осуществления делеция E3 содержит делецию приблизительно 1600 нуклеотидов, прилегающих к сайту окончания E3-grp19K. Например, сайт вставки E3 содержит делецию 1622 нуклеотидов, прилегающих к сайту окончания E3-grp19K. В некоторых вариантах осуществления делеция E3 содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 29218-30839 генома Ad5 (SEQ ID NO: 52).

[0094] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус содержит сайт вставки E3, например аденовирус содержит экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую раскрытый слитый белок, вставленный в делецию E3. Например, в некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеотидная последовательность вставлена между нуклеотидами, соответствующими 29773 и 30836 генома Ad5 (SEQ ID NO: 52). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеотидная последовательность вставлена между CAGTATGA (SEQ ID NO: 56) и ТААТАААААА (SEQ ID NO: 57), например рекомбинантный аденовирус содержит в направлении от 5' к 3' CAGTATGA (SEQ ID NO: 56), экзогенную нуклеотидную последовательность и ТААТАААААА (SEQ ID NO: 57). CAGTATGA (SEQ ID NO: 56) и ТААТАААААА (SEQ ID NO: 57) определяют уникальные граничные последовательности для сайта вставки E3 в геноме Ad5 (SEQ ID NO: 52).

[0095] В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеотидная последовательность вставлена между нуклеотидами, соответствующими 29218 и 30839 генома Ad5 (SEQ ID NO: 52). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеотидная

последовательность вставлена между TGCCTTAA (SEQ ID NO: 58) и TAAAAAAAAT (SEQ ID NO: 59), например рекомбинантный аденовирус содержит в направлении от 5' к 3' TGCCTTAA (SEQ ID NO: 58), экзогенную нуклеотидную последовательность и TAAAAAAAAT (SEQ ID NO: 59). TGCCTTAA (SEQ ID NO: 58) и TAAAAAAAAT (SEQ ID NO: 59) определяют уникальные граничные последовательности для сайта вставки E3 в геноме Ad5 (SEQ ID NO: 52).

[0096] Дополнительные типичные аденовирусные векторы, полезные для практической реализации этого аспекта настоящего изобретения, описаны в патенте США № 9073980.

IV. Модификации слитого белка

[0097] При использовании в качестве терапевтического средства слитый белок может быть оптимизирован (например, иметь созревшую аффинность) для улучшения биохимических характеристик, включая аффинность и/или специфичность, улучшения биофизических свойств, включая агрегацию, стабильность, осаждение и/или неспецифические взаимодействия, и/или снижения иммуногенности. Процедуры созревания аффинности известны средним специалистам в данной области техники. Например, разнообразие может быть введено в раскрытый слитый белок путем перетасовки ДНК, перетасовки цепей, перетасовки CDR, случайного мутагенеза и/или сайт-специфического мутагенеза.

[0098] Обычно оптимизированный слитый белок обладает по меньшей мере такой же или по существу такой же (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) аффинностью к лиганду, как и неоптимизированный (или родительский) слитый белок, от которого он происходит. Предпочтительно, оптимизированный слитый белок обладает более высокой аффинностью к лиганду по сравнению с родительским слитым белком.

[0099] Слитые белки (например, родительский и оптимизированный варианты) могут быть сконструированы так, чтобы они содержали определенные константные (т.е. Fc) области со специфической эффекторной функцией (например, антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC)). В данной области техники

известны константный области человека.

[0100] Кроме того, если слитый белок предназначен для использования в качестве терапевтического средства, он может быть конъюгирован с эффекторным средством, таким как низкомолекулярный токсин или радионуклид, с использованием стандартной химии конъюгации *in vitro*. Если эффекторное средство представляет собой полипептид, антитело может быть химически конъюгировано с эффектором или присоединено к эффектору как слитый белок. Конструирование слитых белков известно средним специалистам в данной области техники.

V. Способы лечения

[0101] Вышеуказанные слитые белки или векторы экспрессии можно использовать для лечения при различных медицинских показаниях. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные слитые белки или векторы экспрессии можно использовать для лечения при медицинских показаниях, которые опосредуются цитокином, например TGF β . Например, слитые белки и векторы экспрессии можно использовать для лечения различных раков или воспалительных заболеваний.

[0102] Как используется в настоящем документе, "лечить" и "лечение" означают лечение заболевания у субъекта, например у млекопитающего, например у человека. Сюда входят: (a) ингибирование заболевания, т.е. прекращение его развития; и (b) облегчение заболевания, т.е. вызывание регресса болезненного состояния. Как используется в настоящем документе, термины "субъект" и "пациент" относятся к организму, подлежащему лечению с помощью способов и композиций, описанных в настоящем документе. Такие организмы, предпочтительно, включают, но без ограничения, млекопитающих (например, мышинных, обезьян, лошадиных, бычьих, свиней, собачьих, кошачьих и т.п.) и, более предпочтительно, включают людей.

[0103] В некоторых вариантах осуществления слитые белки и векторы экспрессии, раскрытые в настоящем документе, можно использовать для лечения различных раков. Раковые клетки подвергаются воздействию терапевтически эффективного количества

слитого белка или вектора экспрессии, чтобы ингибировать или уменьшить пролиферацию раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления введение терапевтически эффективного количества слитого белка или вектора экспрессии в раковые клетки снижает уровень TGF β в клетках по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%. Активность TGF β можно анализировать с помощью вестерн-блота, как описано в примере 2. В некоторых вариантах осуществления раскрытый слитый белок или вектор экспрессии можно использовать для ингибирования роста опухоли у субъекта (например, пациента-человека, также называемого субъектом-человеком), что может быть достигнуто путем введения субъекту эффективного количества слитого белка или вектора экспрессии. В некоторых вариантах осуществления введение эффективного количества слитого белка или вектора экспрессии субъекта снижает опухолевую нагрузку у этого субъекта по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90%.

[0104] Примеры раков включают солидные опухоли, опухоли мягких тканей, гематопозитические опухоли и метастатические поражения. Примеры гематопозитических опухолей включают лейкоз, острый лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (ALL), В-клеточный, Т-клеточный или FAB ALL, острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелоцитарный лейкоз (CML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), например трансформированный CLL, диффузные В-крупноклеточные лимфомы (DLBCL), фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, миелодипластический синдром (MDS), лимфому, болезнь Ходжкина, злокачественную лимфому, неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта, множественную миелому или синдром Рихтера (трансформацию Рихтера). Примеры солидных опухолей включают злокачественные новообразования, например саркомы, аденокарциномы и карциномы, различных систем органов, такие как поражающие голову и шею (включая глотку), щитовидную

железу, легкое (мелкоклеточная или немелкоклеточная карцинома легкого (NSCLC)), молочную железу, лимфоидную систему, желудочно-кишечный тракт (например, ротовую полость, пищевод, желудок, печень, поджелудочную железу, тонкий кишечник, толстый кишечник и прямую кишку, анальный канал), половые органы и мочеполовой тракт (например, почки, уротелий, мочевого пузыря, яичники, матку, шейку матки, эндометрий, предстательную железу, яички), ЦНС (например, нервные или глиальные клетки, например нейробластома или глиома) или кожу (например, меланома).

[0105] В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из меланомы, плоскоклеточной карциномы кожи, базальноклеточной карциномы, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака анального канала, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого, мезотелиомы, мелкоклеточного рака легкого, почечно-клеточной карциномы, рака предстательной железы, гастроэзофагеального рака, колоректального рака, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака яичника, рака печени, гепатоклеточной карциномы, холангиокарциномы, рака головного мозга и центральной нервной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы (например, карциномы паращитовидной железы), рака эндометрия, нейроэндокринного рака, лимфомы (например, ходжкинской и неходжкинской), лейкоза, карциномы из клеток Меркеля, гастроинтестинальных стромальных опухолей, множественной миеломы, рака матки, саркомы, рака почки, рака глаза, рака поджелудочной железы и герминогенного рака (например, герминогенного рака яичника). В некоторых вариантах осуществления рак может быть выбран из лейкоза, рака молочной железы, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака эндометрия, рака яичника, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака головного мозга, рака кожи, колоректального рака, рака желудка, рака головы и шеи и лейкоза. В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из лейкоза, рака молочной железы, рака шейки матки, колоректального рака, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака желудка, рака головы и шеи, рака эндометрия и рака яичника.

[0106] В некоторых вариантах осуществления слитый белок или

вектор экспрессии настоящего раскрытия вводят для снижения уровней одного или нескольких цитокинов у нуждающегося в этом субъекта (например, субъекта с воспалительным состоянием). В некоторых вариантах осуществления раскрытый слитый белок или вектор экспрессии можно использовать для лечения воспалительного состояния у субъекта (например, субъекта-человека), что может быть достигнуто путем введения субъекту эффективного количества слитого белка или вектора экспрессии.

[0107] Как используется в настоящем документе, воспалительное состояние представляет собой заболевание или состояние, характеризующееся, полностью или частично, воспалением или воспалительным ответом у пациента. Воспалительные состояния, которые можно лечить с использованием слитых белков или векторов экспрессии настоящего изобретения, можно охарактеризовать, например, на основе пораженной первичной ткани, механизма действия, лежащего в основе состояния, или части иммунной системы, которая является нерегулируемой или сверхактивной. В некоторых вариантах осуществления примеры воспалительных состояний, которые можно лечить, включают воспаление легких (например, астму, респираторный дистресс-синдром взрослых, бронхит, легочное воспаление, легочный фиброз и муковисцидоз), суставов (например, ревматоидный артрит, ревматоидный спондилит, ювенильный ревматоидный артрит, остеоартрит, подагрический артрит и другие артритические состояния), соединительной ткани, глаз (например, увеит (включая ирит), конъюнктивит, склерит и сухой кератоконъюнктивит), носа, кишечника (например, болезнь Крона, язвенный колит, воспалительное заболевание кишечника, синдром раздраженного кишечника и дистальный проктит), почки (например, гломерулонефрит, интерстициальный нефрит, волчаночный нефрит, вторичный по отношению к болезни Вегенера нефрит, вторичная по отношению к острому нефриту острая почечная недостаточность, синдром Гудпастура, постобструктивный синдром и тубулярная ишемия), печени (например, гепатит (возникающий из-за вирусной инфекции, аутоиммунных реакций, применения лекарственных средств, токсинов, факторов окружающей среды или как вторичное

последствие первичного нарушения), ожирение, билиарная атрезия, первичный билиарный цирроз и первичный склерозирующий холангит), кожи (например, псориаз, экзема и дерматит, например экзематозные дерматиты, топический и себорейный дерматит, аллергический или ирритативный контактный дерматит, сухая экзема, фотоаллергический дерматит, фототоксический дерматит, фитофотодерматит, лучевой дерматит и затойный дерматит), центральной нервной системы (например, множественный склероз и нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона или деменция, связанная с ВИЧ-инфекцией), сосудистой системы (например, коронарное инфарктное поражение, заболевание периферических сосудов, миокардит, васкулит, реваскуляризация стеноза, атеросклероз и сосудистое заболевание, связанное с диабетом II типа), эндокринной системы (например, аутоиммунный тиреоидит (болезнь Хашимото), диабет I типа, воспаление печени и жировой ткани, связанное с диабетом II типа, и острое и хроническое воспаление коры надпочечников), сердца или жировой ткани. Настоящее раскрытие предполагает, что некоторые воспалительные состояния включают воспаление во многих тканях. Кроме того, настоящее раскрытие предполагает, что некоторые воспалительные состояния могут быть разделены на несколько категорий. В некоторых вариантах осуществления воспалительное состояние представляет собой аутоиммунное заболевание. Типичные аутоиммунные заболевания включают, но без ограничения, ревматоидный артрит, псориаз (включая бляшечный псориаз), псориатический артрит, анкилозирующий спондилит, язвенный колит, множественный склероз, волчанку, алопецию, аутоиммунный панкреатит, целиакию, болезнь Бехчета, болезнь Кушинга и болезнь Грейвса. В некоторых вариантах осуществления воспалительное состояние представляет собой ревматоидное нарушение. Типичные ревматоидные нарушения включают, но без ограничения, ревматоидный артрит, ювенильный артрит, бурсит, спондилит, подагру, склеродермию, болезнь Стилла и васкулит. Следует отметить, что некоторые категории состояний перекрываются. Например, ревматоидный артрит является воспалительным ревматоидным нарушением, воспалительным

заболеванием суставов и аутоиммунным расстройством.

[0108] Термин "эффективное количество", как используется в настоящем документе, относится к количеству активного компонента (например, количеству слитого белка или вектора экспрессии настоящего изобретения), достаточному для достижения полезных или желаемых результатов. Эффективное количество может быть введено за одно или несколько введений, нанесений или дозирований, и не предполагается, что оно ограничено конкретными композицией или способом введения.

[0109] В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество слитого белка находится в диапазоне от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг, например от 1 мг/кг до 100 мг/кг, от 1 мг/кг до 10 мг/кг, от 1 мг/кг до 5 мг/кг, 10 мг/кг, 7,5 мг/кг, 5 мг/кг или 2,5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество вектора экспрессии, например рекомбинантного вируса, находится в диапазоне от 10^2 до 10^{15} бляшкообразующих единиц (БОЕ), например от 10^2 до 10^{10} , от 10^2 до 10^5 , от 10^5 до 10^{15} , от 10^5 до 10^{10} или от 10^{10} до 10^{15} бляшкообразующих единиц. Вводимое количество будет зависеть от таких переменных, как тип и степень заболевания или показания, подлежащих лечению, общее состояние здоровья пациента, активность слитого белка или вектора экспрессии *in vivo*, фармацевтическая композиция и способ введения. Начальная дозировка доза может быть увеличена за пределы верхнего уровня, для того чтобы быстро достичь желаемого уровня в крови или уровня в ткани. Альтернативно, начальная дозировка может быть меньше оптимальной, и суточная дозировка может постепенно увеличиваться во время лечения. Дозировка для человека может быть оптимизирована, например, в обычном исследовании с повышением дозы фазы I, спланированном с диапазоном от 0,5 мг/кг до 20 мг/кг. Частота дозирования может варьироваться в зависимости от таких факторов, как способ введения, дозировка, период полувыведения антитела из сыворотки и подвергаемое лечению заболевание. Типичными частотами дозирования являются один раз в день, один раз в неделю и один раз каждые две недели. Предпочтительным способом введения является парентеральный,

например внутривенная инфузия. Композиция лекарственных средств на основе слитого белка или вектора экспрессии находится в пределах компетенции среднего специалиста в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления слитый белок или вектор экспрессии лиофилизируют, а затем восстанавливают в забуференном солевом растворе во время введения.

[0110] Для терапевтического применения слитый белок или вектор экспрессии, предпочтительно, комбинируют с фармацевтически приемлемым носителем. Как используется в настоящем документе, "фармацевтически приемлемый носитель" означает буферы, носители и вспомогательные вещества, подходящие для использования в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического ответа или других проблем или осложнений в соответствии с разумным отношением риск/польза. Носитель(и) должен быть "приемлемым" в том смысле, что он совместим с другими ингредиентами композиций и не вреден для реципиента. Фармацевтически приемлемые носители включают буферы, растворители, дисперсионные среды, покрытия, изотонические и замедляющие абсорбцию средства и т.п., которые совместимы с фармацевтическим введением. Использование таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники.

[0111] Фармацевтические композиции, содержащие слитые белки или векторы экспрессии, раскрытые в настоящем документе, могут быть представлены в стандартной лекарственной форме и могут быть с помощью любого подходящего способа. Фармацевтическая композиция должна быть составлена так, чтобы она была совместима с предполагаемым способом введения. Примерами способов введения являются внутривенное (в/в), внутрикожное, ингаляционное, внутриглазное, интраназальное, трансдермальное, местное, трансмукозальное и ректальное введение.

[0112] Предпочтительным способом введения для слитых белков является в/в инфузия. Полезные композиции могут быть получены с помощью способов, известных в области фармацевтики. Смотри, например, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990). Компоненты композиций, подходящие для

парентерального введения, включают стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, солевой раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты; и средства для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза.

[0113] Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатный буферный солевой раствор (ФСБ). Носитель должен быть стабильным в условиях изготовления и хранения и должен быть защищен от микроорганизмов. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль), и их подходящие смеси.

[0114] Фармацевтические композиции, предпочтительно, являются стерильными. Стерилизация может быть осуществлена любым подходящим способом, например фильтрацией через стерильные фильтрующие мембраны. Если композиция лиофилизирована, стерилизацию фильтрацией можно проводить до или после лиофилизации и восстановления. В некоторых вариантах осуществления носитель для доставки (например, рекомбинантный вирус) и/или терапевтическое средство настоящего изобретения вводят в комбинации с ингибитором контрольных точек, например анти-CTLA-4 антителом, анти-PD-1 антителом или анти-PD-L1 антителом. Типичные анти-PD-1 антитела включают, например, ниволумаб (Opdivo®, Bristol-Myers Squibb Co.), пембролизумаб (Keytruda®, Merck Sharp & Dohme Corp.), PDR001 (Novartis Pharmaceuticals) и пидилизумаб (CT-011, Cure Tech). Типичные анти-PD-L1 антитела включают, например, атезолизумаб (Tecentriq®, Genentech), дувалумаб (AstraZeneca), MEDI4736, авелумаб (Bavencio®, EMD Serono) и BMS 936559 (Bristol Myers

Squibb Co.) .

[0115] Следует понимать, что под термином вводимый "в комбинации", как используется в настоящем документе, подразумевается, что пока субъект страдает от болезни, ему доставляют два (или более) различных лечебных средства, так что оказываемые на субъекта эффекты этих лечебных средств перекрываются в определенный момент времени. В некоторых вариантах осуществления доставка одного лечебного средства все еще продолжается, когда начинается доставка второго, так что происходит перекрывание по введению. Это иногда называется в настоящем документе "симультанной" или "одновременной доставкой". В других вариантах осуществления доставка одного лечебного средства заканчивается до начала доставки другого лечебного средства. В некоторых вариантах осуществления любого из этих вариантов лечебное средство является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе лечебное средство является более эффективным, например эквивалентный эффект наблюдается при меньшем количестве второго лечебного средства, или второе лечебное средство уменьшает симптомы в большей степени, чем можно было бы наблюдать при введении второго лечебного средства в отсутствие первого лечебного средства, или аналогичная ситуация наблюдается с первым лечебным средством. В некоторых вариантах осуществления доставка такова, что уменьшение симптома или другого параметра, связанного с нарушением, оказывается больше, чем можно было бы наблюдать при доставке одного лечебного средства в отсутствие другого. Эффект двух лечебных средств может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или большим, чем аддитивный. Доставка может быть такой, что эффект от первого доставленного лечебного средства все еще можно обнаружить во время доставки второго.

[0116] На протяжении настоящего описания, если композиции, устройства и системы описаны как имеющие, включающие в себя или содержащие определенные компоненты, или если процессы и способы описаны как имеющие, включающие в себя или содержащие определенные этапы, предполагается, что дополнительно существуют композиции, устройства и системы настоящего изобретения, которые

состоят по существу или состоят из перечисленных компонентов, и что существуют процессы и способы в соответствии с настоящим изобретением, которые состоят по существу или состоят из перечисленных технологических этапов.

[0117] В настоящей заявке, если упомянуто, что элемент или компонент включены и/или выбраны из списка перечисленных элементов или компонентов, следует понимать, что эти элемент или компонент могут представлять собой любой из перечисленных элементов или компонентов, или эти элемент или компонент могут быть выбраны из группы, состоящей из двух или более из перечисленных элементов или компонентов.

[0118] Кроме того, следует понимать, что элементы и/или признаки композиции или способа, описанных в настоящем документе, могут быть объединены различными способами без отхода от сущности и объема настоящего изобретения, будь то явно или неявно указано в настоящем документе. Например, если указан конкретный вирус, этот вирус можно использовать в различных вариантах осуществления композиций настоящего изобретения и/или в способах настоящего изобретения, если иное не понятно из контекста. Другими словами, в этой заявке варианты осуществления описаны и показаны таким образом, который позволяет ясно и кратко описывать и составлять заявку, но следует понимать, что варианты осуществления могут быть по-разному объединены или разделены без отхода от рассматриваемых идей и изобретения(ий). Например, следует понимать, что все признаки, описанные и показанные в настоящем документе, могут быть применимы ко всем аспектам настоящего изобретения(ий), описанным и показанным в настоящем документе.

[0119] Следует понимать, что выражение "по меньшей мере один из" включает по отдельности каждый из перечисленных после этого выражения объектов и различные комбинации двух или более из перечисленных объектов, если иное не понятно из контекста и применения. Выражение "и/или" в связи с тремя или более перечисленными объектами следует понимать как имеющее такое же значение, если иное не понятно из контекста.

[0120] Использование терминов "включать в себя", "включает

в себя", "включая в себя", "иметь", "имеет", "имеющий", "содержать", "содержит" или "содержащий", включая их грамматические эквиваленты, обычно следует понимать как открытые и неограничивающие, например не исключающие дополнительные неперечисленные элементы или этапы, если иное прямо не указано или не понятно из контекста.

[0121] Если термин "приблизительно" используется перед количественным значением, настоящее изобретение также включает в себя само конкретное количественное значение, если прямо не указано иное. Как используется в настоящем документе, термин "приблизительно" относится к отклонению на $\pm 10\%$ от номинального значения, если не указано или не подразумевается иное.

[0122] Следует понимать, что порядок этапов или порядок выполнения определенных действий несущественны, если настоящее изобретение остается работоспособным. Кроме того, два или более этапа или действия могут быть выполнены одновременно.

[0123] Использование в настоящем документе каких бы то ни было примеров или примерных формулировок, например "такой как" или "включая", предназначено только для лучшей иллюстрации настоящего изобретения и не налагает ограничений на объем настоящего изобретения, если это не указано в формуле. Никакие формулировки в описании не следует интерпретировать как указывающие на какой-либо незаявленный элемент как существенный для осуществления настоящего изобретения на практике.

ПРИМЕРЫ

[0124] Следующие примеры являются только иллюстративными и не предназначены для какого-либо ограничения объема или содержания изобретения.

Пример 1: Конструирование плазмид и аденовирусов с слитым белком TGF β R

[0125] Этот пример описывает получение плазмид и вирусных векторов экспрессии, которые кодируют слитые белки TGF β R.

[0126] Для конструирования нуклеотидной последовательности, кодирующей слитый белок мышинового TGF β R с IgG1 (mTGF β R-IgG1) плазмиды pORF9-mIL10RA, pUNO1-mTGFBR2 и pFUSEss-CHIg-mG1 были

приобретены у Invivogen. Плазмиду pUNO1-mTGFB2 расщепляли с помощью KasI и NheI для высвобождения фрагмента размером 1,7 т.п.о. с кодирующей областью мышинного рецептора TGF β типа 2. Плазмиду pORF9-mIL10RA расщепляли с помощью KasI и NheI для высвобождения фрагмента размером 3 т.п.о., содержащего остов вектора. Эти два фрагмента лигировали для получения плазмиды pORF9-TGFB2.

[0127] Плазмиду pORF9-TGFB2 амплифицировали с праймерами, фланкирующими сайт KasI в направлении 5' от кодирующей области, и или праймером, соответствующим 3'-концу внеклеточного домена, за которым следует сайт NheI, для получения только внеклеточного домена, или праймером, соответствующим 3'-концу внеклеточного домена, за которым следует часть CH1-домена мышинного IgG1 (mIgG1), для получения 5'-половины слитого гена. Плазмиду pFUSEss-CH1g-mG1 амплифицировали с праймерами, соответствующими 3'-концу гена mIgG1, за которым следует сайт NheI, и 3'-концу внеклеточного домена mTGFB β R, за которым следует часть CH1-домена mIgG1. Слитые гены получали путем комбинирования этих продуктов ПЦР во втором цикле реакции ПЦР. Продукты ПЦР затем расщепляли с помощью KasI и NheI и лигировали в остов pORF9, расщепляемый теми же ферментами для создания плазмид pORF9, несущих или внеклеточный домен, или слитые гены mIgG1. Полученная нуклеотидная последовательность кодирует слитый белок (mTGFB β R-IgG, SEQ ID NO: 33), включающий в себя остатки 1-159 последовательности mTGFB β R (оканчивающиеся на TSSPD), непосредственно за которыми следуют остатки 90-324 последовательности mIgG1, начиная с начала последней β -цепи второй складки иммуноглобулина (начиная с STKVD).

[0128] Для конструирования нуклеотидных последовательностей, кодирующих слитые белки человеческого TGF β R с IgG1, плазмиды, несущие кДНК человеческого IgG1 (hIgG1, код BC072419 в pCMV-SPORT6) и человеческого рецептора TGF β 2 типа (код BC040499 в pBluescriptR), были приобретены у Thermo Scientific. ПЦР-амплификацию с использованием 5'-праймера, несущего сайт SalI, 3'-праймера, несущего сайт XhoI, и

связывающих праймеров, несущих последовательность с 3'-конца hTGF β R и 5'-конца hIgG1, проводили, как описано для мышиных генов.

[0129] Были получены нуклеотидные последовательности, кодирующие серию слитых белков. Первый слитый белок, hTGF β R-IgG1-1 (SEQ ID NO: 22), включает в себя остатки 1-159 hTGF β R (оканчивающиеся на TSNPD), непосредственно за которыми следуют остатки 88-330 hIgG1, начиная с начала последней β -цепи второй складки иммуноглобулина (начиная с KPSNT). Второй слитый белок, hTGF β R-IgG1-2 (SEQ ID NO: 62), включает в себя остатки 1-159 hTGF β R (оканчивающиеся на TSNPD), непосредственно за которыми следуют остатки 90-330 hIgG1 (начиная с SNTKV). Третий слитый белок, hTGF β R-IgG1-3 (SEQ ID NO: 63), включает в себя остатки 1-159 hTGF β R (оканчивающиеся на TSNPD), непосредственно за которыми следуют остатки 92-330 hIgG1 (начиная с TKVDK). Четвертый слитый белок, hTGF β R-IgG1-4, включает в себя остатки 1-159 hTGF β R (оканчивающиеся на TSNPD), непосредственно за которыми следуют остатки 94-330 hIgG1 (начиная с VDKRV). Пятый слитый белок, hTGF β R-Fc (SEQ ID NO: 48), включает в себя остатки 1-159 TGF β R (оканчивающиеся на TSNPD), непосредственно за которыми следуют остатки 100-330 hIgG1 (начиная с PKSCD). Пятый слитый белок был назван hTGF β R-Fc, поскольку он включает в себя только Fc-домен и шарнирную область иммуноглобулина в отличие от hTGF β R-IgG1-1, hTGF β R-IgG1-2, hTGF β R-IgG1-3 и hTGF β R-IgG1-4, которые включают в себя от шести до двенадцати дополнительных аминокислот из hIgG1. Подробно слитые белки показаны в ТАБЛИЦЕ 3.

ТАБЛИЦА 3

Слитый белок	Остатки hTGF β R	Остатки hIgG1	Соединение hTGF β R-hIgG1
hTGF β R-IgG1-1	1-159	88-330	TSNPD-KPSNTKVVDKRVEPKSCD
hTGF β R-IgG1-2	1-159	90-330	TSNPD-SNTKVVDKRVEPKSCD
hTGF β R-IgG1-3	1-159	92-330	TSNPD-TKVVDKRVEPKSCD
hTGF β R-IgG1-4	1-159	94-330	TSNPD-VDKRVEPKSCD

hTGFβR-Fc	1-159	100-330	TSNPD-PKSCD
-----------	-------	---------	-------------

[0130] Нуклеотидные последовательности, кодирующие слитые белки, клонировали в плазмиды для последующего применения в соответствующих случаях. Для конструирования аденовируса нуклеотидные последовательности клонировали в производное pXC1 (которое несет 5'-часть генома аденовируса), модифицированное так, чтобы нести сайт SalI у сайта начала области E1B-19k и сайт XhoI на 200 пар оснований в направлении 3' от сайта SalI. Когда это указано, pXC1 дополнительно модифицировали в области промотора E1A для получения плазмиды pXC1-TAV-255, которая делает экспрессию E1A рак-селективной (как ранее было описано в патенте США № 9073980). Продукты ПЦР клонировали в остов pXC1 (или pXC1-TAV) с использованием InFusion (Clontech) в соответствии с инструкциями производителя.

[0131] Если указано, плазмиды pXC1 котрансфицировали с плазмидой pJM17 в клетки HEK-293A, чтобы обеспечить гомологичную рекомбинацию для спасения рекомбинантного вируса. Вирус собирали и подвергали двум циклам очистки бляшкообразованием и секвенирования для подтверждения присутствия слитого гена и тестировали на наличие делеции TAV-255 при необходимости. Вирус, несущий мышиную изоформу, выращивали в клетках 293, а вирус, несущий человеческую изоформу, подвергали очистке бляшкообразованием и выращивали исключительно в клетках A549 после первоначального спасения вируса в клетках 293. Вирус для использования в экспериментах на животных очищали с использованием наборов для очистки аденовирусов Fast-Trap (Millipore), диализовали в буфер для хранения вируса (25 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 5% глицерина) и хранили при -80° до использования. Протестированные вирусы подробно показаны в **ТАБЛИЦЕ 4**.

ТАБЛИЦА 4

Вирус	Промотор E1A	Модификация E1B-19k
Дикого типа	Дикого типа	Дикого типа
Ad-Control	Дикого типа	Удалена
Ad-mTGFβR-IgG1	Дикого типа	Удалена и заменена на mTGFβR-IgG1

Ad-hTGFβR-IgG1-1	TAV-255	Удалена и заменена на hTGFβR-IgG1-1
------------------	---------	-------------------------------------

Пример 2: Ингибирование сигнализации TGFβ

[0132] Этот пример описывает сравнение между раскрытыми слитыми белками hTGFβR-IgG1 и обычными слитыми белками hTGFβR-IgG1.

[0133] Как описано в примере 1, получали плазмиды, кодирующие ряд слитых белков ловушек человеческого TGFβ: hTGFβR-IgG1-1, hTGFβR-IgG1-2, hTGFβR-IgG1-3, hTGFβR-IgG1-4 и hTGFβR-Fc.

[0134] hTGFβR-Fc (SEQ ID NO: 48) содержит аминокислоты с Thr23 по Asp159 человеческого рецептора TGFβ II типа и аминокислоты с Pro100 по Lys330 человеческого IgG1. Эта последовательность идентична используемой в коммерчески доступном слитом белке ловушки TGFβ (R&D Systems).

[0135] В отличие от обычного слитого белка ловушки TGFβ hTGFβR-IgG1-1 (SEQ ID NO: 22), hTGFβR-IgG-2 (SEQ ID NO: 54), hTGFβR-IgG-3 (SEQ ID NO: 55) и hTGFβR-IgG-4 содержат соответственно двенадцать, десять, восемь или шесть аминокислот из CH1-домена IgG1, которые служат гибким неиммуногенным линкером между рецептором TGFβ II типа и шарнирной и Fc-областью IgG1.

[0136] Клетки НЕК-293 трансфицировали плазмидами pXC1, несущими гены hTGFβR-IgG1-1, hTGFβR-IgG1-2, hTGFβR-IgG1-3, hTGFβR-IgG1-4 или hTGFβR-Fc, или оставляли в качестве нетрансфицированного контроля и инкубировали в течение пяти дней для обеспечения экспрессии и секреции белка в среду. Кондиционированную среду собирали, TGFβ добавляли в среду в количестве 500 пг/мл, если указано, и затем среду наносили на свежие репортерные клетки и инкубировали в течение одного часа. Свободный TGFβ индуцирует в репортерных клетках фосфорилирование Smad2, однако, если слитый белок ловушки TGFβ блокирует TGFβ, то он не вызовет фосфорилирование Smad2. Белковые экстракты репортерных клеток тестировали с помощью вестерн-блота в

отношении фосфорилированного Smad2. В качестве контроля нагрузки использовали β -актин, или для получения контроля нагрузки блот впоследствии разделяли и повторно тестировали в отношении общего Smad2 и Smad3.

[0137] Сравнение между hTGF β R-IgG1-1 и hTGF β R-Fc показано на **фигуре 3**. Как видно на **фигуре 3**, кондиционированная среда от клеток, трансфицированных обычным слитым геном hTGF β R-Fc, умеренно ингибирует TGF β , тогда как hTGF β R-IgG-1 более эффективно блокирует сигнализацию TGF β . Количественная оценка интенсивности вестерн-блота показывает, что по сравнению с контролем hTGF β R-Fc приводит к снижению активности TGF β на 21%, а hTGF β R-IgG приводит к снижению активности TGF β на 92%.

[0138] Сравнение между hTGF β R-IgG1-1, hTGF β R-IgG1-2, hTGF β R-IgG1-3 и hTGF β R-IgG1-4 показано на **фигуре 4**. Как видно на **фигуре 4**, кондиционированная среда от клеток, трансфицированных слитыми генами hTGF β R-IgG1-1 и hTGF β R-IgG1-2, эффективно блокировала сигнализацию TGF β .

[0139] Вместе эти результаты демонстрируют, что раскрытые слитые белки hTGF β R-IgG1, например hTGF β R-IgG1-1 и hTGF β R-IgG1-2, заметно снижают активность TGF β по сравнению с обычным слитым белком hTGF β R-IgG1, например hTGF β R-Fc.

Пример 3: Ингибирование роста опухоли

[0140] Эксперименты на мышах проводили с использованием Ad-mTGF β R-IgG1, вируса, несущего слитый ген mTGF β R-IgG1, для предотвращения нежелательной индукции мышинных антител против человеческой изоформы TGF β R. Также тестировали Ad-Control, контрольный вирус, в котором был удален сайт E1B-19k, используемый для переноса трансгена. Вирусы Ad-mTGF β R-IgG1 и Ad-Control не несут делеции TAV-255 размером 50 п.о., которая служит механизмом ослабления для снижения репликации вируса в нормальных клетках. Вирусы получали, как описано в примере 1, и ключевые признаки вирусов схематически показаны в **ТАБЛИЦЕ 4** выше.

[0141] Многие мышинные клетки могут быть инфицированы человеческим аденовирусом с некоторой степенью экспрессии вирусного гена, но большинство линий мышинных клеток не являются перmissive для репликации человеческого аденовируса 5 типа. ADS-12 является линией мышинных клеток рака легкого, которая недавно была описана как первая (и в настоящее время единственная) идентифицированная линия мышинных раковых клеток, которая поддерживает репликацию аденовируса человека на уровне, сравнимом с человеческими клетками, и поэтому ее выбрали в качестве модельной системы (Zhang et al. (2015), CANCER GENE THER. 22(1):17-22).

[0142] Мышей, несущих подкожные опухоли ADS-12, обрабатывали с помощью внутриопухолевых инъекций, вводимых каждые четыре дня для трех полных доз носителя, Ad-Control или Ad-mTGF β R-IgG1 в количестве 10^9 БОЕ на дозу.

[0143] Как показано на **фигурах 5A-5C**, все опухоли, обработанные с помощью внутриопухолевых инъекций только буфера, прогрессировали. Четыре из десяти опухолей, обработанных "невооруженным" вирусом Ad-Control, полностью регрессировали, что свидетельствует о онколитической активности в отсутствие экспрессии опухоль-специфического трансгена ловушки TGF β . Напротив, восемь из десяти опухолей, обработанных Ad-mTGF β R-IgG1, полностью регрессировали, демонстрируя улучшенное уничтожение опухоли трансгеном.

[0144] Таким образом, онколитический вирус, экспрессирующий новую ловушку TGF β , раскрытую в настоящем документе, показал значительно улучшенные противоопухолевые эффекты.

Пример 4: Ингибирование сигнализации TGF β в раковых клеточных линиях

[0145] Анализы ингибирования TGF β проводили на линиях человеческих клеток с использованием вирусов Ad-hTGF β R-IgG1-1, Ad-mTGF β R-IgG1 и Ad-Control. Вирусы получали, как описано в примере 1, и ключевые признаки вирусов схематически показаны в **ТАБЛИЦЕ 4** выше. Эффекты вируса были протестированы на нормальных (WI-38 и MRC5) и раковых (ADS-12, A549 и MCF7) клетках.

Кондиционированные среды от клеток, инфицированных указанным вирусом, наносили на свежие репортерные клетки, и добавляли TGF β , как описано в примере 2. Как видно на **фигурах 6А–6В**, индукция TGF β фосфорилирования Smad2 была снижена в кондиционированных средах от всех клеточных линий, инфицированных Ad-hTGF β R-IgG1-1. Таким образом, Ad-hTGF β R-IgG1-1 индуцировал надежную блокаду TGF β в раковых клетках и даже снижал активность TGF β в инфицированных нормальных клетках.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0146] Полное раскрытие каждого из патентных документов и научных статей, упомянутых в настоящем документе, включено посредством ссылки для всех целей.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[0147] Настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отхода от его сущности или существенных характеристик. Поэтому вышеуказанные варианты осуществления следует рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение, описанное в настоящем документе. Таким образом, объем настоящего изобретения указан в прилагаемой формуле изобретения, а не в приведенном выше описании, и в него должны быть включены все изменения, которые соответствуют значению и диапазону эквивалентности формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный слитый белок, содержащий:

(i) первую часть внеклеточного домена, трансмембранного домена или внутриклеточного домена цитокина, цитокинового рецептора или иммуномодулирующего белка;

(ii) аминокислотный линкер; и по меньшей мере одно из

(iii) второй части внеклеточного домена, трансмембранного домена или внутриклеточного домена цитокина, цитокинового рецептора или иммуномодулирующего белка;

(iv) шарнирной области иммуноглобулина (Ig); и

(v) Fc-домена иммуноглобулина (Ig).

2. Выделенный слитый белок по п. 1, в котором линкер содержит от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислотных остатков.

3. Выделенный слитый белок, содержащий в направлении от N-к C-концу:

(i) растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора;

(ii) аминокислотный линкер;

(iii) шарнирную область иммуноглобулина (Ig); и

(iv) Fc-домен иммуноглобулина (Ig);

причем линкер содержит от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислотных остатков.

4. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-3, в котором линкер содержит от приблизительно 5 до приблизительно 30 аминокислотных остатков.

5. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-3, в котором линкер содержит от приблизительно 5 до приблизительно 20 аминокислотных остатков.

6. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-3, в котором линкер содержит от приблизительно 5 до приблизительно 15 аминокислотных остатков.

7. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-3, в котором линкер содержит от приблизительно 10 до приблизительно 40 аминокислотных остатков.

8. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-3, в котором

линкер содержит от приблизительно 10 до приблизительно 30 аминокислотных остатков.

9. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-3, в котором линкер содержит от приблизительно 10 до приблизительно 20 аминокислотных остатков.

10. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-3, в котором линкер содержит от приблизительно 10 до приблизительно 15 аминокислотных остатков.

11. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-10, в котором линкер содержит последовательность, происходящую от эндогенного человеческого белка.

12. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-11, в котором линкер содержит С-концевую часть CH1-домена иммуноглобулина.

13. Выделенный слитый белок по п. 12, в котором CH1-домен Ig выбирают из CH1-доменов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM.

14. Выделенный слитый белок по п. 13, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61.

15. Выделенный слитый белок по п. 13, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

16. Выделенный слитый белок по п. 14 или 15, в котором CH1-домен Ig представляет собой CH1-домен IgG1.

17. Выделенный слитый белок по п. 16, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61.

18. Выделенный слитый белок по п. 16, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1.

19. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-11, в котором линкер содержит последовательность, происходящую от

человеческого белка, выбранного из альбумина и казеина.

20. Выделенный слитый белок по п. 19, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11.

21. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-11, в котором линкер содержит последовательность, происходящую от цитокина, сигнальной молекулы, иммуномодулирующего белка или пептида.

22. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-21, в котором линкер содержит сайт расщепления.

23. Выделенный слитый белок по п. 22, в котором сайт расщепления представляет собой сайт протеолитического расщепления.

24. Выделенный слитый белок по п. 23, в котором сайт протеолитического расщепления расщепляется протеазой, которая присутствует в эндоплазматическом ретикулуме или аппарате Гольджи эукариотической клетки.

25. Выделенный слитый белок по п.п. 23 или 24, в котором сайт протеолитического расщепления представляет собой сайт расщепления фурином.

26. Выделенный слитый белок по п. 25, в котором сайт расщепления фурином содержит RX_1X_2R (SEQ ID NO: 50), где X_1 представляет собой любую аминокислоту, и X_2 представляет собой Lys или Arg.

27. Выделенный слитый белок по п. 26, в котором сайт расщепления фурином содержит RAKR (SEQ ID NO: 51).

28. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-21, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность, которая протеолитически стабильна в млекопитающем или растении.

29. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-28, в котором цитокиновый рецептор представляет собой человеческий рецептор $TGF\beta$ II типа.

30. Выделенный слитый белок по п. 29, в котором растворимая часть внеклеточного домена цитокинового рецептора содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:

12.

31. Выделенный слитый белок по п. 29, в котором растворимая часть внеклеточного домена цитокинового рецептора содержит аминокислотные остатки 23-159 в соответствии с SEQ ID NO: 12.

32. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-31, причем данный слитый белок содержит один или несколько из TGF- β , CD80, CD19, CD20, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-12B/p40, IL-23A/p19, IL27A/p28, IL-27B/EBI3, CD154, CD86, CD137, CD137L, IFN- α , IFN- β , BORIS/CTCFL, FGF, ICAM, IL-24, MAGE, NY-ESO-1, ангиостатина, эндостатина, ацетилхолина, интерферона-гамма, DKK1/Wnt, p53, тимидинкиназы, тяжелой цепи или легкой цепи анти-PD-1 антитела и тяжелой цепи или легкой цепи анти-PD-L1 антитела или их функционального фрагмента.

33. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-32, в котором Fc-домен и шарнирную область Ig выбирают из Fc-доменов и шарнирных областей человеческих IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM.

34. Выделенный слитый белок по п. 33, в котором Fc-домен и шарнирная область Ig содержат аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21.

35. Выделенный слитый белок по п. 34, в котором Fc-домен и шарнирная область Ig представляют собой Fc-домен и шарнирную область человеческого IgG1.

36. Выделенный слитый белок по п. 35, в котором Fc-домен и шарнирная область Ig содержат аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13.

37. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-36, в котором Fc Ig, шарнирная область Ig и CH1-домен Ig происходят от одного иммуноглобулина.

38. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-37, причем данный слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO:

29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63.

39. Выделенный слитый белок по любому из п.п. 1-37, причем данный слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 33.

40. Выделенный слитый белок по п. 38 или 39, причем данный слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63.

41. Выделенный слитый белок по п. 38 или 39, причем данный слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 22.

42. Связывающий цитокин белок, содержащий два слитого белка по любому из п.п. 1-41, причем каждый слитый белок содержит внеклеточный домен цитокинового рецептора, причем данные два слитого белка ковалентно связаны вместе, и причем данные два внеклеточных домена вместе определяют сайт связывания для связывания цитокина.

43. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок по любому из п.п. 1-42.

44. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 43.

45. Вектор экспрессии по п. 44, причем данный вектор экспрессии представляет собой онколитический вирус.

46. Вектор экспрессии по п. 45, в котором онколитический вирус представляет собой аденовирус.

47. Вектор экспрессии по п. 46, в котором аденовирус представляет собой аденовирус типа 2 или 5.

48. Вектор экспрессии по п. 47, в котором аденовирус представляет собой аденовирус типа 5.

49. Вектор экспрессии по любому из п.п. 46-48, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая слитый белок, вставлена в сайт вставки E1b-19K, расположенный между сайтом начала E1b-19K и сайтом начала E1b-55K.

50. Вектор экспрессии по п. 49, в котором сайт вставки E1b-19K содержит делецию приблизительно 200 нуклеотидов, прилегающих к сайту начала E1b-19K.

51. Вектор экспрессии по п. 49 или 50, в котором сайт вставки E1b-19K содержит делецию 203 нуклеотидов, прилегающих к сайту начала E1b-19K.

52. Вектор экспрессии по любому из п.п. 49-51, в котором сайт вставки E1b-19K содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 1714-1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 52).

53. Вектор экспрессии по любому из п.п. 49-52, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая слитый белок, вставлена между нуклеотидами, соответствующими 1714 и 1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 52).

54. Вектор экспрессии по любому из п.п. 49-53, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая слитый белок, вставлена между CTGACCTC (SEQ ID NO: 53) и TCACCAGG (SEQ ID NO: 54).

55. Вектор экспрессии по любому из п.п. 49-54, в котором аденовирус содержит в направлении от 5' к 3' CTGACCTC (SEQ ID NO: 53), нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок, и TCACCAGG (SEQ ID NO: 54).

56. Вектор экспрессии по любому из п.п. 46-55, в котором аденовирус содержит делецию сайта связывания Rea3 или его функционального фрагмента.

57. Вектор экспрессии по п. 56, в котором аденовирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от приблизительно -300 до приблизительно -250 выше сайта инициации E1a.

58. Вектор экспрессии по п. 56 или 57, в котором аденовирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -305 до -255 выше сайта инициации E1a.

59. Вектор экспрессии по любому из п.п. 56-58, в котором аденовирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих 195-244 генома Ad5 (SEQ ID NO: 52).

60. Вектор экспрессии по любому из п.п. 56-59, в котором аденовирус содержит последовательность GGTGTTTTGG (SEQ ID NO:

55).

61. Вектор экспрессии по любому из п.п. 46-60, в котором аденовирус содержит делецию E3, причем делеция E3 расположена между сайтом окончания pVIII и сайтом начала Fiber.

62. Вектор экспрессии по п. 61, в котором делеция E3 расположена между сайтом окончания E3-10.5K и сайтом окончания E3-14.7K.

63. Вектор экспрессии по п. 61 или 62, в котором делеция E3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 3185, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2500, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3185, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2500, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500, от приблизительно 1500 до приблизительно 3185, от приблизительно 1500 до приблизительно 3000, от приблизительно 1500 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3185, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 2000 до приблизительно 2500, от приблизительно 2500 до приблизительно 3185, от приблизительно 2500 до приблизительно 3000 или от приблизительно 3000 до приблизительно 3185 нуклеотидов.

64. Вектор экспрессии по любому из п.п. 61-63, в котором делеция E3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 1551, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1551, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1500 до приблизительно 1551 нуклеотида, прилегающего к сайту окончания E3-10.5K.

65. Вектор экспрессии по любому из п.п. 61-64, в котором делеция E3 содержит делецию приблизительно 1050 нуклеотидов, прилежащих к сайту окончания E3-10.5K.

66. Вектор экспрессии по любому из п.п. 61-65, в котором делеция E3 содержит делецию 1064 нуклеотидов, прилегающих к сайту окончания E3-10.5K.

67. Вектор экспрессии по любому из п.п. 61-66, в котором делеция E3 содержит делецию, соответствующую делеции E3 dl309 Ad5.

68. Вектор экспрессии по любому из п.п. 61-67, в котором делеция E3 содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 29773-30836 генома Ad5 (SEQ ID NO: 52).

69. Вектор экспрессии по любому из п.п. 61-68, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая слитый белок, вставлена в делецию E3.

70. Вектор экспрессии по п. 69, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая слитый белок, вставлена между нуклеотидами, соответствующими 29773 и 30836 генома Ad5 (SEQ ID NO: 52).

71. Вектор экспрессии по п. 69 или 70, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая слитый белок, вставлена между CAGTATGA (SEQ ID NO: 56) и TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 57).

72. Вектор экспрессии по любому из п.п. 69-71, в котором аденовирус содержит в направлении от 5' к 3' CAGTATGA (SEQ ID NO: 56), нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок, и TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 57).

73. Вектор экспрессии по любому из п.п. 46-72, в котором аденовирус не содержит делецию функционального сайта связывания E2F.

74. Вектор экспрессии по любому из п.п. 46-73, в котором аденовирус содержит делецию функционального сайта связывания E2F.

75. Вектор экспрессии по любому из п.п. 46-74, в котором аденовирус содержит:

- (i) сайт начала E1b-19K и E1b-55K;
- (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок по любому из п.п. 1-42, вставленный в сайт вставки E1b-

19K, причем данный сайт вставки расположен между сайтом начала E1b-19K и сайтом начала E1b-55K; и

(ii) модифицированную регуляторную последовательность E1a, в которой удалены по меньшей мере один сайт связывания Rea3 или его функциональная часть.

76. Вектор экспрессии по любому из п.п. 45-75, в котором онколитический вирус селективно реплицируется в гиперпролиферативной клетке.

77. Вектор экспрессии по любому из п.п. 45-76, в котором онколитический вирус селективно экспрессирует слитый белок в гиперпролиферативной клетке.

78. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по любому из п.п. 44-77.

79. Способ получения слитого белка, включающий:

(a) выращивание клетки-хозяина по п. 78 в условиях, приводящих к экспрессии слитого белка; и

(b) очистку слитого белка.

80. Фармацевтическая композиция, содержащая: (i) слитый белок по любому из п.п. 1-42 или вектор экспрессии по любому из п.п. 44-77; и (ii) по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

81. Способ экспрессии слитого белка в клетке-мишени, включающий подвергание клетки воздействию эффективного количества вектора экспрессии по любому из п.п. 44-77 для экспрессии слитого белка.

82. Способ по п. 81, в котором слитый белок посттрансляционно расщепляется на две полипептидные цепи.

83. Способ ингибирования пролиферации опухолевых клеток, включающий подвергание клетки воздействию эффективного количества димерного слитого белка по п. 42 для ингибирования пролиферации опухолевых клеток.

84. Способ ингибирования пролиферации опухолевых клеток, включающий подвергание клетки воздействию эффективного количества слитого белка по любому из п.п. 1-41 для ингибирования пролиферации опухолевых клеток.

85. Способ ингибирования роста опухоли у нуждающегося в

этом субъекта, причем данный способ включает введение субъекту эффективного количества димерного слитого белка по п. 42 для ингибирования роста опухоли.

86. Способ ингибирования роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта, причем данный способ включает введение субъекту эффективного количества слитого белка по любому из п.п. 1-41 для ингибирования роста опухоли.

87. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, причем данный способ включает введение эффективного количества димерного слитого белка по п. 42 субъекту.

88. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, причем данный способ включает введение эффективного количества слитого белка по любому из п.п. 1-41 субъекту.

89. Способ снижения активности TGF β в клетке, включающий подвергание клетки воздействию эффективного количества димерного слитого белка по п. 42 для снижения активности TGF β .

90. Способ снижения активности TGF β в клетке, включающий подвергание клетки воздействию эффективного количества слитого белка по любому из п.п. 1-41 для снижения активности TGF β .

91. Способ лечения воспалительного состояния у нуждающегося в этом субъекта, причем данный способ включает введение эффективного количества димерного слитого белка по п. 42 субъекту.

92. Способ лечения воспалительного состояния у нуждающегося в этом субъекта, причем данный способ включает введение эффективного количества слитого белка по любому из п.п. 1-41 субъекту.

93. Способ ингибирования пролиферации опухолевых клеток, включающий подвергание клетки воздействию эффективного количества вектора экспрессии по любому из п.п. 44-77 для ингибирования пролиферации опухолевых клеток.

94. Способ ингибирования роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта, причем данный способ включает введение субъекту эффективного количества вектора экспрессии по любому из п.п. 44-77 для ингибирования роста опухоли.

95. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, причем данный способ включает введение эффективного количества вектора экспрессии по любому из п.п. 44-77 субъекту.

96. Способ снижения активности $TGF\beta$ в клетке, содержащий подвергание клетки воздействию эффективного количества вектора экспрессии по любому из п.п. 44-77 для снижения активности $TGF\beta$.

97. Способ лечения воспалительного состояния у нуждающегося в этом субъекта, причем данный способ включает введение эффективного количества вектора экспрессии по любому из п.п. 44-77 субъекту.

98. Способ лечения инфекции у нуждающегося в этом субъекта, причем данный способ включает введение эффективного количества вектора экспрессии по любому из п.п. 44-77 субъекту.

99. Способ по любому из п.п. 87, 88 или 95, в котором рак выбирают из меланомы, плоскоклеточной карциномы кожи, базальноклеточной карциномы, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака анального канала, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого, мезотелиомы, мелкоклеточного рака легкого, почечно-клеточной карциномы, рака предстательной железы, гастроэзофагеального рака, колоректального рака, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака яичника, рака печени, гепатоклеточной карциномы, холангиокарциномы, рака головного мозга и центральной нервной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы (например, карциномы паращитовидной железы), рака эндометрия, нейроэндокринного рака, лимфомы (например, ходжкинской и неходжкинской), лейкоза, карциномы из клеток Меркеля, гастроинтестинальных стромальных опухолей, множественной миеломы, рака матки, саркомы, рака почки, рака глаза, рака поджелудочной железы и герминогенного рака (например, герминогенного рака яичника).

100. Способ по любому из п.п. 87, 88 или 95, в котором рак выбирают из лейкоза, рака молочной железы, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака эндометрия, рака яичника, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака головного мозга, рака кожи, колоректального рака, рака желудка, рака головы и шеи

и лейкоза.

101. Способ по п. 100, в котором рак выбирают из рака кожи, рака головы и шеи и рака легкого.

102. Способ по любому из п.п. 85-88, 91, 92, 94, 95 или 97-101, в котором вектор экспрессии вводят в комбинации с одной или несколькими терапиями, выбранными из хирургии, лучевой терапии, химиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии и виро-терапии.

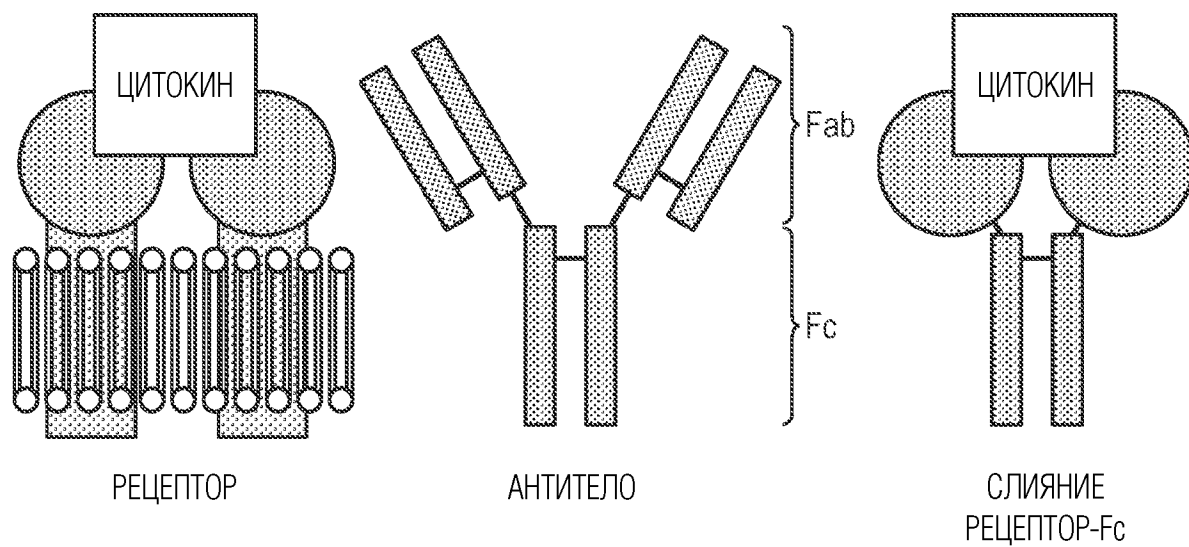
103. Способ по любому из п.п. 85-88, 91, 92, 94, 95 или 97-101, в котором вектор экспрессии вводят в комбинации с лимфоцитами, например Т-клетками, например Т-клетками с CAR.

104. Способ по п. 103, в котором лимфоциты представляют собой Т-клетки.

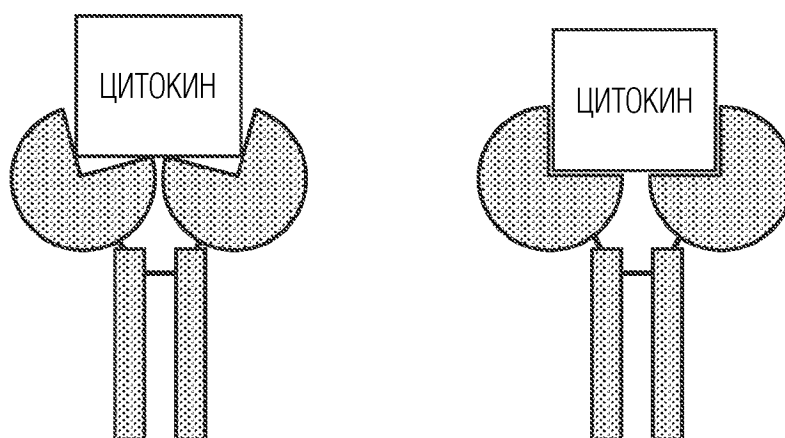
105. Способ по п. 104, в котором Т-клетки представляют собой Т-клетки с CAR.

106. Способ по любому из п.п. 85-88, 91, 92, 94, 95 или 97-101, в котором субъект является человеком или животным.

107. Способ по п. 106, в котором субъект является ребенком.



ФИГ. 1А



ФИГ. 1В

Человеческие домены CH1

```

IgA1 PKVFPLS.....LCSTQPDGNV.....VIACLVQgf.....fPQEPLSVTWSESGQgv.....taRNFPPSQDASGDL.....YTTSSQLTLPA.....TQCLAGKSVTCHVKH.....---YTNPSQDVT
IgA2 PKVFPLS.....LDSTPDGNV.....VVACLVQgf.....fPQEPLSVTWSESGQnv.....taRNFPPSQDASGDL.....YTTSSQLTLPA.....TQCPDGKSVTCHVKH.....---YTNPSQDVT
IgD PDVFPLIs.....GCRHFKDNSFV.....VLACLITGy.....HPTSVTVTWYMGTSq.....pQRTFPEIQRRDSY.....YMTSSQLSTP.....LQQWRQGEYKCVQH.....---TASKSKKEIF
IgE PSVFPLTr.....cCKNIPSNATSV.....TLGCLATGy.....FPEPVMVTWDTGSLn.....GTTMTLPATTLTLsg...hYATISLLTVSG.....--AWAKQMFTCRVAht...pSSTDWVDNKTFS
IgG1 PSVFPLA.....PSSKSTSGGTA.....ALGCLVKDy.....FPEPVTVSWNSGALts.....gVHTFPAVLQSSGL.....YSLSSVVTVPs.....-SSLGTQTYICNVNH.....KPSNTKVDKKEVE
IgG2 PSVFPLA.....PCSRSTSESTA.....ALGCLVKDy.....FPEPVTVSWNSGALts.....gVHTFPAVLQSSGL.....YSLSSVVTVPs.....-SNFCTQTYTCNVDH.....KPSNTKVDKIVE
IgG3 PSVFPLA.....PCSRSTSGGTA.....ALGCLVKDy.....FPEPVTVSWNSGALts.....gVHTFPAVLQSSGL.....YSLSSVVTVPs.....-SSLGTQTYTCNVNH.....KPSNTKVDKIVE
IgG4 PSVFPLA.....PCSRSTSESTA.....ALGCLVKDy.....FPEPVTVSWNSGALts.....gVHTFPAVLQSSGL.....YSLSSVVTVPs.....-SSLGTQTYTCNVNH.....KPSNTKVDKIVE
IgM PTLFPLVs.....CENSEPBDTSSV.....AVGCLAQDf.....LPDSITLSWKYKNN.....SDISSTRGFPSVLRg..gkYAATSQVLLPsk...dVMQGTDEHVVCVQH.....--PNCNKEKNVP

```

Человеческие домены CH2

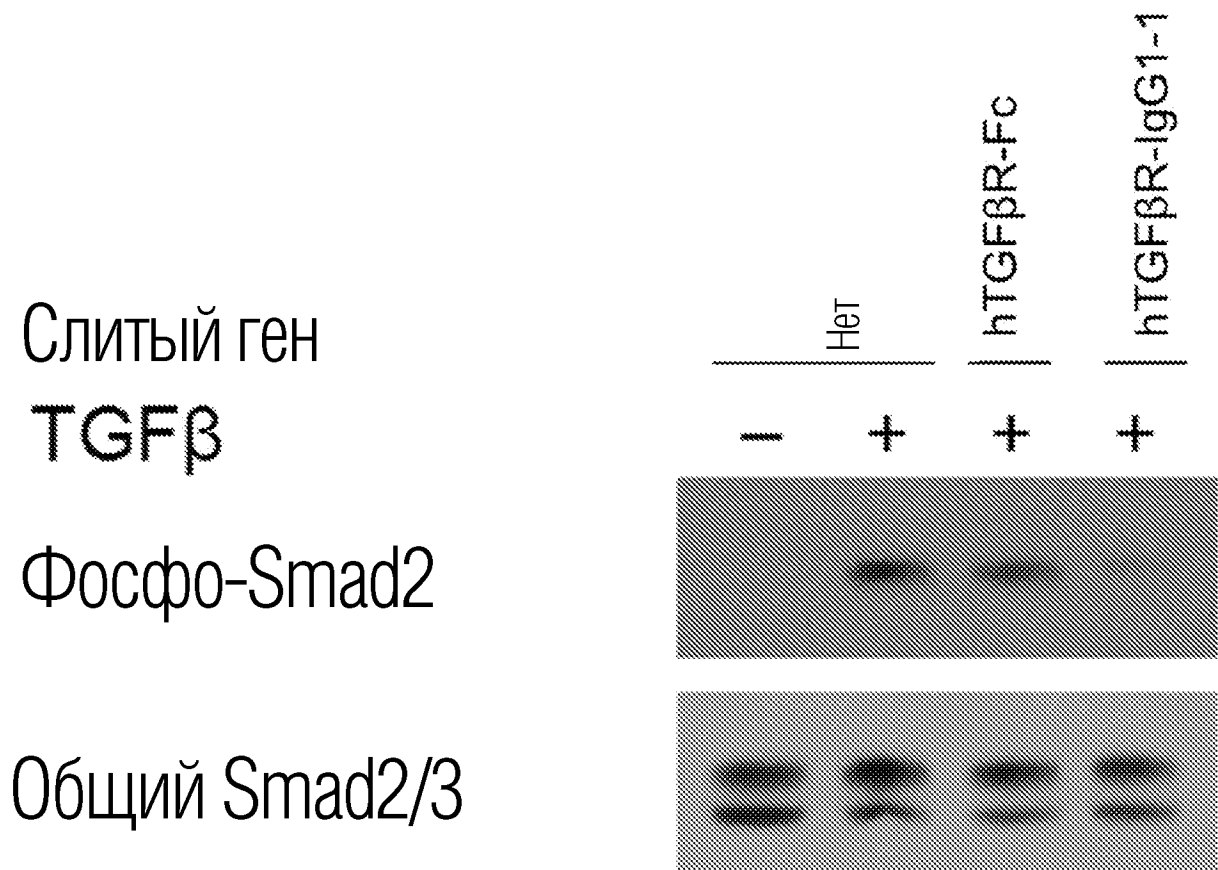
```

IgA1 PRLSLHRp.....ALEDLLLGSEA.....NLCTLTGL.....rDASGVFTTWPSSG.....KSAVQGPPERDLCg...cYSVSSVLPGCA.....EPWNHGKTFCTAAY.....PESKTELTATLS
IgA2 PRLSLHRp.....ALEDLLLGSEA.....NLCTLTGL.....rDASGATFTTWPSSG.....KSAVQGPPERDLCg...cYSVSSVLPGCA.....QFWNHGETFTCTAAH.....PELKTPLTANIT
IgD PAVQDL-.....---WLRDKA-.....TFTCFVVGs.....DLKDAHLTWEVAGKvpt...ggvEEGLLERHSNGS-.....QSQSRLTLPR.....SLWNAGTSVTCTLNH.....--PSLPPQRIMA
IgE PTVKIL-.....-QSSCDGGGHFpp..tiQLLCLVSGy.....TPGTINITWLEDGQvm.....dvDLSTASTTQEGEL.....ASTQSELTLSQ.....KHWLSDRTYTCQVTYq...GHTFEDSTKKCA
IgG1 PSVFLFPp.....kPKDTLMISRTp.....EVTCTVVDvs...hEDPEVKFNWYVDGv...hnAKTKPREEQYNST.....YRVVSVLTVLH.....QDWLNGKEYKCKVSN.....KALPAPIEKTIS
IgG2 PSVFLFPp.....kPKDTLMISRTp.....EVTCTVVDvs...hEDPEVQFNWYVDGv...VHNAKTKPREEQFns...tFRVSVLTVVH.....QDWLNGKEYKCKVSN.....KGLPAPIEKTIS
IgG3 PSVFLFPp.....kPKDTLMISRTp.....EVTCTVVDvs...hEDPEVQFKWYVDGv...hnAKTKPREEQYNST.....FRVSVLTVLH.....QDWLNGKEYKCKVSN.....KALPAPIEKTIS
IgG4 PSVFLFPp.....kPKDTLMISRTp.....EVTCTVVDvs...qEDPEVQFNWYVDGv...VHNAKTKPREEQFns...tYRVVSVLTVLH.....QDWLNGKEYKCKVSN.....KGLPSSIETIS
IgM PKVSVFV.....FPRDGFFGNPRk...sKLICQATGf.....SPRQIQVSWLREGKqvgsg.vttDQVQAEAKESGPTT.....YKVTSTLTIKE.....SDWLQSQSMFTCRVDH.....---RGLTFQQNAS

```

ФИГ. 2

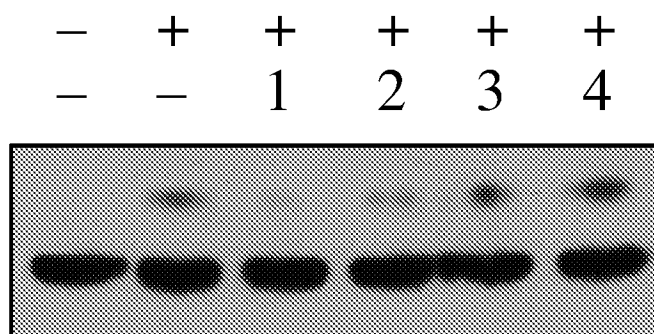
ФИГ. 3

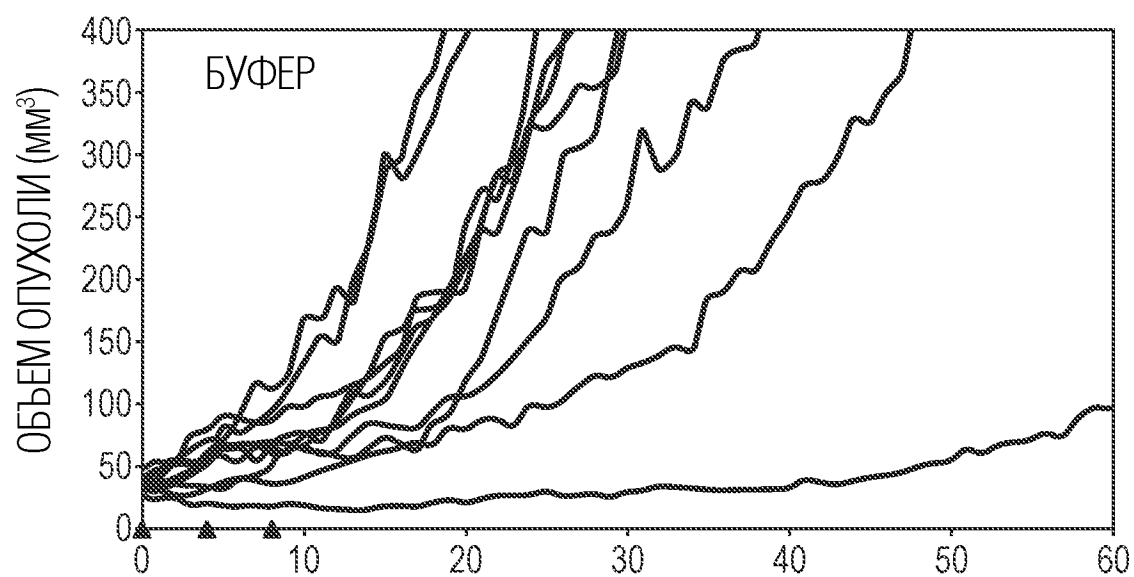


ФИГ. 4

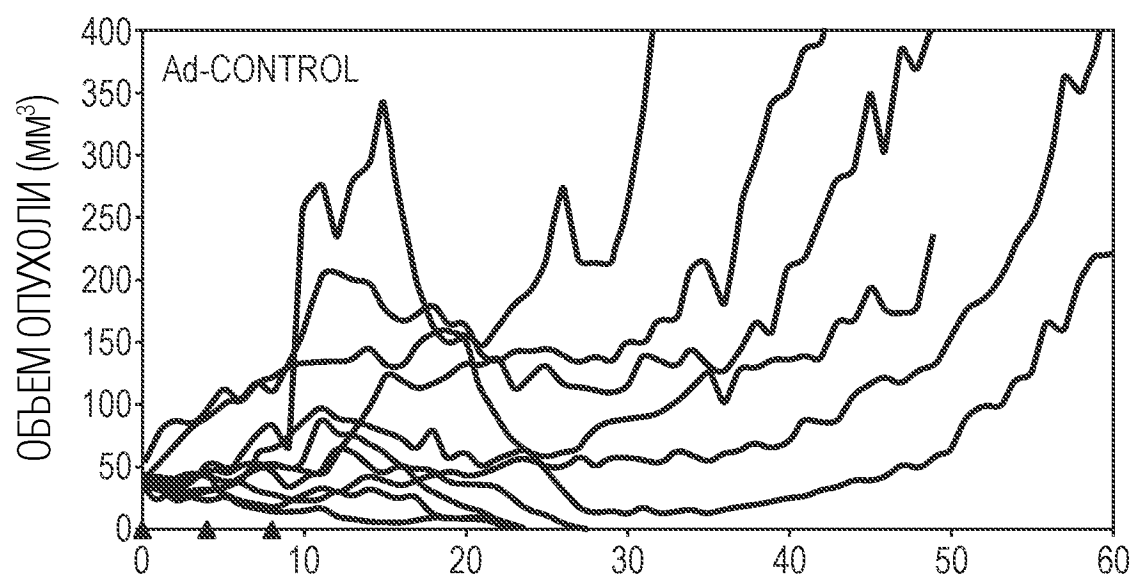
TGF β
Слияние TGF β R-IgG

Фосфо-Smad2
 β -актин

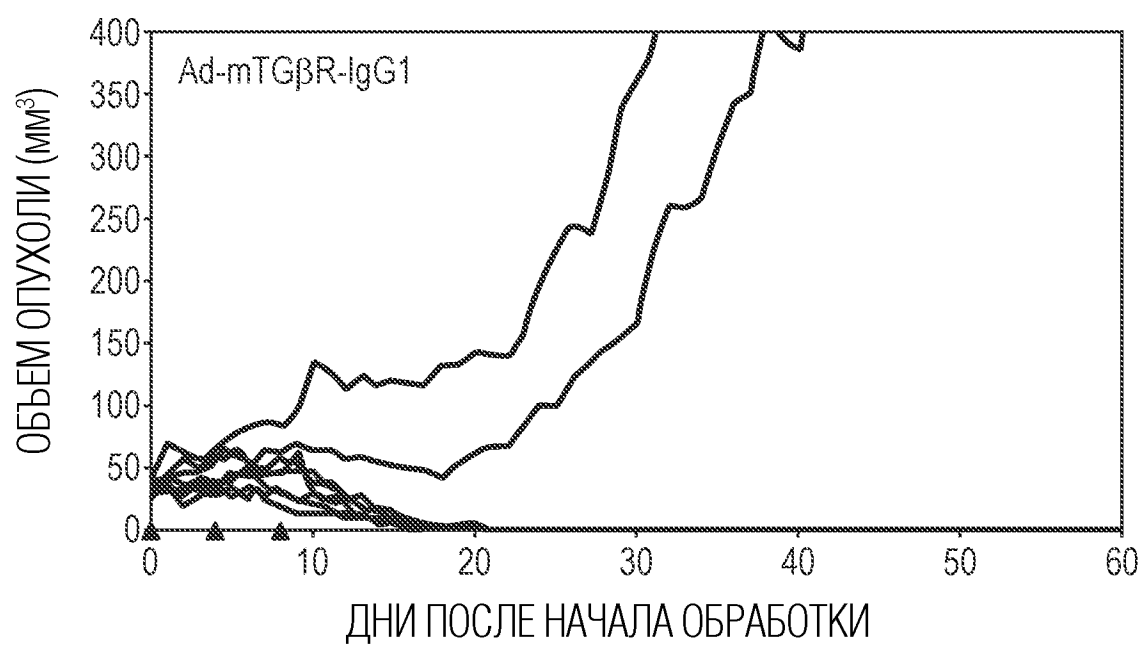




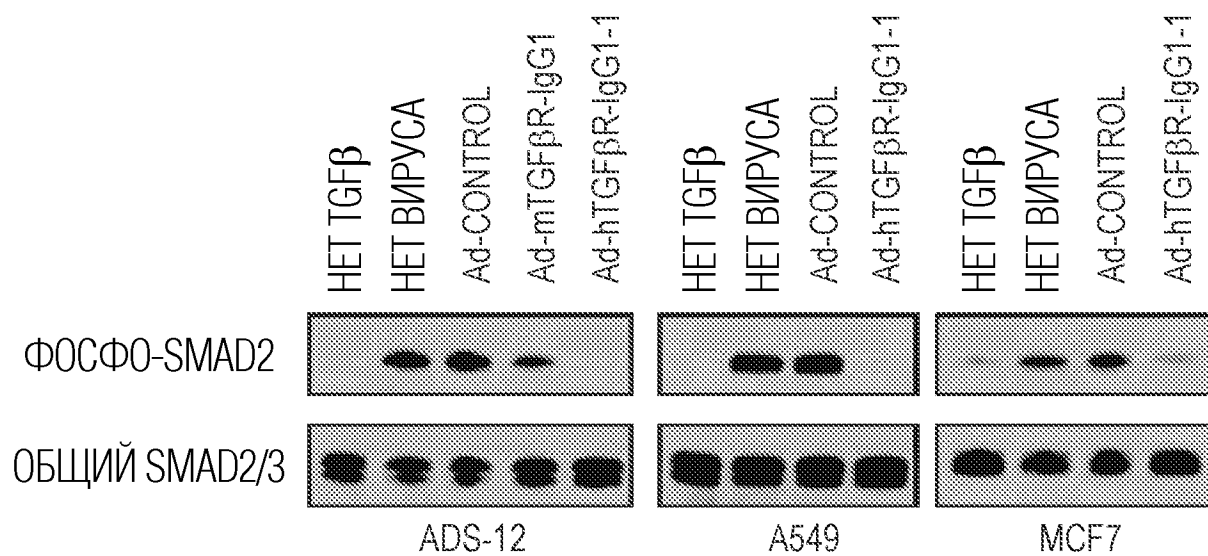
ФИГ. 5А



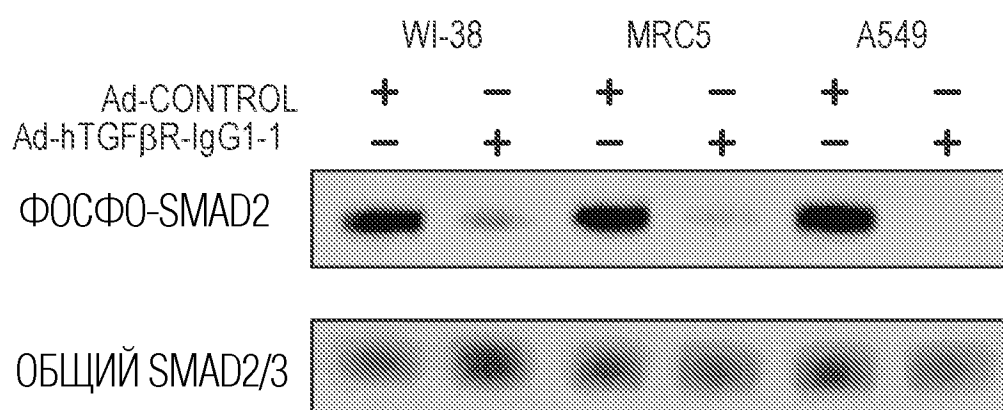
ФИГ. 5В



ФИГ. 5С



ФИГ. 6А



ФИГ. 6В