

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090838** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.28

(22) Дата подачи заявки
2018.09.27

(51) Int. Cl. **C07K 19/00** (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СЛИТЫЕ БЕЛКИ

(31) **62/564,145**

(32) **2017.09.27**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/053197**

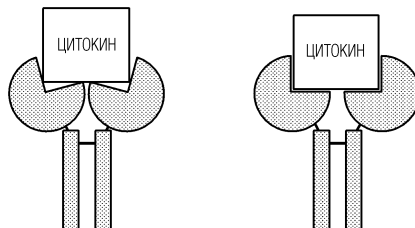
(87) **WO 2019/067770 2019.04.04**

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

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

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

(57) Предложен слитый белок, например слитый белок цитокинового рецептора, например ловушка IL-10, с новой линкерной последовательностью, позволяющей оптимально функционировать слитому белку, например позволяющей части цитокинового рецептора слитого белка цитокинового рецептора оптимально связываться со своим цитокином-мишенью. Слитый белок или вектор экспрессии, кодирующий слитые белки, может применяться для лечения клеточно-пролиферативных заболеваний и нарушений, в том числе некоторых форм рака и воспалительных нарушений.



A1

202090838

202090838

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562570ЕА/17

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СЛИТЫЕ БЕЛКИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущества и приоритет предварительной заявки на патент США 62/564,145, поданной 27 сентября 2017 года, которая настоящим полностью включена в настоящий документ посредством отсылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Изобретение относится к области молекулярной биологии, в частности, иммунологии и слитых белков, например, слитых белков цитокиновых рецепторов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Цитокины представляют собой небольшие секретируемые клеточные сигнальные белки, которые обладают разнообразными активностями, включающими регуляцию роста и дифференцировки клеток и модуляцию иммунной функции. Цитокины, цитокиновые рецепторы и некоторые другие иммуномодулирующие белки применяли в качестве терапевтических средств для лечения различных заболеваний. Однако введение таких белков, например, подкожным или внутрисосудистым путем, может приводить к неправильной клеточной и внеклеточной локализации, что ограничивает терапевтическую активность и/или повышает риск токсического действия.

[0004] IL-10 является гомодимерным цитокином с иммунорегуляторными свойствами, продуцируемым клетками, включая активированные Th2-клетки, В-клетки, кератиноциты, моноциты и макрофаги (Moore et al. (1993) ANNU. REV. IMMUNOL. 11:165). IL-10 ингибирует активацию и эффекторные функции множества клеток, включая Т-клетки, моноциты и макрофаги. В частности, IL-10 ингибирует синтез цитокинов, включая синтез IL-1, IFN- γ и ФНО, такими клетками, как Th1-клетки, NK-клетки, моноциты и макрофаги (Fiorentino et al. (1989) J. EXP. MED. 170:2081-2095; Fiorentino et al. (1991) J. IMMUNOL. 146:3444; Hsu et al. (1992) INT. IMMUNOL. 4:563; Hsu et al. (1992) INT. IMMUNOL. 4:563; D'Andrea et al. (1993) J. EXP. MED. 178:1041; de Waal Malefyt et al. (1991) J. EXP. MED. 174:915; Fiorentino et al. (1991) J. IMMUNOL. 147:3815). Множество патогенов, включая внутриклеточные патогены, вызывают продукцию IL-10, чтобы замедлить или приостановить эффективное удаление патогена иммунной системой (Moore et al. (1993), выше).

[0005] Несмотря на успехи, достигнутые в настоящее время в лечении опосредованных IL-10 нарушений, существует потребность в улучшенной терапии для лечения таких нарушений.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Изобретение частично основано на открытии линкерных последовательностей, которые улучшают функцию слитых белков, например, слитых белков цитокиновых рецепторов, например, слитых белков рецептора IL-10 (IL-10R), например, слитых белков альфа-субъединицы рецептора IL-10 (IL-10RA), например,

ловушек IL-10. Линкерные последовательности могут позволять лигандсвязывающей части слитого белка (например, цитокинового рецептора) 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 обеспечивать сайт расщепления, который позволяет высвобождать компонент слитого белка. Например, линкерные последовательности могут обеспечивать достаточную гибкость, чтобы позволить лигандсвязывающему домену цитокинового рецептора принимать нативную конформацию в рамках слитого белка и минимизировать потенциальную иммуногенность слитого белка для применения в качестве терапевтического средства.

[0007] В одном аспекте изобретения предложен выделенный слитый белок, который включает, например, в ориентации от N- к С-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; шарнирную область иммуноглобулина (Ig); и Fc-домен иммуноглобулина (Ig). В некоторых вариантах осуществления линкер включает от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления слитый белок включает часть рецептора IL-10, например, человеческого рецептора IL-10, например, IL-10RA.

[0008] В другом аспекте изобретения предложен выделенный слитый белок, который включает, в ориентации от N- к С-концу: растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора; аминокислотный линкер; шарнирную область иммуноглобулина (Ig); и Fc-домен иммуноглобулина (Ig); где линкер включает от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления цитокиновый рецептор является рецептором IL-10, например, человеческим рецептором IL-10, например, IL-10RA.

[0009] В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих слитых белков аминокислотный линкер может включить, 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.

[0010] В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих слитых белков последовательность аминокислотного линкера получена из эндогенного белка человека, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM, альбумина или

казеина. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный линкер включает С-концевую часть CH1 домена иммуноглобулина (Ig), например, CH1 домен IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный линкер включает 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: 53, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный линкер включает С-концевую часть CH1 домена IgG1, например, аминокислотный линкер включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 57, например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57.

[0011] В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих слитых белков аминокислотный линкер включает последовательность, полученную из цитокина, сигнальной молекулы, иммуномодулирующего белка или пептида или биологически активного пептида.

[0012] В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих слитых белков аминокислотный линкер включает сайт расщепления, например, сайт протеолитического расщепления, например, сайт протеолитического расщепления, расщепляемый протеазой, присутствующей в эндоплазматическом ретикулуме или аппарате Гольджи эукариотической клетки. В некоторых вариантах осуществления сайт протеолитического расщепления является сайтом расщепления фурином, например, сайтом расщепления фурином, включающим последовательность RX1X2R (SEQ ID NO: 50), где X1 является любой аминокислотой, а X2 является Lys или Arg, например, сайтом расщепления фурином, включающим последовательность RAKR (SEQ ID NO: 51). В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих слитых белков аминокислотный линкер протеолитически стабилен в организме млекопитающего или в растении.

[0013] В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих слитых белков растворимая часть внеклеточного домена цитокинового рецептора является растворимой частью внеклеточного домена человеческого IL-10R, например, IL-10RA. Например, в некоторых вариантах осуществления растворимая часть внеклеточного домена цитокинового рецептора включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или аминокислотные остатки 22-229 из SEQ ID NO: 12.

[0014] В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих слитых белков слитый белок включает одно или более из IL-10, TGF- β , рецептора TGF β , например, рецептора TGF β II типа (T β RII), CD80, CD19, CD20, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12B/p40, IL-23A/p19, IL27A/p28, IL-27B/EBI3, IL-15, CD154, CD70, ФНО-альфа, CD86, CD137, CD137L, BORIS/CTCFL, FGF, ICAM, IL-24, ГМ-КСФ, MAGE, NY-ESO-1, ангиостатина, эндостатина, ацетилхолина, интерферона-гамма, DKK1/Wnt, p53, Ох40L, ГМ-КСФ, слитого белка рецептора IL-15, GITRL, CD40L, CD70,

секретируемого флагеллина, IL-12, тимидинкиназы, тяжелой цепи или легкой цепи антитела против PD-1, тяжелой цепи или легкой цепи антитела против PD-L1, и тяжелой цепи или легкой цепи антитела против CTLA-4 или их функционального фрагмента.

[0015] В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих слитых белков шарнирная область Ig выбрана из шарнирной области IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM, и Fc-домен Ig выбран из Fc-домена IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig и Fc-домен вместе включают 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 получены из одного иммуноглобулина.

[0016] В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих слитых белков слитый белок включает 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: 55, SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления слитый белок включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

[0017] В некоторых вариантах осуществления любого из предыдущих слитых белков слитый белок включает аминокислотную последовательность, обладающую больше чем 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности 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: 55, SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 58.

[0018] В другом аспекте изобретения предложен димерный цитокинсвязывающий белок, включающий два любых из предыдущих слитых белков, ковалентно связанных друг с другом, где каждый слитый белок включает внеклеточный домен цитокинового рецептора, и где два внеклеточных домена вместе определяют связывающий сайт для цитокина.

[0019] В другом аспекте изобретения предложена нуклеиновая кислота, включающая нуклеотидную последовательность, кодирующую любой из предыдущих слитых белков.

[0020] В другом аспекте изобретения предложен вектор экспрессии, включающий любую из предыдущих нуклеиновых кислот.

[0021] В другом аспекте изобретения предложена клетка-хозяина, включающая любой из предыдущих векторов экспрессии. В другом аспекте изобретения предложен способ получения слитого белка, включающий выращивание клетки-хозяина в условиях,

позволяющих экспрессировать слитый белок, и очистку слитого белка. В другом аспекте изобретения предложен способ экспрессии слитого белка в клетке-мишени, включающий контакт клетки с эффективным количеством любого из предыдущих векторов экспрессии. В некоторых вариантах осуществления слитый белок расщепляется посттрансляционно с образованием двух полипептидных цепей.

[0022] В другом аспекте любой из предыдущих слитых белков или векторов экспрессии может применяться, например, для снижения цитокиновой активности у субъекта, осуществляя, таким образом, лечение различных медицинских показаний, которые опосредованы цитокином, например, IL-10. В другом аспекте любой из предыдущих слитых белков или векторов экспрессии может применяться 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 быть, например, животным, например, млекопитающим, например, человеком, например, пациентом педиатрического профиля. Например, при введении субъекту-человеку, имеющему рак, слитые белки или векторы экспрессии ингибируют или уменьшают рост опухоли, или уменьшают опухолевую нагрузку у субъекта.

[0023] 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, рака толстой и прямой кишки, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака яичника, рака печени, гепатоцеллюлярной 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, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы), лейкоза, карциномы из клеток Меркеля, желудочно-кишечных 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, рака толстой и прямой кишки, рака желудка, рака головы и шеи и лейкоза.

[0024] В некоторых вариантах осуществления слитый белок или вектор экспрессии применяют в комбинации с одной или более терапиями, выбранными из хирургии, лучевой терапии, химиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии и виро-терапии. В некоторых вариантах осуществления слитый белок или вектор экспрессии применяют в комбинации с лимфоцитом, например, Т-клеткой, например, CAR Т-клеткой.

[0025] Любой из предыдущих слитых белков или векторов экспрессии также может

применяться для лечения воспалительного заболевания или инфекции у нуждающегося в этом субъекта.

[0026] Эти и другие аспекты и преимущества изобретения проиллюстрированы следующими фигурами, подробным описанием и формулой изобретения.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0027] Изобретение может быть в более полной мере понято при обращении к следующим чертежам.

[0028] На **ФИГУРЕ 1А** показана схема димерного цитокинового рецептора на поверхности клетки (слева), антитела (в середине) и рецептор-Fc слитой конструкции, которая оптимально связывает цитокин-мишень (справа). На **ФИГУРЕ 1В** показана рецептор-Fc слитая конструкция, например, цитокиновая ловушка, оптимальное связывание которой с цитокином-мишенью стерически затруднено (слева), или которая принимает оптимальную связывающую конфигурацию (справа).

[0029] На **ФИГУРЕ 2** показано выравнивание аминокислотных последовательностей доменов CH1 (сверху) и доменов CH2 (снизу) IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM человека.

[0030] На **ФИГУРЕ 3** показан Вестерн-блот фосфорилированного Stat3 после обработки репортерных клеток IL-10 и/или IL-10RA слитыми белками IL-10R-IgG и IL-10R-Fc, как указано. Общий Stat3 использовали в качестве контроля нанесения. Активность IL-10 была заметно снижена при воздействии IL-10R-IgG по сравнению с IL-10R-Fc.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0031] В изобретении предложен рекомбинантный слитый белок для применения при лечении различных заболеваний, например, при ингибировании пролиферации опухолевой клетки, ингибировании роста опухоли, лечении рака, лечении воспалительного состояния или лечении инфекции у субъекта. Примерные 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; шарнирную область иммуноглобулина (Ig); или Fc-домен иммуноглобулина (Ig). Предполагается, что первая и вторая части могут быть частями одного и того же белка или частями разных белков, и, даже если они являются частями одного белка, первая и вторая части могут быть разными частями одного белка. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислотных остатков. Примерные слитые белки согласно изобретению включают цитокиновые ловушки.

[0032] Цитокиновая ловушка, например, ловушка IL-10, является молекулой, содержащей растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора, например, рецептора IL-10 (IL-10R), например, альфа-субъединицу рецептора IL-10 (IL-

10RA), предназначенной для связывания или иного блокирования цитокина-мишени. В цитокиновой ловушке внеклеточный домен цитокинового рецептора может быть слит с шарнирной областью иммуноглобулина (Ig) и Fc-доменом иммуноглобулина (Ig), что может обеспечивать, например, повышенную стабильность, Fc-эффекторные функции и/или мультимеризацию, например, димеризацию. Димеризация, которую обеспечивает слияние шарнирной области Ig и Fc-домена Ig, особенно выгодна для цитокиновых рецепторов, которые существуют в виде димерных рецепторных комплексов на клеточной поверхности, таких как, например, T β RII.

[0033] Обычные цитокиновые ловушки, например, ловушки IL-10, содержат две полипептидных цепи, причем каждая полипептидная цепь включает растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора, слитую с шарнирной областью Ig и Fc-доменом Ig. Растворимая часть внеклеточного домена цитокинового рецептора, как правило, сливают непосредственно с шарнирной областью Ig без какой-либо промежуточной последовательности. Две полипептидных цепи ковалентно связаны дисульфидными связями между остатками цистеина в каждой шарнирной области Ig. Каждая полипептидная цепь обеспечивает растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора, например, IL-10R, например, IL-10RA, и две растворимых части внеклеточного домена цитокинового рецептора вместе определяют связывающий сайт для цитокина. Схематическое изображение димерного цитокинового рецептора, молекулы иммуноглобулина (антитела) и димерного белка, включающего два ковалентно связанных слитых белка, каждый из которых включает растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора, слитого с шарнирной областью Ig и Fc-доменом Ig, представлено на **ФИГУРЕ 1A**.

[0034] Изобретение частично основано на открытии, что обычные цитокиновые ловушки, включающие слитый белок из растворимой части внеклеточного домена цитокинового рецептора, слитой с шарнирной областью Ig и Fc-доменом Ig, например, ловушки IL-10, не связываются оптимально со своим цитокином-мишенью. Например, обычная ловушка IL-10 не обеспечивает достаточной гибкости между двумя IL-10 лигандсвязывающими доменами, чтобы два IL-10 лигандсвязывающих домена могли объединяться в оптимальной конфигурации с определением IL-10-связывающего сайта.

[0035] Таким образом, в одном аспекте изобретения предложен выделенный слитый белок, включающий в ориентации от N- к С-концу: растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора; аминокислотный линкер; шарнирную область иммуноглобулина (Ig); и Fc-домен иммуноглобулина (Ig); где линкер включает от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислотных остатков. Линкерная последовательность позволяет, например, связывающему домену во внеклеточном домене цитокинового рецептора оптимально связываться со своим цитокином-мишенью. Это особенно важно, когда цитокинсвязывающий белок является димером, включающим два из предыдущих слитых белков, которые вместе определяют связывающий сайт для связывания цитокина-мишени. Без линкера образованием оптимального связывающего

сайта двумя связывающими доменами может быть стерически затруднено (**ФИГУРА 1В**).
Различные признаки и аспекты изобретения более подробно обсуждаются ниже.

I. Слитые белки

[0036] Примерные слитые белки могут включать: 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). Например, раскрытый слитый белок может включать, в ориентации от N- к C-концу: растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора; аминокислотный линкер; шарнирную область иммуноглобулина (Ig); и Fc-домен иммуноглобулина (Ig); где линкер включает от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислотных остатков.

[0037] Примерные цитокины включают IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-3, IL-5, ГМ-КСФ, IL-6, IL-11, Г-КСФ, IL-12, LIF, OSM, IL-10, IL-20, IL-14, IL-16, IL-17, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , CD154, LT- β , ФНО- α , ФНО- β , 4-1BBL, APRIL, CD70, CD153, CD178, GITRL, LIGHT, OX40L, TALL-1, TRAIL, TWEAK, TRANCE, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, Еро, Тро, Flt-3L, SCF, М-КСФ и MSP.

[0038] При использовании в настоящем документе "иммуномодулирующий" белок относится к белку, модулирующему функцию иммунной системы субъекта. Иммуномодулирующие белки могут, например, модулировать функцию, например, В-клеток, Т-клеток, и/или продукцию антител. Примерные иммуномодулирующие белки включают ингибиторы контрольных точек. Примерные иммуномодулирующие белки могут включать, например, CTLA-4, CD70, IL-2, CD40L, OX40L, IL-12, IL-7, PD-1 или PD-L1 или любой белок, модулирующий их активность. Другие примерные иммуномодулирующие белки могут включать антитело против PD-1 или антитело против PD-L1.

[0039] При использовании в настоящем документе "растворимая часть внеклеточного домена цитокинового рецептора" относится к любому внеклеточному домену цитокинового рецептора или фрагменту внеклеточного домена цитокинового рецептора, который способен связываться с цитокином-мишенью. Следует понимать, что растворимая часть внеклеточного домена цитокинового рецептора также предусматривает части внеклеточного домена, которые включают связывающий домен, который отдельно или в комбинации со вторым связывающим доменом (например, в случае димерных слитых белков) способен к связыванию с цитокином-мишенью.

[0040] Примерные цитокиновые рецепторы включают цитокиновые рецепторы I типа (например, рецепторы ГМ-КСФ, рецепторы Г-КСФ, рецепторы IL I типа, рецепторы Еро, рецепторы LIF, рецепторы CNTF или рецепторы ТРО), цитокиновые рецепторы II типа (например, рецепторы IL-10, рецепторы IFN-альфа (например, IFNAR1 или IFNAR2), рецепторы IFN-бета, рецепторы IFN-гамма (например, IFNGR1 или IFNGR2),

хемокиновые рецепторы (например, хемокиновые рецепторы CC, хемокиновые рецепторы CXC, хемокиновые рецепторы CX3C или хемокиновые рецепторы XC), рецепторы суперсемейства фактора некроза опухоли (TNFR; например, TNFRSF5/CD40, TNFRSF8/CD30, TNFRSF7/CD27, TNFRSF1A/TNFR1/CD120a, или TNFRSF1B/TNFR2/CD120b), рецепторы супесемейства TGF β (например, рецептор TGF β I типа или рецептор TGF β II типа) или рецепторы суперсемейства иммуноглобулина (Ig) (например, рецептор интерлейкина-1, CSF-1R, PDGFR (например, PDGFRA или PDGFRB) или SCFR). Предпочтительные цитокиновые рецепторы включают димерные цитокиновые рецепторы, например, рецепторы супесемейства TGF β , например, человеческий рецептор TGF β II типа (T β RII). В некоторых вариантах осуществления растворимая часть внеклеточного домена цитокинового рецептора является растворимой частью внеклеточного домена человеческого IL-10R, например, человеческого IL-10RA, например, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или аминокислотную последовательность, обладающую больше чем 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 12, и/или их фрагмент, включающий связывающий домен, который связывается с IL-10.

[0041] Растворимая часть внеклеточного домена цитокинового рецептора сохраняет свою способность связывать свой нативный лиганд. В некоторых вариантах осуществления растворимая часть внеклеточного домена сохраняет по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% связывающей активности по отношению к своему нативному лиганду по сравнению с полноразмерным цитокиновым рецептором.

[0042] В некоторых вариантах осуществления слитый белок может включать, например, одно или более из T β RII, TGF- β , CD80, CD19, CD20, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12B/p40, IL-23A/p19, IL-27A/p28, IL-27B/EBI3, IL-15, CD154, CD70, ФНО-альфа, CD86, CD137, CD137L, BORIS/CTCFL, FGF, ICAM, IL-24, ГМ-КСФ, MAGE, NY-ESO-1, ангиостатина, эндостатина, ацетилхолина, интерферона, DKK1/Wnt, p53, Ох40L, ГМ-КСФ, слитого белка рецептора IL-15, GITRL, CD40L, CD70, секретируемого флагеллина, IL-12, тимидинкиназы, тяжелой цепи или легкой цепи антитела против PD-1, тяжелой цепи или легкой цепи антитела против PD-L1 и тяжелой цепи или легкой цепи против антитела CTLA-4, или их функционального фрагмента.

[0043] При использовании в настоящем документе термин "шарнирная область иммуноглобулина (Ig)" относится к аминокислотной последовательности, которая обычно связывает CH1 и CH2 домены константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Шарнирная область Ig может включать, например, один или более остатков цистеина, способных к образованию дисульфидных связей с остатками цистеина в другой белковой цепи. При использовании в настоящем документе термин "Fc-домен иммуноглобулина (Ig)" относится к фрагменту константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая способна связываться с Fc-рецептором. Fc-домен Ig может включать, например, CH2 и CH3 домен иммуноглобулина (Ig). Границы между CH1, CH2 и CH3 доменами Ig известны в данной области и могут быть найдены, например, в базе данных PROSITE

(доступной в сети Интернет по адресу prosite.expasy.org). Для ясности, выравнивание аминокислотных последовательностей CH1 и CH2 доменов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM человека представлено на **ФИГУРЕ 2**.

[0044] В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig выбрана из шарнирной области IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM, и Fc-домен Ig выбран из Fc-домена IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig и Fc-домен вместе включают 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 включают аминокислотную последовательность, обладающую больше чем 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью 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.

[0045] Аминокислотный линкер может позволить лигандсвязывающей части слитого белка (например, цитокинового рецептора) 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), снизить иммуногенность или обеспечить сайт расщепления, обеспечивающий высвобождение компонента слитого белка.

[0046] Аминокислотный линкер может включать, 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.

[0047] В некоторых вариантах осуществления последовательность аминокислотного линкера получена из эндогенного человеческого белка, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM, альбумина или казеина. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный линкер включает С-концевую часть, например от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислот, CH1 домена иммуноглобулина (Ig), например, CH1 домена IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный линкер включает 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: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный линкер включает последовательность, обладающую больше чем 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности 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: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 64.

[0048] Белок или полипептид "получены из" референсного белка или полипептида, если он включает аминокислотную последовательность, которая по существу подобна всей или соответствующей части аминокислотной последовательности дикого типа референсного белка или полипептида. В некоторых вариантах осуществления белок или полипептид, полученный из белка или полипептида дикого типа, может иметь одну или более аминокислотных замен по сравнению с белком или полипептидом дикого типа. Например, предусмотрено, что белок или полипептид, полученный из белка или полипептида дикого типа, может обладать больше чем 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с белком или полипептидом дикого типа. Кроме того, предусмотрено, что белок или полипептид, полученный из белка или полипептида дикого типа, может содержать больше консервативных замен по сравнению с белком или полипептидом дикого типа. При использовании в настоящем документе термин "консервативная замена" относится к замене структурно подобной аминокислотой. Например, консервативные замены могут включать замены в рамках следующих групп: 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 могут быть также определены с помощью алгоритма BLAST (от англ. Basic Local Alignment Search Tool - средство поиска основного локального выравнивания), матрицы замен BLOSUM (например, матрицы BLOSUM 62) или матрицы замен PAM (например, матрицы PAM 250).

[0049] В некоторых вариантах осуществления последовательность аминокислотного линкера получена из цитокина, сигнальной молекулы, иммуномодулирующего белка или пептида, или биологически активного пептида.

[0050] Другие предусмотренные линкерные последовательности включают линкеры, богатые глицином и серином, например, $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO: 49). Дополнительные примеры линкерных последовательностей раскрыты, например, в George et al. (2003) PROTEIN ENGINEERING 15:871-879 и патентах США 5,482,858 и 5,525,491.

[0051] В некоторых вариантах осуществления аминокислотный линкер может включать сайт расщепления, например, сайт протеолитического или непротеолитического расщепления. В некоторых вариантах осуществления сайт протеолитического

расщепления расщепляет протеаза, присутствующая в определенной ткани, органелле или внутриклеточном компартменте. В некоторых вариантах осуществления линкер включает сайт протеолитического расщепления и два остатка цистеина, что приводит к образованию дисульфидной связи после протеолитического распада. В некоторых вариантах осуществления сайт протеолитического расщепления расщепляется протеазой, выбранной из матриксной металлопротеиназы (MMP), фурина, PC1, PC2, PC3, катепсина В, протеиназы 3 и каспазы 3. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления является сайтом протеолитического расщепления, расщепляемым протеазой, присутствующей в эндоплазматическом ретикулуме или аппарате Гольджи эукариотической клетки. В некоторых вариантах осуществления сайт протеолитического расщепления является сайтом расщепления фурином. Фурин является протеазой, которая повсеместно экспрессируется и локализуется в аппарате Гольджи, где она распознает консенсусную последовательность RX_1X_2R (SEQ ID NO: 50), где X_1 является любой аминокислотой, а X_2 является Lys или Arg, и создает разрыв после последнего Arg. Фурин играет биологическую роль при расщеплении пропептидов белков, которые транспортируются через аппарат Гольджи. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сайт протеолитического расщепления является сайтом расщепления фурином, включающим последовательность RX_1X_2R (SEQ ID NO: 50), где X_1 является любой аминокислотой, а X_2 является Lys или Arg, например, сайтом расщепления фурином, включающим последовательность RAKR (SEQ ID NO: 51).

[0052] В некоторых вариантах осуществления Fc Ig, шарнирная область Ig и CH1 домен Ig получены из одного иммуноглобулина.

[0053] В некоторых вариантах осуществления слитый белок включает 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: 55, SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления раскрытый слитый белок включает аминокислотную последовательность, обладающую больше чем 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности 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: 55, SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 58.

[0054] Идентичность последовательностей может быть определена разными способами, которые известны в уровне техники, например, при использовании общедоступной компьютерной программы, такой как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Анализ BLAST (средство поиска основного локального выравнивания) при использовании алгоритма, используемого в программах 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, включенные посредством отсылки), предназначен для поиска подобия последовательностей. По поводу обсуждения основных вопросов при поиске в базах данных последовательностей см. публикацию Altschul et al., (1994) NATURE GENETICS 6:119-129, которая полностью включена посредством отсылки. Специалисты в данной области смогут определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, требуемые для получения максимального выравнивания на протяжении всей длины сравниваемых последовательностей. Параметры поиска для гистограммы, описаний, выравниваний, ожидания (т.е. статистического порога значения для создания отчетов о совпадениях в базах данных последовательностей), предельное значение, матрица и фильтр имеют значение, установленное по умолчанию. По умолчанию в blastp, blastx, tblastn и tblastx используется оценочная матрица BLOSUM62 (Henikoff et al., (1992) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 89:10915-10919, полностью включена посредством отсылки). Четыре параметра blastn могут иметь следующие значения: Q=10 (штраф за создание пропуска); R=10 (штраф за продолжение пропуска); wink=1 (генерирует код совпадения в каждом wink.sup.th положении на протяжении запрашиваемой последовательности); и gapw=16 (устанавливает ширину окна, в котором генерируются выравнивания с пропусками). Эквивалентные параметры настройки значений Blastp могут быть следующими: Q=9; R=2; wink=1; и gapw=32. Поиски также можно проводить при использовании предоставляемых NCBI (Национальным центром биотехнологической информации США) Дополнительных параметров BLAST (например: -G, штраф за введение пропуска [целое число]: значение по умолчанию=5 для нуклеотидов/11 для белков; -E, штраф за продолжение пропуска [целое число]: значение по умолчанию=2 для нуклеотидов/1 для белков; -q, штраф за несовпадающий нуклеотид [целое число]: значение по умолчанию = -3; -r, вознаграждение за совпадающий нуклеотид [целое число]: значение по умолчанию=1; -e, ожидаемое значение [фактическое]: значение по умолчанию=10; -W, длина слова [целое число]: значение по умолчанию=11 для нуклеотидов/28 для megablast/3 для белков; -y, значение сброса (X) для удлинений BLAST в битах: значение по умолчанию=20 для blastn/7 для остальных; -X, X значение сброса для выравнивания с пропусками (в битах): значение по умолчанию=15 для всех программ, не применимых к blastn; и -Z, финальное значение X сброса для выравнивания с пропусками (в битах): 50 для blastn, 25 для остальных). Также для парных выравниваний белковых последовательностей может использоваться ClustalW (параметры по умолчанию могут включать, например, матрицу Blosum62 и штраф за создание пропуска=10 и штраф за продолжение пропуска=0,1). В алгоритме Bestfit для сравнения последовательностей, доступном в версии 10.0 пакета GCG, используются параметры для ДНК GAP=50 (штраф за создание пропуска) и LEN=3 (штраф за продолжение пропуска), и эквивалентные параметры настройки при сравнениях белковых последовательностей, включают GAP=8 и LEN=2.

[0055] В одном аспекте изобретения предложен цитокинсвязывающий белок, включающий два слитых белка, где каждый слитый белок включает, в ориентации от N- к

С-концу: растворимую часть внеклеточного домена цитокинового рецептора; аминокислотный линкер; шарнирную область иммуноглобулина (Ig); и Fc-домен иммуноглобулина (Ig); где линкер включает от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислотных остатков, где два слитых белка ковалентно соединены, и где два внеклеточных домена вместе определяют связывающий сайт для цитокина.

[0056] Цитокинсвязывающий белок может включать два из предыдущих слитых белков, ковалентно соединенных друг с другом, где каждый слитый белок включает внеклеточный домен цитокинового рецептора, и где два внеклеточных домена вместе определяют связывающий сайт для цитокина. Слитые белки могут быть ковалентно связаны, например, дисульфидными связями между остатками цистеина в шарнирной области Ig каждого слитого белка. В некоторых вариантах осуществления слитые белки, мономерные или мультимерные (например, димерные), сохраняют по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% связывающей активности целевого лиганда по сравнению с нативным, полноразмерным цитокиновым рецептором.

[0057] В некоторых вариантах осуществления цитокинсвязывающий белок согласно изобретению 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 цитокинсвязывающий белок согласно изобретению 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 цитокинсвязывающий белок согласно изобретению связывает IL-10 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 цитокинсвязывающий белок согласно изобретению связывает IL-10 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. Значения K_D могут быть определены способами, известными в уровне техники, включая способы поверхностного плазмонного резонанса или интерферометрии биослоя.

[0058] Примерные слитые белки согласно изобретению включают белки, включающие 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: 55, SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 58. Для ясности, последовательности отдельных элементов этих белков и белков, из которых были получены 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	IL-10RA SEQ ID NO: 12	CH1 домен IgG1 SEQ ID NO: 1	IgG1 SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 55	IL-10RA SEQ ID NO: 12	CH1 домен IgG1 SEQ ID NO: 53	IgG1 SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 56	IL-10RA SEQ ID NO: 12	CH1 домен IgG1 SEQ ID NO: 54	IgG1 SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 58	IL-10RA SEQ ID NO: 12	CH1 домен IgG1 SEQ ID NO: 57	IgG1 SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 23	IL-10RA SEQ ID NO: 12	CH1 домен IgG2 SEQ ID NO: 2	IgG2 SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 24	IL-10RA SEQ ID NO: 12	CH1 домен IgG3 SEQ ID NO: 3	IgG3 SEQ ID NO: 15
SEQ ID NO: 25	IL-10RA SEQ ID NO: 12	CH1 домен IgG4 SEQ ID NO: 4	IgG4 SEQ ID NO: 16
SEQ ID NO: 26	IL-10RA SEQ ID NO: 12	CH1 домен IgA1 SEQ ID NO: 5	IgA1 SEQ ID NO: 17
SEQ ID NO: 27	IL-10RA SEQ ID NO: 12	CH1 домен IgA2 SEQ ID NO: 6	IgA2 SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 28	IL-10RA SEQ ID NO: 12	CH1 домен IgD SEQ ID NO: 7	IgD SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 29	IL-10RA SEQ ID NO: 12	CH1 домен IgE SEQ ID NO: 8	IgE SEQ ID NO: 20
SEQ ID NO: 30	IL-10RA SEQ ID NO: 12	CH1 домен IgM SEQ ID NO: 9	IgM SEQ ID NO: 21
SEQ ID NO: 31	IL-10RA SEQ ID NO: 12	Альбумин SEQ ID NO: 10	IgG1 SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 32	IL-10RA SEQ ID NO: 12	Казеин SEQ ID NO: 11	IgG1 SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 33	mIL-10RA SEQ ID NO: 34	CH1 домен mIgG1 SEQ ID NO: 35	mIgG1 SEQ ID NO: 36

ТАБЛИЦА 2

Белковая последовательность	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

[0059] Способы получения слитых белков изобретения известны в уровне техники. Например, молекулы ДНК, кодирующие раскрытый слитый белок, могут быть химически синтезированы при использовании представленной в настоящем документе информации о последовательности. Синтетические молекулы ДНК могут быть лигированы с другими подходящими нуклеотидными последовательностями, включающими, например, последовательности контроля экспрессии, с получением обычных конструкций экспрессии гена, кодирующих требуемый слитый белок. Получение определенных генетических конструкций общеизвестно в уровне техники. Примерные последовательностей нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 37-47, которые кодируют слитые белки SEQ ID NO: 22-32, можно найти в **ТАБЛИЦЕ 2**.

[0060] Нуклеиновые кислоты, кодирующие требуемые слитые белки, могут быть включены (лигированы) в векторы экспрессии, которые могут быть введены в клетки-хозяева с помощью стандартных методов трансфекции или трансформации. Примерами клеток-хозяев являются клетки *E. coli*, клетки яичников китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, клетки почек детенышей хомяка (ВНК), клетки почек обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Нер G2) и клетки миеломы. Трансформированные клетки-хозяева могут выращивать в условиях, позволяющих клеткам-хозяевам экспрессировать гены, кодирующие требуемый слитый белок.

[0061] Специфические условия экспрессии и очистки будут изменяться в зависимости от используемой системы экспрессии. Например, если ген должен экспрессироваться в *E. coli*, его сначала клонируют в вектор экспрессии, помещая сконструированный ген после подходящего бактериального промотора, например, T_{tr} или T_{ac}, и прокариотической сигнальной последовательности. Экспрессируемый секреторируемый белок накапливается в преломляющих тельцах или тельцах включения, и может быть получен после разрушения клеток с помощью пресса Френча или обработки ультразвуком. Преломляющие тельца затем солубилизируют, а белки подвергают рефолдингу и расщеплению способами, известными в данной области.

[0062] Если рекомбинантный ген должен экспрессироваться в эукариотических клетках-хозяевах, например, клетках CHO, его сначала встраивают в вектор экспрессии, содержащий подходящий эукариотический промотор, сигнал секреции, последовательность поли(А) и стоп-кодон, и, необязательно, он может содержать энхансеры и различные интроны. Генетическая конструкция может быть введена в эукариотические клетки-хозяева с помощью стандартных методов.

[0063] Полипептид, включающий раскрытый слитый белок, может быть получен при выращивании (культивировании) клетки-хозяина, трансфицированной вектором экспрессии, кодирующим такой белок, при условиях, которые обеспечивают экспрессию полипептида. После экспрессии полипептид может быть собран и очищен или выделен с помощью способов, известных в уровне техники, например, при использовании аффинных меток, таких как Белок А, Белок G, глутатион-S-трансфераза (GST) и гистиридиновые метки.

III. Векторы экспрессии

[0064] Слитые белки, представляющие интерес, могут быть экспрессированы в представляющей интерес клетке путем слияния гена, кодирующего представляющий интерес слитый белок, в подходящем векторе экспрессии. При использовании в настоящем документе "вектор экспрессии" относится к вектору, включающему рекомбинантный полинуклеотид, включающий последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с экспрессируемой нуклеотидной последовательностью. Вектор экспрессии включает достаточные цис-действующие элементы для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть предоставлены клеткой-хозяином или в системе экспрессии *in vitro*. Векторы экспрессии включают все векторы, известные в уровне техники, такие как космиды, плазмиды (например, голые или содержащиеся в липосомах), ретротранспозоны (например, piggyback, sleeping beauty) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые включают рекомбинантный полинуклеотид, представляющий интерес.

[0065] В некоторых вариантах осуществления раскрытый вектор экспрессии является вирусным вектором. Термины "вирусный вектор" и "вирус" используются в настоящем документе попеременно для обозначения любых облигатных внутриклеточных паразитов, обладающих белоксинтезирующим или энергогенерирующим механизмом. Вирусный геном может представлять собой РНК или ДНК. Вирусы, применимые при практическом осуществлении настоящего изобретения, включают рекомбинантно модифицированные оболочечные или безоболочечные ДНК и РНК вирусы, предпочтительно выбранные из бакуловирусов, парвовирусов, пикорнавирусов, герпесвирусов, поксвирусов или аденовирусов. Вирусы могут быть модифицированы с помощью методов рекомбинантных ДНК для включения экспрессии экзогенных транскриптов и могут быть сконструированы репликационно-дефицитными, условно реплицирующимися или репликационно-компетентными. Химерные вирусные векторы, в которых применяются предпочтительные элементы, обладающих свойствами каждого из исходных векторов (см., например, Feng et al. (1997) NATURE BIOTECHNOLOGY 15:866-870), также могут применяться при практическом осуществлении настоящего изобретения. Хотя обычно предпочитают использовать вирус, специфичный для видов, подлежащих лечению, в некоторых случаях может быть предпочтительным использовать векторы, полученные из разных видов, которые обладают благоприятными патогенными свойствами. Например, векторы на основе вируса герпеса лошадей для генотерапии у человека описаны в публикации PCT WO98/27216. Векторы описаны как полезные для

лечения человека, поскольку вирус лошадей не является патогенным для человека. Аналогичным образом, овечьи аденовирусные векторы могут применяться в генотерапии у человека, поскольку, как утверждается, они избегают антител против векторов на основе аденовирусов человека. Такие векторы описаны в публикации PCT WO 97/06826.

[0066] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор является аденовирусом. Аденовирусы представляют собой безоболочечные (голые) икосаэдрические вирусы среднего размера (90-100 нм), состоящие из нуклеокапсида и двухцепочечной линейной геномной ДНК. Аденовирусы реплицируются в ядре клеток млекопитающих, используя репликационный аппарат хозяина. Термин "аденовирус" относится к любому вирусу рода *Adenoviridae*, включая, без ограничения, подрода аденовирусов человека, коров, овец, лошадей, псовых, свиней, мышей и обезьян. В частности, аденовирусы человека включает подрода A-F, а также их отдельные серотипы, отдельные серотипы и подрода A-F, включающие, без ограничения, типы аденовирусов человека 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. Предпочтительные векторы получены из аденовирусов типа 2 и 5 человека. Если не указано иное, все номера нуклеотидов аденовируса типа 5 указаны относительно референсной последовательности NCBI AC_000008.1, представленной в настоящем документе в SEQ ID NO: 52.

[0067] Репликационный цикл аденовируса включает две фазы: раннюю фазу, во время которой экспрессируются 4 транскрипционных единицы (E1, E2, E3 и E4), и позднюю фазу, которая наступает после начала синтеза вирусной ДНК, и в течение которой экспрессируются поздние транскрипты, прежде всего, с главного позднего промотора (MLP). Поздние транскрипты кодируют большинство структурных белков вируса. Продукты генов E1, E2 и E4 отвечают за транскрипционную активацию, трансформацию клеток, репликацию вирусной ДНК, а также другие вирусные функции, и необходимы для роста вирусной нагрузки.

[0068] Термин "функционально связанный" относится к связи элементов полинуклеотида в функциональном отношении. Последовательность нуклеиновой кислоты "функционально связана", если она помещена в функциональное отношение с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер функционально связан с геном, если он влияет на транскрипцию гена. Функционально связанные нуклеотидные последовательности обычно примыкают друг к другу. Однако, поскольку энхансеры обычно функционируют, когда они отделены от промотора несколькими килобазами, а интронные последовательности могут иметь различную длину, некоторые элементы полинуклеотида могут быть функционально связаны, но не фланкированы непосредственно, и могут даже функционировать в транс-конфигурации относительно другого аллеля или хромосомы.

IV. Модификации слитых белков

[0069] В случае применения в качестве терапевтического средства слитый белок

может быть оптимизирован (например, подвергнут созреванию аффинности) с целью улучшения биохимических свойств, включающих аффинность и/или специфичность, улучшения биофизических свойств, включающих агрегацию, стабильность, преципитацию и/или неспецифичные взаимодействия, и/или снижения иммуногенности. Методики созревания аффинности хорошо известны 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.

[0070] Обычно оптимизированный слитый белок обладает по меньшей мере такой же или по существу такой же (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) аффинностью к лиганду, как и неоптимизированный (или исходный) слитый белок, из которого он был получен. Предпочтительно оптимизированный слитый белок обладает более высокой аффинностью к лиганду по сравнению с исходным слитым белком.

[0071] Слитые белки (например, исходные и оптимизированные варианты) могут быть сконструированы так, чтобы они содержали некоторые константные (т.е. Fc) области с определенной эффекторной функцией (например, антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC)). Константные области человека известны в уровне техники.

[0072] Кроме того, если слитый белок предназначен для применения в качестве терапевтического средства, он может быть конъюгирован с эффекторным средством, таким как низкомолекулярный токсин или радионуклид, при использовании стандартных методов химической конъюгации *in vitro*. Если эффекторное средство является полипептидом, антитело может быть химически конъюгировано с эффектором или соединено с эффектором в виде слитого белка. Конструирование слитых белков хорошо известно в данной области техники.

V. Способы лечения

[0073] Вышеуказанные слитые белки или векторы экспрессии могут применяться для лечения различных медицинских показаний. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные слитые белки или векторы экспрессии могут применяться для лечения различных медицинских показаний, которые опосредованы цитокином, например IL-10. Например, слитые белки и векторы экспрессии могут применяться для лечения различных онкологических или воспалительных заболеваний.

[0074] При использовании в настоящем документе "лечить" и "лечение" означают лечение заболевания у субъекта, например, у млекопитающего, например, у человека. Это включает: (а) подавление заболевания, т.е. прекращение его развития; и (б) облегчение заболевания, т.е. ослабление проявлений патологического состояния. При использовании в настоящем документе термины "субъект" и "пациент" относятся к организму, подлежащему лечению с применением способов и композиций, описанных в настоящем документе. Такие организмы предпочтительно включают, без ограничения, млекопитающих (например, мышей, обезьян, лошадей, коров, свиней, псовых, кошачьих и

т.п.), и более предпочтительно включает людей.

[0075] В некоторых вариантах осуществления слитые белки и векторы экспрессии, раскрытые в настоящем документе, могут применяться для лечения различных форм рака. Раковые клетки подвергают воздействию терапевтически эффективного количества слитого белка или вектора экспрессии с целью ингибировать или уменьшить пролиферацию раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления введение терапевтически эффективного количества слитого белка или вектора экспрессии в раковые клетки снижает активность IL-10 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 IL-10 можно определять с помощью Вестерн-блоттинга, как описано в Примере 2. В некоторых вариантах осуществления раскрытый слитый белок или вектор экспрессии может применяться для замедления роста опухоли у субъекта (например, пациента человека, также называемого субъектом человеком), которое может быть достигнуто путем введения эффективного количества слитого белка или вектора экспрессии субъекту. В некоторых вариантах осуществления введение эффективного количества слитого белка или вектора экспрессии субъекту уменьшает 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%.

[0076] Примеры форм рака включают солидные опухоли, опухоли мягких тканей, гемопозитические опухоли и метастатические поражения. Примеры гемопозитических опухолей включают лейкоз, острый лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), В-клеточный, Т-клеточный или FAB ОЛЛ, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелоцитарный лейкоз (ХМЛ), хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), например, трансформировавшийся ХЛЛ, диффузные В-крупноклеточные лимфомы (ДВККЛ), фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, миелодиспластический синдром (МДС), 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 органов систем, таких как опухоли, поражающие голову и шею (включая глотку), щитовидную железу, легкое (мелкоклеточную или немелкоклеточную карциному легкого (НМККЛ)), молочную железу, лимфоидную ткань, желудочно-кишечный тракт (например, ротовую полость, пищевод, желудок, печень, поджелудочную железу, тонкую кишку, толстую и прямую кишку, анальный канал), гениталии и мочеполовой тракт (например, почки, уретерий, мочевого пузыря, яичники, матку, шейку матки, эндометрий, предстательную железу, яички), центральную нервную систему (например, нервные или глиальные клетки, например, нейробластома или глиома) или кожу (например, меланому).

[0077] В некоторых вариантах осуществления рак 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, почечноклеточной карциномы, рака предстательной железы, гастроэзофагеального рака, рака толстой и прямой кишки, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака яичника, рака печени, гепатоцеллюлярной 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, Ходжкина и неходжкинской), лейкоза, карциномы из клеток Меркеля, желудочно-кишечных 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, рака толстой и прямой кишки, рака желудка, рака головы и шеи и лейкоза. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из лейкоза, рака молочной железы, рака шейки матки, рака толстой и прямой кишки, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака желудка, рака головы и шеи, рака эндометрия и рака яичника.

[0078] В некоторых вариантах осуществления слитый белок или вектор экспрессии согласно настоящему изобретению вводят для уменьшения уровней одного или более цитокинов у нуждающегося в этом субъекта (например, субъекта с воспалительным заболеванием). В некоторых вариантах осуществления раскрытый слитый белок или вектор экспрессии могут применяться для лечения воспалительного заболевания у субъекта (например, субъекта человека), которое может быть выполнено путем введения эффективного количества слитого белка или вектора экспрессии субъекту.

[0079] В настоящем описании воспалительное состояние представляет собой заболевание или состояние, характеризующееся, полностью или частично, воспалением или воспалительным ответом у пациента. Воспалительные состояния, которые можно лечить с применением слитых белков или векторов экспрессии согласно изобретению, можно охарактеризовать, например, на основе первичной поражаемой ткани, механизма действия, служащего первопричиной состояния, или части иммунной системы, активность которой нарушается или избыточно повышается. 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, воспалительный колит,

воспалительные заболевания кишечника, синдром воспаленного кишечника и дистальный проктит), почки (например, гломерулонефрит, интерстициальный нефрит, волчаночный нефрит, вторичный нефрит при болезни Вегенера, вторичная острая почечная недостаточность при остром нефрите, синдром Гудпасчера, постобструктивный синдром и тубулярную ишемию), печени (например, гепатит (возникающий в результате вирусной инфекции, аутоиммунных ответов, лекарственной терапии, действия токсинов, факторов внешней среды или как вторичное последствие первичного нарушения), ожирение, билиарную атрезию, первичный билиарный цирроз и первичный склерозирующий холангит), кожи (например, псориаз, экзема и дерматит, например, экзематозные дерматиты, атопический и себорейный дерматит, аллергический или раздражающий контактный дерматит, экзема кракеле, фотоаллергический дерматит, фототоксический дерматит, фитофотодерматит, радиационный дерматит и стазисный дерматит), центральной нервной системы (например, рассеянный склероз и нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона или деменцию, связанную с ВИЧ-инфекцией), сосудистой системы (например, повреждение при инфаркте вследствие ишемической болезни сердца, заболевание периферических сосудов, миокардит, васкулит, реваскуляризацию 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, ассоциированное с диабетом II типа, а также острое и хроническое воспаление коры надпочечников), сердца или жировой ткани. В настоящем изобретении предусмотрено, что некоторые воспалительные состояния включают воспаление во многих тканях. Кроме того, в настоящем описании предусмотрено, что некоторые воспалительные состояния могут быть подразделены на несколько категорий. В некоторых вариантах осуществления воспалительное состояние является аутоиммунным заболеванием. Типичные аутоиммунные заболевания включают, без ограничения перечисленными, ревматоидный артрит, псориаз (включая бляшковидный псориаз), псориатический артрит, анкилозирующий спондилит, язвенный колит, рассеянный склероз, волчанку, алопецию, аутоиммунный панкреатит, целиакию, болезнь Бехчета, болезнь Кушинга, болезнь Грейвса. В некоторых вариантах осуществления воспалительное состояние является ревматоидным нарушением. Примеры ревматоидных нарушений включают, без ограничения перечисленными, 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 нарушением.

[0080] Термин "эффективное количество" при использовании в настоящем документе относится к количеству активного компонента (например, количеству слитого белка или вектора экспрессии настоящего изобретения), достаточному, чтобы произвести полезные или требуемые результаты. Эффективное количество может быть введено в

одном или более введениях, применениях или дозах и не должно быть ограничено конкретной композицией или путем введения.

[0081] 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 пределах 10^2 - 10^{15} бляшкообразующих единиц (БОЕ), например, 10^2 - 10^{10} , 10^2 - 10^5 , 10^5 - 10^{15} , 10^5 - 10^{10} или 10^{10} - 10^{15} бляшкообразующих единиц. Вводимое количество будет зависеть от таких переменных, как тип и степень заболевания или показания, подлежащего лечению, общее состояние здоровья пациента, активность слитого белка или вектора экспрессии *in vivo*, фармацевтическая композиция и путь введения. Начальная доза может быть увеличена до величины выше верхнего уровня, чтобы быстро получить требуемую концентрацию в крови или в ткани. В альтернативе начальная доза может быть ниже оптимальной, при этом ежедневную дозу могут постепенно повышать в течение курса лечения. Доза для человека может быть оптимизирована, например, в обычном исследовании Фазы I с повышением дозы с 0,5 мг/кг до 20 мг/кг. Частота введения доз может изменяться в зависимости от таких факторов, как путь введения, величина дозы, полупериод существования антитела в сыворотке и подвергаемое лечению заболевание. Примеры частоты введения доз включают один раз в день, один раз в неделю и один раз в две недели. Предпочтительный путь введения является парентеральным, например, внутривенной инфузией. Изготовление композиций лекарственных средств на основе слитого белка или вектора экспрессии хорошо известно в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления слитый белок или вектор экспрессии лиофилизируют, а затем восстанавливают в забуференном растворе хлорида натрия во время введения.

[0082] Для терапевтического применения слитый белок или вектор экспрессии предпочтительно объединяют с фармацевтически приемлемым носителем. При использовании в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает буферы, носители и вспомогательные вещества, подходящие для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического ответа или других нежелательных реакций или осложнений, соизмеримых с разумным отношением пользы/риска. Носитель(и) должен быть "приемлемым" в том смысле, что он совместим с другими ингредиентами композиций и не является токсичным для реципиента. Фармацевтически приемлемые носители включают буферы, растворители, дисперсионные среды, покрытия, изотонические вещества и замедлители абсорбции и т.п., которые совместимы с фармацевтическим введением. Применение таких сред и добавок для фармацевтически активных веществ известно в уровне техники.

[0083] Фармацевтические композиции, содержащие слитые белки или векторы экспрессии, раскрытые в настоящем документе, могут быть представлены в единичной лекарственной форме и могут быть изготовлены любым подходящим способом.

Фармацевтическая композиция должна иметь состав, соответствующий ее предполагаемому пути введения. Примерами путей введения являются внутривенное (в/в), внутривенное, ингаляционное, внутриглазное, интраназальное, трансдермальное, наружное, чресслизистое и ректальное введение.

[0084] Предпочтительным путем введения слитых белков является в/в инфузия. Полезные композиции могут быть получены способами, известными в области фармацевтики. Например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990). Компоненты композиции, подходящие для парентерального введения, включают стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, раствор хлорида натрия, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновую кислоту или бисульфит натрия; хелатообразователи, такие как ЭДТА; буферные вещества, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты; и регуляторы тоничности, такие как хлорид натрия или декстрозу.

[0085] Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Носитель должен быть стабильным в условиях производства и хранения, и должен быть предохранен от воздействия микроорганизмов. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

[0086] Фармацевтические композиции предпочтительно являются стерильными. Стерилизация может быть выполнена любым подходящим способом, например, путем фильтрации через стерилизующие фильтрующие мембраны. Если композицию лиофилизируют, стерилизация фильтрованием может быть выполнена до или после лиофилизации и восстановления. В некоторых вариантах осуществления средство доставки (например, рекомбинантный вирус) и/или терапевтическое средство согласно изобретению вводят в комбинации с ингибитором контрольной точки, например, антителом против CTLA-4, антителом против PD-1 или антителом против PD-L1. Примеры антител против PD-1 включают, например, ниволумаб (Опдиво®, Bristol-Myers Squibb Co.), пембролизумаб (Китруда®, Merck Sharp & Dohme Corp.), PDR001 (Novartis Pharmaceuticals) и пидилизумаб (CT-011, Cure Tech). Примеры антител против PD-L1 включают, например, атезолизумаб (Тецентрик®, Genentech), дувалумаб (AstraZeneca), MEDI4736, авелумаб (Бавенсио®, EMD Serono) и BMS 936559 (Bristol Myers Squibb Co.).

[0087] Термин "вводимый в комбинации" при использовании в настоящем документе означает, что у субъекта в течение заболевания у субъекта применяют два (или более) разных лечения, при этом действие лечений у субъекта перекрываются в определенный момент времени. В некоторых вариантах осуществления доставка одного лечения все еще продолжается, когда начинают доставку второго, при этом в отношении

введения присутствует перекрывание. Это в настоящем документе иногда называют "одновременной" или "параллельной доставкой". В других вариантах осуществления доставку одного лечения заканчивают до начала доставки другого лечения. В некоторых вариантах осуществления в другом случае лечение является более эффективным из-за комбинированного введения. Например, второе лечение является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшем количестве второго лечения, или второе лечение уменьшает симптомы в большей степени, чем можно было бы наблюдать, если бы второе лечение применяли в отсутствие первого лечения, или аналогичная ситуация наблюдается с первым лечением. В некоторых вариантах осуществления доставка является такой, что уменьшение симптома или другого параметра, связанного с нарушением, больше, чем наблюдаемое при одном лечении, доставляемым в отсутствие другого. Эффект двух лечений может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или больше аддитивного. Доставка может быть такой, что эффект первого доставленного лечения все еще может быть обнаружен при доставке второго лечения.

[0088] По всему тексту описания, где композиции, устройства и системы описаны как имеющие, включающие или содержащие конкретные компоненты, или где процессы и способы описаны как имеющие, включающие или содержащие конкретные этапы, предполагается, что помимо этого существуют композиции устройства и системы согласно настоящему изобретению, которые по существу состоят или состоят из перечисленных компонентов, и что существуют процессы и способы согласно настоящему изобретению, которые состоят по существу или состоят из перечисленных этапов обработки.

[0089] В заявке, когда указано, что элемент или компонент включен и/или выбран из списка перечисленных элементов или компонентов, следует понимать, что элемент или компонент может быть любым из перечисленных элементов или компонентов, или элемент или компонент может быть выбран из группы, состоящей из двух или более перечисленных элементов или компонентов.

[0090] Кроме того, следует понимать, что элементы и/или признаки композиции или способа, описанные в настоящем документе, могут комбинировать различными способами без отступления от сущности и объема настоящего изобретения, в явной или неявной форме изложенных в данном документе. Например, если приведена ссылка на конкретный вирус, этот вирус может применяться в различных вариантах осуществления композиций согласно настоящему изобретению и/или в способах согласно настоящему изобретению, если иное не следует из контекста. Другими словами, в рамках настоящей заявки варианты осуществления были описаны и представлены таким образом, который позволяет написать и изобразить четкое и краткое применение, однако следует понимать, что варианты осуществления могут различными способами комбинировать или разделять без отступления от настоящих принципов и изобретение(й). Например, следует понимать, что все признаки, описанные и изображенные в настоящем документе, могут применяться

ко всем аспектам изобретения(й), описанным и изображенным в настоящем документе.

[0091] Следует понимать, что выражение "по меньшей мере один из" индивидуально включает в себя каждый из перечисленных после выражения объектов и различные комбинации двух или более перечисленных объектов, если иное не следует из контекста и применения. Выражение "и/или" в отношении трех или больше перечисленных объектов следует понимать как имеющее одинаковое значение, если из контекста не следует иное.

[0092] Использование термина "включать", "включает", "включающий", "иметь", "имеет", "имеющий", "содержать", "содержит" или "содержащий", включая их грамматические эквиваленты, можно понимать как открытое и неограничивающее, например, не исключающее дополнительные неуказанные элементы или этапы, если иное прямо не указано или не следует из контекста.

[0093] Если термин "приблизительно" используется перед количественным значением, настоящее изобретение также включает само определенное количественное значение, если прямо не указано иное. При использовании в настоящем документе термин "приблизительно" относится к отклонению на $\pm 10\%$ от номинального значения, если не указано или не следует иное.

[0094] Нужно понимать, что порядок этапов или порядок выполнения определенных действий являются несущественным при условии, что настоящее изобретение остается действующим. Кроме того, два или больше этапов или действий могут быть проведены одновременно.

[0095] Использование любых возможных примеров или вводных слов перед перечислением примеров в настоящем документе, например "такой как" или "включающий", предназначено просто для лучшей иллюстрации настоящего изобретения и не ограничивает объем изобретения, если не указано иное. Ни одно выражение в описании не должно рассматриваться как указывающее на какой-либо незаявленный элемент как существенный для практического осуществления настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

[0096] Следующие Примеры являются лишь иллюстративными и не предназначены для ограничения объема или содержания изобретения каким-либо образом.

Пример 1: Конструирование плазмиды слитого белка IL-10RA

[0097] В данном Примере описано получение плазмид и вирусных векторов экспрессии, кодирующих слитые белки IL-10RA.

[0098] Были созданы нуклеотидные последовательности, кодирующие серию слитых белков IL-10RA человека. Первый слитый белок, hIL-10R-IgG1 (SEQ ID NO: 58), включал остатки 1-229 IL-10RA человека (заканчивающиеся SLTRQ), после которых сразу следовали остатки 84-330 последовательности IgG1 человека (начинающиеся с NVNHK). Второй слитый белок, hIL-10R-Fc (SEQ ID NO: 48), включал остатки 1-235 IL-10RA человека (заканчивающиеся FTVTN), после которых сразу следовали остатки 104-324 IgG1 человека (начинающиеся с DKTHT). Подробное описание слитых белков

показано в **ТАБЛИЦЕ 3.**

ТАБЛИЦА 3

Слитый белок	Остатки hIL-10RA	Остатки hIgG1	Соединение hIL-10RA-hIgG1
hIL-10R-IgG1	1-229	84-330	SLTRQ-NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT
hIL-10R-Fc	1-235	104-324	SLTRQYFTVTN-DKTHT

[0099] Нуклеотидные последовательности, кодирующие слитые белки, клонировали в плазмиды для последующих применений при необходимости. В частности, были созданы рекомбинантные аденовирусные векторы, которые не экспрессировали трансген, экспрессировали hIL-10R-IgG1 или hIL-10RA-Fc.

Пример 2: Активность слитого белка IL-10R

[0100] Клетки A549 (клетки рака легкого человека) инфицировали вирусными векторами, не экспрессирующими трансген, экспрессирующими hIL-10R-IgG1 или hIL-10RA-Fc, как описано в Примере 1, в количестве 10 MOI и культивировали в течение четырех дней. Кондиционированную среду из культуры клеток собирали и суспендировали клетки THP-1 (человеческие лейкозные моноциты) в кондиционированной среде при плотности 5×10^6 клеток/мл. Клетки обрабатывали либо человеческим IL-10 в концентрации 50 нг/мл при 37°C в течение 30 минут, либо хранили в качестве контролей. Для анализа активности IL-10, выделенный клеточный белок из клеток THP-1 исследовали с помощью Вестерн-блоттинга на фосфорилированный Stat3. Общий Stat3 использовали в качестве контроля нанесения.

[0101] IL-10 вызвал фосфорилирование Stat3 в клетках THP-1, культивируемых в кондиционированных средах зараженных вирусными векторами клеток, не экспрессирующих трансген или экспрессирующих hIL-10RA-Fc. Однако IL-10 не вызвал фосфорилирование Stat3 в клетках THP-1, культивируемых в кондиционированных средах клеток, инфицированных вирусом, экспрессирующим hIL10R-IgG. Эти результаты демонстрируют, что слитый белок hIL-10R-IgG1 блокировал вызываемую IL-10 активацию сигнального каскада Stat3.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ОТСЫЛКИ

[0102] Полное описание каждого из патентных документов и научных статей, указанных в настоящем документе, включено посредством отсылки во всех отношениях.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[0103] Изобретение может быть осуществлено в других конкретных формах без отступления от его сущности или существенных характеристик. Таким образом, представленные выше варианты осуществления следует считать во всех отношениях иллюстративными, а не ограничивающими изобретение, описанное в настоящем документе. Таким образом, объем изобретения обозначен в прилагаемой формуле изобретения, а не в предшествующем описании, при этом все изменения, которые входят в значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, должны быть включены в нее.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный слитый белок, включающий:
 - (i) часть рецептора IL-10; и
 - (ii) аминокислотный линкер; и по меньшей мере одно из
 - (iii) части внеклеточного домена, трансмембранного домена или внутриклеточного домена цитокина, цитокинового рецептора или иммуномодулирующего белка;
 - (iv) шарнирную область иммуноглобулина (Ig); или
 - (v) Fc-домен иммуноглобулина (Ig).
2. Выделенный слитый белок по п.1, где линкер включает от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислотных остатков.
3. Выделенный слитый белок, включающий, в ориентации от N- к С-концу:
 - (i) растворимую часть внеклеточного домена рецептора IL-10;
 - (ii) аминокислотный линкер;
 - (iii) шарнирную область иммуноглобулина (Ig); и
 - (iv) Fc-домен иммуноглобулина (Ig);
 где линкер включает от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислотных остатков.
4. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-3, где линкер включает от приблизительно 5 до приблизительно 30 аминокислотных остатков.
5. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-3, где линкер включает от приблизительно 5 до приблизительно 20 аминокислотных остатков.
6. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-3, где линкер включает от приблизительно 5 до приблизительно 15 аминокислотных остатков.
7. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-3, где линкер включает от приблизительно 10 до приблизительно 40 аминокислотных остатков.
8. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-3, где линкер включает от приблизительно 10 до приблизительно 30 аминокислотных остатков.
9. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-3, где линкер включает от приблизительно 10 до приблизительно 20 аминокислотных остатков.
10. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-3, где линкер включает от приблизительно 10 до приблизительно 15 аминокислотных остатков.
11. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-10, где линкер включает последовательность, полученную из эндогенного белка человека.
12. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-11, где линкер включает С-концевую часть CH1 домена иммуноглобулина (Ig).
13. Выделенный слитый белок по п.12, где CH1 домен Ig выбран из CH1 домена IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM.
14. Выделенный слитый белок по п.13, где линкер включает 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: 53, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 57.

15. Выделенный слитый белок по п.14, где CH1 домен Ig является CH1 доменом IgG1.

16. Выделенный слитый белок по п.15, где линкер включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 57.

17. Выделенный слитый белок по п.16, где линкер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57.

18. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-11, где линкер включает последовательность, полученную из человеческого белка, выбранного из альбумина и казеина.

19. Выделенный слитый белок по п.18, где линкер включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11.

20. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-11, где линкер включает последовательность, полученную из цитокина, сигнальной молекулы, иммуномодулирующего белка или пептида.

21. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-20, где линкер включает сайт расщепления.

22. Выделенный слитый белок по п.21, где сайт расщепления является сайтом протеолитического расщепления.

23. Выделенный слитый белок по п.22, где сайт протеолитического расщепления расщепляет протеаза, присутствующая в эндоплазматическом ретикулуме или аппарате Гольджи эукариотической клетки.

24. Выделенный слитый белок по пп.22 или 23, где сайт протеолитического расщепления является сайтом расщепления фурином.

25. Выделенный слитый белок по п.24, где сайт расщепления фурином включает RX_1X_2R (SEQ ID NO: 50), где X_1 является любой аминокислотой, а X_2 является Lys или Arg.

26. Выделенный слитый белок по п.22, где сайт расщепления фурином включает RAKR (SEQ ID NO: 51).

27. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-20, где линкер включает аминокислотную последовательность, которая является протеолитически стабильной в организме млекопитающего или в растении.

28. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-27, где рецептор IL-10 является рецептором IL-10 человека.

29. Выделенный слитый белок по п.28, где растворимая часть внеклеточного домена рецептора IL-10 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

30. Выделенный слитый белок по п.28, где растворимая часть внеклеточного домена рецептора IL-10 включает аминокислотные остатки 22-229 SEQ ID NO: 12.

31. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-30, где Fc-домен Ig и шарнирная

область выбраны из Fc-домена и шарнирной области IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM человека.

32. Выделенный слитый белок по п.31, где Fc-домен Ig и шарнирная область включают 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.

33. Выделенный слитый белок по п.32, где Fc-домен и шарнирная область Ig являются Fc-доменом и шарнирной областью IgG1 человека.

34. Выделенный слитый белок по п.33, где Fc-домен и шарнирная область Ig включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

35. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-34, где Fc Ig, шарнирная область Ig и CH1 домен Ig получены из одного иммуноглобулина.

36. Выделенный слитый белок по любому из пп.1-35, где слитый белок включает 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: 55, SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 58.

37. Выделенный слитый белок по п.36, где слитый белок включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 58.

38. Выделенный слитый белок по п.37, где слитый белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

39. Цитокинсвязывающий белок, включающий два слитых белка по любому из пп.1-38, где каждый слитый белок включает внеклеточный домен цитокинового рецептора, где два слитых белка ковалентно соединены друг с другом, и где два внеклеточных домена вместе определяют связывающий сайт для связывания цитокина.

40. Выделенная нуклеиновая кислота, включающая нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок по любому из пп.1-39.

41. Вектор экспрессии, включающий нуклеиновую кислоту по п.40.

42. Клетка-хозяин, включающая вектор экспрессии по любому из п.41.

43. Способ получения слитого белка, включающий:

(a) выращивание клетки-хозяина по п.42 в условиях для экспрессии слитого белка;

и

(b) очистку слитого белка.

44. Фармацевтическая композиция, включающая: (i) слитый белок по любому из пп.1-39 или вектор экспрессии по п.41; и (ii) по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

45. Способ экспрессии слитого белка в клетке-мишени, включающий контакт клетки с эффективным количеством вектора экспрессии по п.41 для экспрессии слитого белка.

46. Способ по п.45, где слитый белок посттрансляционно расщепляется с получением двух полипептидных цепей.

47. Способ ингибирования пролиферации опухолевой клетки, включающий контакт клетки с эффективным количеством димерного слитого белка по п.39 для ингибирования пролиферации опухолевой клетки.

48. Способ ингибирования пролиферации опухолевой клетки, включающий контакт клетки с эффективным количеством слитого белка по любому из пп.1-38 для ингибирования пролиферации опухолевой клетки.

49. Способ ингибирования роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества димерного слитого белка по п.39 для ингибирования роста опухоли.

50. Способ ингибирования роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества слитого белка по любому из пп.1-38 для ингибирования роста опухоли.

51. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества димерного слитого белка по п.39.

52. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества слитого белка по любому из пп.1-38.

53. Способ снижения активности IL-10 в клетке, включающий контакт клетки с эффективным количеством димерного слитого белка по п.39 для снижения активности IL-10.

54. Способ снижения активности IL-10 в клетке, включающий контакт клетки с эффективным количеством слитого белка по любому из пп.1-38 для снижения активности IL-10.

55. Способ лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества димерного слитого белка по п.39.

56. Способ лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества слитого белка по любому из пп.1-38.

57. Способ ингибирования пролиферации опухолевой клетки, включающий контакт клетки с эффективным количеством вектора экспрессии по п.41 для ингибирования пролиферации опухолевой клетки.

58. Способ ингибирования роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества вектора экспрессии по п.41 для ингибирования роста опухоли.

59. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества вектора экспрессии по п.41.

60. Способ снижения активности IL-10 в клетке, включающий контакт клетки с эффективным количеством вектора экспрессии по п.41 для снижения активности IL-10.

61. Способ лечения воспалительного состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества вектора экспрессии по п.41.

62. Способ лечения инфекции у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества вектора экспрессии по п.41.

63. Способ любого из пп.51, 52 или 59, где рак 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, рака толстой и прямой кишки, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака яичника, рака печени, гепатоцеллюлярной 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, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы), лейкоза, карциномы из клеток Меркеля, желудочно-кишечных стромальных опухолей, множественной миеломы, рака матки, саркомы, рака почки, рака глаза, рака поджелудочной железы и герминогенного рака (например, герминогенного рака яичника)

64. Способ по любому из пп.51, 52 или 59, где рак 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, рака толстой и прямой кишки, рака желудка, рака головы и шеи и лейкоза.

65. Способ по п.64, где рак выбран из рака кожи, рака головы и шеи и рака легкого.

66. Способ по любому из пп.49-52, 55, 56, 58, 59 или 61-65, где слитый белок или вектор экспрессии вводят субъекту в комбинации с одной или более терапиями, выбранными из хирургии, радиации, химиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии и виротерапии.

67. Способ по любому из пп.49-52, 55, 56, 58, 59 или 61-65, где слитый белок или вектор экспрессии вводят субъекту в комбинации с лимфоцитом.

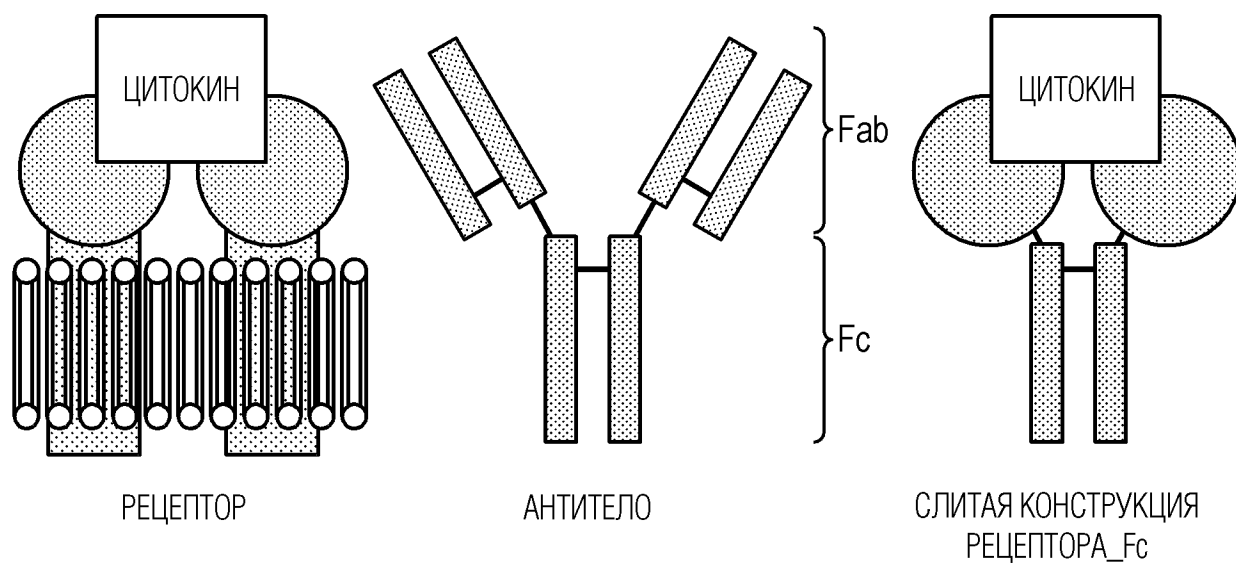
68. Способ по п.67, где лимфоцит является Т-клеткой.

69. Способ по п.68, где Т-клетка является CAR Т-клеткой.

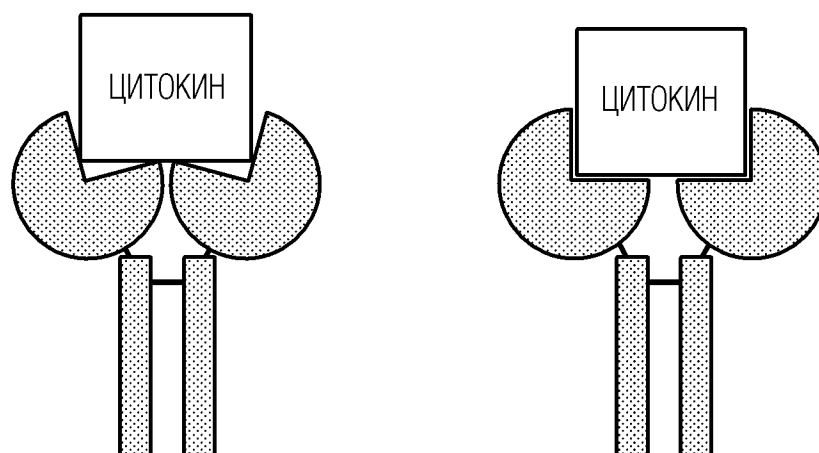
70. Способ по любому из пп.49-52, 55, 56, 58, 59 или 61-69, где субъект является человеком или животным.

71. Способ по п.70, где субъектом является человек педиатрического профиля.

По доверенности



ФИГ. 1А



ФИГ. 1В

CH1 домены человека

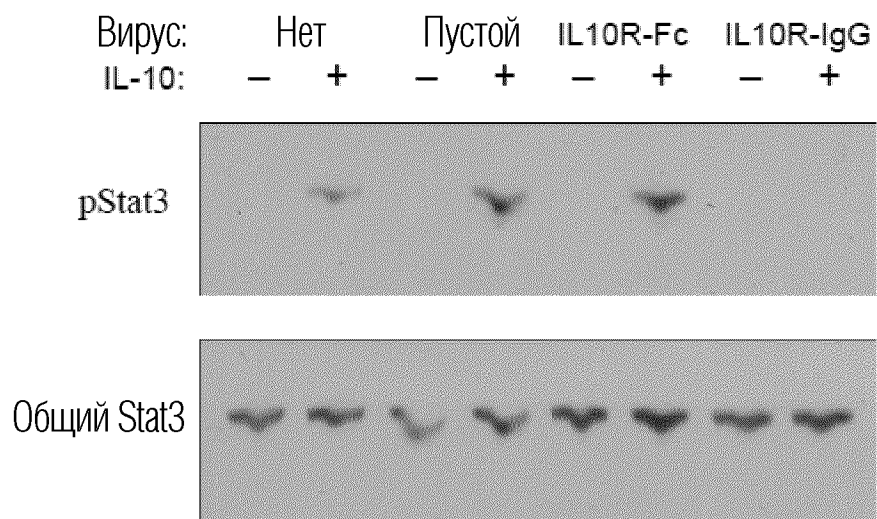
IgA1 PKVFPLS.....LCSTQPDGNV-.....VIACLVQGf.....fPQEPLSVTWSESGQgv.....taRNFPSPQDASGDL.....YTTSSQLTLPA.....TQCLAGKSVTCHVKH.....---YTNPSQDVT
 IgA2 PKVFPLS.....LDSTPDGNV-.....VVACLVQGf.....fPQEPLSVTWSESGQnv.....taRNFPSPQDASGDL.....YTTSSQLTLPA.....TQCPDGKSVTCHVKH.....---YTNPSQDVT
 IgD PDVFPIIs.....GCRHPKDNSPV.....VLACLITGy.....HPTSVTVTWYMGTSq.....pQRTFPEIQRRDSY.....YMTSSQLSTP-.....LQQWRQGEYKCVVQH.....--TASKSKKEIF
 IgE PSVFPLTr....cCKNIPSNATSV.....TLGCLATGy.....FPEPVMVTWDTGSLn.....GTMTLTPATTLTLsg...hYATISLLTVSG.....--AWAKQMFTCRVAht....pSSTDWVDNKTFS
 IgG1 PSVFPLA.....PSSKSTSGGTA.....ALGCLVKDy.....FPEPVTVSWNSGALts.....gVHTFPAPVLQSSGL.....YSLSSVTVPS.....-SSLGTQTYICNVNH.....KPSNTKVDKKVE
 IgG2 PSVFPLA.....PCSRSTSESTA.....ALGCLVKDy.....FPEPVTVSWNSGALts.....gVHTFPAPVLQSSGL.....YSLSSVTVPS.....-SNFGTQTYTCNVDH.....KPSNTKVDKTVE
 IgG3 PSVFPLA.....PCSRSTSGGTA.....ALGCLVKDy.....FPEPVTVSWNSGALts.....gVHTFPAPVLQSSGL.....YSLSSVTVPS.....-SSLGTQTYTCNVNH.....KPSNTKVDKRVE
 IgG4 PSVFPLA.....PCSRSTSESTA.....ALGCLVKDy.....FPEPVTVSWNSGALts.....gVHTFPAPVLQSSGL.....YSLSSVTVPS.....-SSLGTQTYTCNVDH.....KPSNTKVDKRVE
 IgM PTLFPLVs.....CENSPSDTSSV.....AVGCLAQDf.....LPDSITLSWKYKNN.....SDISSTRGFPSVLrg..gkYAATSQVLLPSk....dVMQGTDEHVCKVQH.....--PNGNKEKNVP

CH2 домены человека

IgA1 PRLSLHRp.....ALEDLLLGSEA.....NLCTLTGL.....rDASGVFTTWPSSG.....KSAVQGPPERDLCg...cYSVSSVLPGCA.....EPWNHGKTFTCTAAY.....PESKTPLTATLS
 IgA2 PRLSLHRp.....ALEDLLLGSEA.....NLCTLTGL.....rDASGATFTTWPSSG.....KSAVQGPPERDLCg...cYSVSSVLPGCA.....QPWNHGETFTCTAAH.....PELKTPLTANIT
 IgD PAVQDL-.....--WLRDKA--.....TFTCFVVGs.....DLKDAHLTWEVAGKvpt....ggvEEGLLERHSNGS-.....QSQHSRLTLPR.....SLWNAGTSVTCTLNH.....--PSLPPQRIMA
 IgE PTVKIL-.....-QSSCDGGGHFpp..tiQLLCLVSGy.....TPGTINITWLEDGQvm.....dvDLSTASTTQEGEL.....ASTQSELTLSQ.....KHWLSDRTYTCQVYq....GHTFEDSTKKCA
 IgG1 PSVFLFPp.....kPKDTLMIS RTP.....EVT CVVDvs...hEDPEVKFNWYVDGvev.....hNAKTKPREEQYNST.....YRVVSVLTVLH.....QDWLNGKEYKCKVSN.....KALPAPIEKTIS
 IgG2 PSVFLFPp.....kPKDTLMIS RTP.....EVT CVVDvs...hEDPEVKFNWYVDGvev.....hNAKTKPREEQFns...tFRVSVLTVLH.....QDWLNGKEYKCKVSN.....KGLPAPIEKTIS
 IgG3 PSVFLFPp.....kPKDTLMIS RTP.....EVT CVVDvs...hEDPEVKFNWYVDGvev.....hNAKTKPREEQYNST.....FRVSVLTVLH.....QDWLNGKEYKCKVSN.....KALPAPIEKTIS
 IgG4 PSVFLFPp.....kPKDTLMIS RTP.....EVT CVVDvs...qEDPEVKFNWYVDGvev.....hNAKTKPREEQFns...tYRVVSVLTVLH.....QDWLNGKEYKCKVSN.....KGLPSSIEKTIS
 IgM PKVSVFV.....PPRDGFFGNPrk....sKLICQATGf.....SPRQIQVSWLREGKqvgsg.vtttdQVQAEAKESGPTT.....YKVTSTLTIKE.....SDWLQSMFTCRVDH.....--RGLTFQQNAS

ФИГ. 2





ФИГ. 3