

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040832**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.02

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

(21) Номер заявки
201700111

(22) Дата подачи заявки
2012.10.29

(54) ПОЛИПЕПТИДНЫЕ КОНСТРУКЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **2011904502**

(32) **2011.10.28**

(33) **AU**

(43) **2018.02.28**

(62) **201400488; 2012.10.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТЕВА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
АВСТРАЛИЯ ПТИ ЛТД (AU)**

(72) Изобретатель:
**Уилсон-младший Дэвид С., Поуг
Сара Л., Майкселл Глен Э., Таура
Тэцуя, Корвер Ваутер (US), Дойл
Энтони Г., Кларк Адам, Поллард
Мэттью, Тран Стивен (AU), Линь
Джек Цзыцзяо (US)**

(74) Представитель:
Голышко Н.Т., Вашина Г.М. (RU)

(56) KODAMA, H., et al., "Mutated SEA-D227A-conjugated antibodies greatly enhance antitumor activity against MUC1-expressing bile duct carcinoma", Cancer Immunology, Immunotherapy, December 2001, Volume 50, Number 10, Pages 539-548 Abstract; Right column, page 539, "Introduction"; Right column, page 540; Pages 543-544; Figures 5-9 Abstract; Right column, page 539, "Introduction"; Right column, page 540; Pages 543-544; Figures 5-9

WO-A2-2009017823

Instructions SPDP Crosslinkers [retrieved on 1 March 2012]. Retrieved from internet <URL: <http://www.piercenet.com/instructions/2160279.pdf>> Background information on SPDP-based conjugation described in KODAMA et al.

PIEHLER, J. et al., "New structural and functional aspects of the Type I interferon-receptor interaction revealed by comprehensive mutational analysis of the binding interface", December 2000, Volume 275, Number 51, Pages 40425-40433 Whole document, especially Table 1 and Figure 3
US-A1-20100172868

(57) Предложена полипептидная конструкция для лечения рака, включающая сигнальный лиганд, связанный с антителом или его антигенсвязывающей частью, которая связывается с антигеном, ассоциированным с клеточной поверхностью, в которой сигнальный лиганд является аттенуированным IL-4, включающим мутации, выбранные из группы, состоящей из I5R, T6D, E9Q, R81E, K84D, R88Q, R88A, N89R и W91D, относительно SEQ ID NO: 119, в которой сигнальный лиганд способен активировать или ингибировать IL-4 сигнальный путь в клетке, экспрессирующей антиген, и в которой рак экспрессирует антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью. Предложены также композиция и способ лечения рака.

B1**040832****040832****B1**

Родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет патентной заявки Австралии № 2011904502 с названием "Полипептидные конструкции и их применение", дата подачи 28 октября 2011 г., все содержание которой является включенным в данную заявку во всей полноте посредством ссылки.

Область изобретения

Данное изобретение относится к полипептидным конструкциям, включающим мутировавшие и аттенуированные полипептидные лиганды, связанные с антителами, при этом антитела направляют мутировавшие лиганды к клеткам, которые экспрессируют на своей поверхности антигены, с которыми связываются упомянутые антитела, а также рецепторы упомянутых лигандов. Также, данное изобретение относится к способам лечения, включающим применение таких полипептидных конструкций.

Уровень техники

Описано множество лигандов, функционирующих путем взаимодействия с рецептором на клеточной поверхности, посредством этого стимулируя, ингибируя и иным образом модулируя биологический ответ, что обычно включает вовлечение путей сигнальной трансдукции внутри клетки, несущей упомянутый рецептор. Примеры таких лигандов включают пептиды и полипептидные гормоны, цитокины, хемокины, факторы роста, факторы, вызывающие апоптоз и так далее. Природные лиганды могут быть растворимыми, или могут быть присоединены к поверхности другой клетки.

Благодаря биологической активности таких лигандов, некоторые из них обладают потенциалом в качестве терапевтических средств. Многие пептидные и полипептидные лиганды были одобрены регулирующими органами в качестве терапевтических продуктов, включая, например, человеческие гормоны роста, инсулин, интерферон (IFN)- α 2b, IFN α 2a, IFN β , эритропоэтин, G-CSF и GM-CSF. Многие из этих и других лигандов продемонстрировали потенциал при терапевтическом применении, но также оказались токсичны при введении людям. Одной из причин токсичности является то, что большинство этих лигандов активируют рецепторы множества клеток, включая клетки, не участвующие в оказании терапевтического эффекта. Например, при использовании IFN α 2b для лечения множественной миеломы, его функциональные остатки, по крайней мере частично, связываются с интерфероновыми рецепторами I типа клеток миеломы, что приводит к уменьшению пролиферации и замедляет прогрессию болезни. Однако, к сожалению, этот IFN также связывается с другими, нормальными клетками организма, вызывая множество других клеточных реакций, некоторые из которых являются вредными (например, гриппозные симптомы, нейтропению, депрессию). Результатом такой "нецелевой" активности лигандов является невозможность использовать многие лиганды в качестве потенциальных лекарственных средств. В этом контексте, термин "нецелевая активность" относится к активности в отношении естественного рецептора лиганда, но находящегося на поверхности таких клеток, которые не участвуют в оказании полезных терапевтических эффектов.

Даже хотя некоторые лиганды, такие как IFN α 2b, утверждены в качестве лекарственных средств для лечения заболеваний, они плохо переносятся вследствие их "нецелевой" биологической активности. Наличие нецелевой активности и связанной с ней плохой переносимости также означает невозможность введения некоторых из этих пептидных медикаментов в дозах, достаточно больших для оказания оптимального терапевтического эффекта на целевые клетки, участвующие в создании терапевтического эффекта.

Также с середины 1980-х годов известно, что интерфероны, особенно IFN α , способны усиливать апоптоз и уменьшать пролиферацию некоторых раковых клеток. Эта биологическая активность осуществляется посредством рецепторов интерферона I типа на поверхности раковых клеток, которые, при их стимуляции, запускают различные пути сигнальной трансдукции, что приводит к понижению пролиферации и/или стимулированию терминальной дифференциации, или к апоптозу. IFN α был одобрен Управлением по контролю продуктов питания и лекарственных средств (FDA) в качестве медикамента для лечения различных разновидностей рака, включая меланому, гипернефрому, лимфому В клеток, множественную миелому, хронический миелолейкоз (хронический миелолейкоз) и гистиолимфоцитоз Бернарда. "Прямой" эффект IFN α на раковые клетки оказывается посредством прямого связывания IFN α с рецепторами IFN I типа на этих клетках и стимуляции апоптоза, терминальной дифференциации или пониженной пролиферации. "Непрямой" эффект IFN α на нераковые клетки заключается в стимуляции иммунной системы, что может произвести дополнительный противораковый эффект отторжения раковой опухоли иммунной системой.

К сожалению, рецептор интерферона I типа также присутствует на большинстве нераковых клеток. Активация этого рецептора IFN α на таких клетках приводит к экспрессии различных провоспалительных цитокинов и хемокинов, вызывая токсичность. Эта токсичность не позволяет назначать субъекту такие дозы IFN α , которые оказывают максимальный анти-пролиферативный и про-апоптотический эффект на раковые клетки.

Ozzello et al. (Breast Cancer Research и Treatment 25:265-76, 1993) описал ковалентное присоединение человеческого IFN α к нацеленным на рак антителам, тем самым обеспечивая прямое ингибиторное влияние IFN α на раковую опухоль с целью понижения скорости ее роста, и продемонстрировал, что такие конъюгаты обладают противораковой активностью в ксенотрансплантатной модели человеческого

рака. Механизм наблюдаемой противораковой активности был приписан прямому влиянию IFN α на раковые клетки, так как человеческий IFN α , использовавшийся в экспериментах, не взаимодействовал в поддающейся оценке степени с мышинным рецептором IFN I типа, что могло бы привести к непрямому противораковому эффекту. Из-за отсутствия связывания человеческого IFN α с мышинными клетками, авторы не смогли оценить токсичность конъюгата антитело-IFN α в сравнении со свободным IFN α . В этом случае авторы использовали химический способ для связи IFN α с антителом.

Alkan et al., (Journal of Интерферон Research, volume 4, number 3, p. 355-63, 1984) продемонстрировал, что присоединение человеческого IFN α к антителу, которое связывается с мембранным антигеном (МА) вируса Эпштейна-Барра (EBV) повышает его анти-пролиферативную активность по отношению к клеткам, экспрессирующим EBV-МА антиген. Это увеличение эффективности зависело как от экспрессии антигена целевыми клетками, так и от специфичности связывания антитела. Проверявшейся клеточной линией были линия раковых клеток QIMR-WIL, миелобластическая лейкемия. Авторы предположили, что присоединение IFN α к антителу можно использовать в качестве лечения рака, так как это понижает рост опухоли. Alkan et al не касался вопроса потенциальной токсичности таких конъюгатов антитело-IFN α , возникающей из-за их взаимодействия с нормальными антиген-негативными клетками.

Также известно, что связь между антителом и IFN α можно создать путем создания слитой (гибридной) белковой конструкции. Например, в IDEC (WO 01/97844) описывается прямое слияние человеческого IFN α с С концом тяжелой цепочки IgG, нацеленного на раковый антиген CD20. Другие группы описывали применение различных линкеров между С-концом тяжелой цепочки IgG и IFN α . Например, патент США № 7,456,257 описывает соединение С-конца константного участка тяжелой цепочки антитела с IFN α посредством внедрения серин-глицин богатого (S/G) линкера с последовательностью (GGGGS)_n, где n может иметь значение 1, 2 или 3, а также сообщает об отсутствии существенной разницы в активности IFN α гибридной белковой конструкции при разной длине линкера.

Morrison et al. (US 2011/0104112 A1; и Xuan C, Steward KK, Timmerman JM, Morrison SL. Targeted delivery of интерферон- α via fusion to anti-CD20 results in potent antitumor activity against B-cell lymphoma. Blood 2010;115:2864-71) также описывали IFN α связанный с С-концом тяжелой цепочки нацеленного на рак IgG антитела, с внедренным S/G линкером, и наблюдали, что слияние IgG и линкера с IFN α понижало активность IFN α на клетках, не экспрессировавших соответствующий антиген на клеточной поверхности. Понижение активности таких IFN гибридных белковых конструкций было средним по сравнению с человеческим негибридным белком IFN α (свободным IFN α) при действии на человеческие клетки, но оказалась более значительной в случае мышинного IFN α на мышинных клетках. Понижение активности человеческого IFN α из-за его слияния с С-концом антитела, по наблюдениям Morrison et al., и в US 7,456,257, является средним, и в целом рассматривается как недостаток, так как в результате понижается эффективность лиганда. На этот недостаток указывал, например, Rossi et al (Blood vol. 114, No. 18, pp3864-71), который использовал альтернативную стратегию присоединения IFN α к нацеленному на рак антителу таким образом, что потеря активности IFN α не наблюдалась.

В целом, из уровня техники следует необходимость использования эффективного IFN и направления этого IFN на раковые клетки. При том, что этот подход приводит к увеличению активности IFN против раковых клеток, он никак не затрагивает проблему активности IFN в отношении нормальных, "нецелевых" клеток. В примерах из уровня техники, описывающих этот подход, часть человеческого IFN α из комплекса антитело-IFN α слитый белок сохраняла высокую долю природной активности IFN α при действии на человеческие клетки, не экспрессирующие соответствующий антиген на их клеточных поверхностях. Эта активность может приводить к токсичности, происходящей от активации нераковых, нормальных ("нецелевых") клеток IFN α -частью слитого белка. Соответственно, существует необходимость понизить "нецелевую" активность лигандных медикаментов, сохранив "целевой", терапевтический эффект этих лигандов. Сохранение цель-специфичной активности лиганда при одновременном понижении нецелевой токсичности лигандосодержащих терапевтических агентов приведет к образованию более широкого «окна концентраций» для терапевтического применения лигандов. Например, является желательным использовать человеческий IFN α в такой форме, чтобы его активность была направлена на раковые клетки, минимизируя воздействие на нормальные человеческие клетки. В идеальном случае, рецепторы интерферона I типа на раковых клетках должны быть максимально стимулированы, тогда как такие же рецепторы на нераковых клетках должны быть стимулированы минимально. Существует необходимость в нацеливании человеческого IFN α на раковые клетки таким образом, чтобы он оказывал на много более сильное воздействие на раковые клетки, демонстрирующие антиген, чем на нормальные клетки, не демонстрирующие антиген. Такая же логика применима к другим потенциальным терапевтическим лигандам, например другим цитокинам, пептидам, полипептидным гормонам, хемокинам, факторам роста, факторам, стимулирующим апоптоз, и так далее.

Краткое описание изобретения

Авторы данного изобретения обнаружили, что если пептидный или полипептидный сигнальный лиганд, имеющий одну или несколько мутаций, существенно понижающих аффинность этого лиганда к его

рецептору, связать с антителом, которое нацеливает мутировавший лиганд на целевые клетки, демонстрирующие соответствующий антителу антиген, то активность лиганда в отношении целевых антиген-позитивных клеток сохраняется, тогда как активность лиганда в отношении нецелевых антиген-негативных клеток существенно понижается. Результатом является сигнальная лигандная молекула, обладающая намного большей эффективностью в активации своих рецепторов на антиген-позитивных целевых клетках, по сравнению с антиген-негативными нецелевыми клетками, что дает средство для понижения токсичности, происходящей от нецелевой активности лиганда.

Соответственно в одном аспекте данное изобретение описывает полипептидную конструкцию для лечения рака, включающая пептидный или полипептидный сигнальный лиганд, связанный с антителом или его антиген-связывающей частью, которая связывается с антигеном, ассоциированным с клеточной поверхностью, в которой сигнальный лиганд является (i) аттенуированным IL-4, включающим, по сравнению с диким типом, мутации, выбранные из группы, состоящей из I5R, T6D, E9Q, R81E, K84D, R88Q, R88A, N89R и W91D, или (ii) аттенуированным IL-6, включающим, по сравнению с диким типом, мутации, выбранные из группы, состоящей из F74E, F78E, R168M, R179E и R179W, в которой сигнальный лиганд способен активировать или ингибировать IL-4 или IL-6 сигнальный путь в клетке, экспрессирующей антиген, и в которой рак экспрессирует антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью.

В другом аспекте, данное изобретение описывает способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту полипептидной конструкции по данному изобретению.

В третьем аспекте, данное изобретение описывает применение полипептидной конструкции по данному изобретению при лечении рака.

В четвертом аспекте, данное изобретение описывает композицию для лечения рака, при этом композиция включает полипептидную конструкцию по данному изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В отличие от связывания неаттенуированных "природных" или "диких" человеческих лигандов с антителом или его антиген-связывающей частью, что обычно приводит к 1-15-кратному увеличению эффективности действия лиганда на антиген-позитивные клетки в сравнении с антиген-негативными клетками, данное изобретение демонстрирует, что присоединение мутировавших, обедненных форм лиганда к тому же самому антителу способно привести к увеличению эффективности действия на антиген-позитивные клетки, в сравнении с антиген-негативными клетками.

$\alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta$

Во всех этих случаях является предпочтительным, чтобы антигеном, ассоциированным с клеточной поверхностью, являлся CD38.

В одном варианте осуществления этого изобретения, аминокислотная последовательность сигнального лиганда, содержащая по меньшей мере одно аминокислотное замещение или удаление, обладает более чем 90% или более чем 95%, или более чем 96%, или более чем 97%, или более чем 98% или более чем 99% идентичностью с аминокислотной последовательностью лиганда дикого типа.

В одном варианте осуществления этого изобретения конструкция является гибридным белком.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный лиганд связан с С-концом тяжелой цепочки антитела или его антиген-связывающей части. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный лиганд связан с С-концом легкой цепочки антитела или его антиген-связывающей части. В любом из этих вариантов, лиганд может быть связан с С-концом тяжелой или легкой цепочки антитела или его антиген-связывающей части (то есть без внедрения дополнительного линкера).

В одном варианте осуществления этого изобретения, антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью, выбирают из MHC I класса или PD-1.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью, является антигеном, ассоциированным с миеломой, который выбирают из группы, состоящей из CD38, HM1.24, CD56, CS1, CD138, CD74, IL-6R, Blys (BAFF), BCMA, HLA-SR, кининогена, бета2 микроглобулина, FGFR3, ICAM-1, матриптазы, CD52, EGFR, GM2, альфа4-интегрина, IFG-1R и KIR.

В одном варианте осуществления этого изобретения, сигнальный лиганд выбирают из любого из IL-4 и IL-6.

В таких вариантах осуществления данного изобретения, в которых лиганд связан с антителом, антитело может быть IgG4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, IgG4 включает S228P аминокислотное замещение.

$\alpha\alpha$

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, в которых сигнальный лиганд полипептидной конструкции является IL-4, антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью выбирают из группы, состоящей из CD3, CD4, CD24, CD38, CD44, CD69, CD71, CD96, PD-1, ICOS, CD52 и PD-1.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, в которых сигнальный лиганд полипептидной конструкции является IL-6, антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью выбирают из группы, состоящей из CD3, CD4, CD24, CD38, CD44, CD69, CD71, CD96, PD-1, ICOS, CD52 и PD-1.

В некотором аспекте изобретение описывает анти-CD38 антитела, с различными участками, обо-

значенными X910/12, X913/15, X355/02, X355/07, R5D1, R5E8, или R10A2, со следующими последовательностями.

Название	V _H последовательность	V _K /V _L последовательность
X910/12	SEQ ID NO:395	SEQ ID NO:394
X913/15	SEQ ID NO:397	SEQ ID NO:396
X355/01	SEQ ID NO:421	SEQ ID NO:420
X355/02	SEQ ID NO:391	SEQ ID NO:390
X355/04	SEQ ID NO:423	SEQ ID NO:422
X355/07	SEQ ID NO:393	SEQ ID NO:392
R5D1	SEQ ID NO:399	SEQ ID NO:398
R5E8	SEQ ID NO:401	SEQ ID NO:400
R10A2	SEQ ID NO:403	SEQ ID NO:402

Из этих последовательностей специалист в данной области легко идентифицирует CDR последовательности с помощью известных способов. Как будет понятно специалисту в данной области, эти CDR последовательности можно использовать в различных каркасных последовательностях указанных в SEQ ID NO выше.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано схематическое изображение некоторых вариантов осуществления данного изобретения, включающих антитело, состоящее из 2 тяжелых цепочек и 2 легких цепочек, в котором один или два аттенуированных сигнальных лиганда присоединены к каждой тяжелой цепочке или к каждой легкой цепочке, или к обеим.

На фиг. 2 показана схематическая иллюстрация одно возможного подхода к тому, как гибридные белки "антитело-аттенуированный лиганд" по данному изобретению вызывают передачу сигнала путем активации рецепторов на клетках, демонстрирующих антиген, соответствующий указанному антителу, на их поверхностях. Гибридный белок активирует рецептор на той же клетке, к которой присоединено антитело, посредством его специфичного антигена.

На фиг. 3 показаны аминокислотные последовательности человеческого CD38 (SEQ ID NO: 131).

На фиг. 4 показаны аминокислотные последовательности некоторых сигнальных лигандов по данному изобретению: (A) человеческий IFN α 2b, IFN β 1, IFN β 1b и IFN γ ; (B) IL-4 и IL-6.

На фиг. 5 показаны аминокислотные последовательности некоторых гибридных белков "антитело-аттенуированный лиганд" по данному изобретению: (A) G005-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4; (B) nBT062-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4; (C) G005-HC-L0-IFN β (R35A) IgG4; (D) HB95-HC-L16-IL-6 (R179E) IgG1; и (E) J110-HC-L6-IL-4 (R88Q) IgG1. Номенклатура гибридных белков описана в примерах.

На фиг. 6 показана не-антитело-антиген-нацеленная активность IFN α 2b, и "антитело-IFN" гибридных белковых конструкций ритуксимаб-IFN α 2b (ритуксимаб-HC-L6-IFN α IgG1) и паливизумаб-IFN α 2b (Isotype-HC-L6-IFN α IgG1) в анализе активности интерферона, описанном ниже в примерах как "нецелевой анализ". На всех чертежах "IFN α эквиваленты" означают молярную концентрацию молекул интерферона, свободных или присоединенных к антителу. "IFN" означает свободный (не-слитый белок) интерферон дикого типа.

На фиг. 7 показана антитело-антиген-нацеленная интерферонная активность Ритуксимаб-IFN α 2b гибридной белковой конструкции (Ритуксимаб-HC-L6-IFN α IgG1) в сравнении с IFN α 2b в антипролиферативном анализе, описанном ниже в примерах как "целевой (Daudi) анализ".

На фиг. 8 показана антитело-антиген-нацеленная интерферонная активность Ритуксимаб-IFN α гибридной белковой конструкции (Ритуксимаб-HC-L6-IFN α IgG1) в сравнении с нецелевой активностью Паливизумаб-IFN α гибридной белковой конструкции (Изотип-HC-L6-IFN α IgG1) в "целевом (Daudi) анализе" описанном в примерах ниже.

На фиг. 9 показана не-антитело-антиген-нацеленная интерферонная активность IFN α 2b "антитело-IFN" гибридных белковых конструкций ритуксимаб-IFN α 2b (ритуксимаб-HC-L6-IFN α IgG1) и паливизумаб-IFN α 2b (изотип-HC-L6-IFN α IgG1), и некоторых вариантов конструкции ритуксимаб-IFN α 2b, которых подвергли мутации для понижения их интерферонной активности. Анализ описан в примерах как "нецелевой анализ".

На фиг. 10 показана не-антитело-антиген-нацеленная интерферонная активность антитело-IFN гибридных белковых конструкций ритуксимаб-IFN α 2b (ритуксимаб-HC-L6-IFN α IgG1) и двух вариантов конструкции ритуксимаб-IFN α 2b, которых подвергли мутации для понижения их интерферонной актив-

ности. Анализ описан в примерах как "нецелевой анализ".

На фиг. 11 показана антитело-антиген-нацеленная интерферонная активность антитело-IFN гибридной белковой конструкции ритуксимаб-IFN α 2b (ритуксимаб-HC-L6-IFN α IgG1) и вариантов Ритуксимаб-IFN α 2b конструкции, которых подвергли мутации для понижения их интерферонной активности в сравнении с нецелевой активностью гибридных белковых конструкций паливизумаб-IFN α 2b (изотип-HC-L6-IFN α IgG1) и в сравнении с IFN α 2b. Анализ описан в примерах как "целевой (Daudi) анализ".

На фиг. 12 показана антитело-антиген-нацеленная интерферонная активность антитело-IFN гибридных белковых конструкций ритуксимаб-IFN α 2b (ритуксимаб-HC-L6-IFN α IgG1) и двух вариантов, которых подвергли мутации для понижения их интерферонной активности. Анализ описан в примерах как "целевой (Daudi) анализ".

На фиг. 13 показаны последовательности некоторых новых человеческих CD38 антител, описанных в этом документе.

На фиг. 14 показаны результаты обнаружения связывания новых человеческих анти-CD38 антител с CD38⁺ клеточной линией RPMI-8226 с помощью поточной цитометрии. По оси "x" отложена концентрация антитела в микрограммах на мл, по оси "y" отложена средняя интенсивность флуоресценции.

На фиг. 15 показана не-антитело-антиген нацеленная IFN активность IFN α 2b в сравнении с анти-CD38-IFN α гибридной белковой конструкцией (G005-HC-L0-IFN α IgG4), основанной на анти-CD38 антителе G005. Анализ описан в примерах как "нецелевой анализ".

На фиг. 16 показана антипролиферативная активность IFN α 2b в сравнении с анти-CD38-IFN α гибридной белковой конструкцией (G005-HC-L0-IFN α IgG4) на клеточной линии ARP-1 множественной миеломы (CD38⁺). Анализ описан в примерах как "целевой (ARP) анализ".

На фиг. 17 показана не-антитело-антиген нацеленная IFN активность IFN α 2b в сравнении с различными анти-CD38-IFN α гибридными белковыми конструкциями, несущими мутации в IFN части. Вариателные участки антител этих гибридных белковых конструкций происходят от антитела G005. Анализ описан в примерах как "нецелевой анализ".

На фиг. 18 показана не-антитело-антиген нацеленная IFN активность IFN α 2b в сравнении с различными анти-CD38-IFN α гибридными белковыми конструкциями несущими мутации в IFN части. Вариателные участки антител этих гибридных белковых конструкций происходят от антитела G005. Анализ описан в примерах как "нецелевой анализ".

На фиг. 19 показана не-антитело-антиген нацеленная IFN активность IFN α 2b в сравнении с двумя анти-CD38-IFN α гибридными белковыми конструкциями несущими мутации в IFN части. Вариателные участки антител этих гибридных белковых конструкций происходят от антитела G005. Анализ описан в примерах как "нецелевой анализ".

На фиг. 20 показана антипролиферативная активность IFN α 2b в сравнении с анти-CD38-IFN α гибридными белковыми конструкциями с мутациями в IFN части лимфомной клеточной линии Daudi. Вариателные участки антител этих гибридных белковых конструкций происходят от антитела G005. Анализ описан в примерах как "целевой (Daudi) анализ".

На фиг. 21 показана антипролиферативная активность IFN α 2b и различных анти-CD38-IFN α гибридных белков с A145G мутацией в IFN части. Гибридные белковые конструкции или имеют L6 линкер из 6 аминокислот или не имеют линкера (L0) и принадлежат к IgG1 или IgG4 изотипу. Вариателные участки антител этих гибридных белковых конструкций происходят от антитела G005. Анализ описан в примерах как "целевой (Daudi) анализ".

На фиг. 22 показана антипролиферативная активность IFN α 2b и двух анти-CD38-IFN α гибридных белков с A145G мутацией в IFN части. Обе гибридные белковые конструкции обладают IFN частью, связанной с С-концом легкой цепочки, как с участием линкера из 6 аминокислот (L6), так и без линкера (L0). Вариателные участки антител этих гибридных белковых конструкций происходят от антитела G005. Анализ описан в примерах как "целевой (Daudi) анализ".

На фиг. 23 показана антипролиферативная активность IFN α 2b на клеточной линии ARP-1 множественной миеломы в сравнении с анти-CD38-IFN α гибридными белковыми конструкциями с R144A мутацией в IFN части. В эксперименте сравнивали эффективность действия гибридных белковых конструкций в зависимости от изотипа (IgG1 и IgG4) и присутствия или отсутствия L6 линкера между С-концом тяжелой цепи антитела и N-концом мутировавшего IFN. Вариателные участки антител этих гибридных белковых конструкций происходят от антитела G005. Анализ описан в примерах как "целевой (ARP) анализ".

На фиг. 24 показана антипролиферативная активность IFN α 2b на клеточной линии ARP-1 множественной миеломы в сравнении с анти-CD38-IFN α гибридными белковыми конструкциями с A145G мутацией в IFN части. В эксперименте сравнивали эффективность действия гибридных белковых конструкций в зависимости от изотипа (IgG1 и IgG4) и присутствия или отсутствия L6 линкера между С-концом тяжелой цепи антитела и N-концом мутировавшего IFN. Вариателные участки антител этих гибридных белковых конструкций происходят от антитела G005. Анализ описан в примерах как "целевой (ARP) анализ".

На фиг. 39 показана антипролиферативная активность на клеточной линии ARP-1 множественной миеломы двух антитело-IFN α гибридных белковых конструкций с A145D мутацией в IFN части. Антитело nBT062 связывает CD138, тогда как "изотипное" антитело - нет (оно происходит от антитела 2D12). Анализ описан в примерах как "целевой (ARP) анализ."

На фиг. 40 (a) показана антипролиферативная активность на клеточной линии ARP-1 множественной миеломы IFN α 2b и двух антитело-IFN α гибридных белковых конструкций с A145D мутацией в IFN части. Антитело HB95 связывает человеческий MHC I класса (который экспрессируется на ARP-1 клетках), тогда как "изотипное" антитело - нет (оно происходит от антитела 2D12). Паливизумаб, подобно 2D12, не связывается с клетками ARP-1. На фиг. 40 (b) показан такой же анализ, сравнивающий "антитело-аттенуированный IFN α " гибридные белковые конструкции, в которых часть антитела является скорее Fab фрагментом, чем полноразмерным антителом. Для обеих панелей (a) и (b) анализ описан в примерах как "целевой (ARP) анализ."

На фиг. 41 показано измерение антивирусной активности IFN α и двух антитело-IFN α гибридных белковых конструкций с A145D мутацией в IFN части. В этом анализе ингибирования цитопатического эффекта использовали клеточную линию A549 и вирус EMC. Антитело HB95 связывает человеческий MHC I класса (который экспрессируется клетками A549), тогда как "изотипное" антитело, происходящее от антитела 2D12, его не связывает.

На фиг. 42 показана не-антитело-антиген нацеленная IFN активность IFN β , анти-CD38-IFN β гибридной белковой конструкции, и идентичной гибридной белковой конструкции с аттенуированной R35A мутацией в IFN части. Анализ описан в примерах как "нецелевой анализ."

На фиг. 43 показана антипролиферативная активность на клеточной линии ARP-1 множественной миеломы IFN β , анти-CD38-IFN β гибридной белковой конструкции и идентичной гибридной белковой конструкции с аттенуированной R35A мутацией в IFN части. Вариабельные участки антител этих гибридных белковых конструкций происходят от антитела G005. Анализ описан в примерах как "целевой (ARP) анализ." "Эквиваленты Ifn" относятся к молярной концентрации молекул интерферона, либо свободных, либо присоединенных к антителу.

На фиг. 44 показана не-антитело-антиген-нацеленная IL-4 активность (нецелевой (HB-IL4) анализ) IL-4 и трех антитело-IL-4 гибридных белковых конструкций: J110-HC-L6-IL-4 IgG1, анти-PD1 антитело слитое к диким типом IL-4; J110-HC-L6-IL-4 (R88Q), которая является идентичной с ранее упомянутой гибридной белковой конструкцией, за исключением аттенуированной R88Q мутации в IL-4 части; и Изотип-НС-L6-IL-4 (R88Q), основанная на 2D12 антителе, которое не связывается ни с одной клеткой из используемых в анализах по данному изобретению, и является слитым с аттенуированным IL-4. "Эквиваленты IL-4" относятся к молярной концентрации молекул IL-4, либо свободных, либо присоединенных к антителу.

На фиг. 45 показан "целевой (Th1 отклонение) анализ" сравнения активности IL-4 и трех антитело-IL-4 гибридных белковых конструкций: J110-HC-L6-IL-4 IgG1, анти-PD1 антитело слитое с диком типом IL-4; J110-HC-L6-IL-4 (R88Q), которая является идентичной с ранее упомянутой гибридной белковой конструкцией, за исключением аттенуированной R88Q мутации в IL-4 части; и Изотип-НС-L6-IL-4 (R88Q), основанная на 2D12 антителе, которое не связывается ни с одной клеткой из используемых в анализах по данному изобретению, и является слитым с аттенуированным IL-4. "Эквиваленты IL-4" относятся к молярной концентрации молекул IL-4, либо свободных, либо присоединенных к антителу.

На фиг. 46 показан "биоанализ IL-6" сравнения IL-6 с различными антитело-IL-6 гибридными белковыми конструкциями, которые либо связываются с целевыми клетками (на основе HB95 антитела, которое связывается MHC I класса на целевых клетках) либо не связываются с целевыми клетками (на основе изотипа контрольного антитела 2D12), слитыми с IL-6 дикого типа или IL-6 с аттенуированной R179E мутацией. "Эквиваленты IL-6" относятся к молярной концентрации молекул IL-4, либо свободных, либо присоединенных к антителу.

На фиг. 47 показан эффект различных соединений на рост подкожной H929 миеломы у SCID мышей. Шкала обозначенная "лечение" показывает продолжительность лечения соединением. "Изотипное" антитело основано на антителе 2D12. G005 является анти-CD38 антителом.

На фиг. 48 показан эффект различных соединений на выживание (Kaplan-Meier graph) NOD-SCID мышей, системно инокулированных человеческой миеломной клеточной линией MM1S. Шкала обозначенная "лечение" показывает продолжительность лечения соединением. G005 является анти-CD38 антителом.

На фиг. 49 показан эффект различных соединений на рост подкожной Daudi лимфомы у NOD-SCID мышей. Шкала обозначенная "лечение" показывает продолжительность лечения соединением. "Изотипное" антитело основано на антителе 2D12. G005 является анти-CD38 антителом.

На фиг. 50 показан эффект "анти-CD38-аттенуированный IFN α " гибридной белковой конструкции (G005-НС-L6-IFN α (A145G) IgG1) и гибридной белковой конструкции "изотипный контроль-аттенуированный IFN α " (изотип-НС-L6-IFN α (A145G) IgG1) на рост подкожной H929 миеломы у SCID мышей в различных дозах. Шкала обозначенная "лечение" показывает продолжительность лечения со-

единением. "Изотопное" антитело основано на антителе 2D12.

На фиг. 51 показан эффект "анти-CD38- аттенуированный IFN α " гибридной белковой конструкции в сравнении с гибридной белковой конструкцией "изотопное контрольное антитело-аттенуированный IFN α " на рост подкожной H929 миеломы у SCID мышей. IgG1 сравнивают с IgG4 в контексте этих гибридных белковых конструкций. Шкала обозначенная "лечение" показывает продолжительность лечения соединением. "Изотопное" антитело основано на антителе 2D12.

На фиг. 52 показан эффект гибридной белковой конструкции "анти-CD38-аттенуированный IFN α " (X355/02-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4) в сравнении с гибридной белковой конструкцией "изотипное контрольное антитело-аттенуированный IFN α " на рост подкожной H929 миеломы у SCID мышей. Шкала обозначенная "фаза лечения" показывает продолжительность лечения соединением. "Изотипное" антитело основано на антителе 2D12.

На фиг. 53 показаны эффекты различных соединений на рост подкожной H929 миеломы у SCID мышей. G005 является анти-CD38 антителом.

На фиг. 54 показаны эффекты гибридной белковой конструкции "анти-CD38-аттенуированный IFN α " (G005-HC-L6-IFN α (A145G) IgG4) и гибридной белковой конструкции "изотипный контрольный-аттенуированный IFN α " (изотип-HC-L6-IFN α (A145G) IgG4) на рост подкожной H929 миеломы у SCID мышей, с несколькими циклами введения, каждый с дозой 10 мг/кг. "Изотипное" антитело основано на антителе 2D12.

На фиг. 55 показаны эффекты гибридной белковой конструкции "анти-CD38-аттенуированный IFN α " (G005-HC-L6-IFN α (A145G) IgG4) на рост подкожной H929 миеломы у SCID мышей. Введение доз (показано стрелками) начали когда средний объем опухоли достиг 730 мм³.

На фиг. 56 показано ингибирование образования колонии нормальных человеческих моноядерных клеток костного мозга (BM MNC) с помощью IFN α 2b, гибридной белковой конструкции "анти-CD38-аттенуированный IFN α " (G005-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4) и гибридной белковой конструкции "изотипное контрольное антитело-аттенуированный IFN α " 2D12-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4. "Антитело-аттенуированный IFN α " гибридная белковая конструкция продемонстрировала приблизительно 10000-кратное уменьшение эффективности в этом анализе.

На фиг. 57 показаны эффекты IFN α 2b в сравнении с гибридной белковой конструкцией "антитело-аттенуированный IFN α " (изотип-HC-L6-IFN α (A145G) IgG1; изотипные вариабельные участки основаны на антителе 2D12) на производство цитокина человеческими моноядерными клетками периферической крови (PBMC). (A) IP-10 и MCP-1; (B) MCP-3 и IL-1 α .

Описание изобретения

Конструкции по данному изобретению являются конструкциями "антитело-аттенуированный лиганд", демонстрирующими повышенный индекс антиген-специфичности в отношении активации сигнальных путей из-за действия аттенуированного лиганда на рецептор клеточной поверхности. Эти конструкции основаны на неожиданном открытии, заключающемся в том, что, в контексте конструкции «антитело-лиганд», лигандная часть может быть мутирована таким образом, что лигандная активность на антиген-негативных клетках сильно аттенуирована, тогда как лигандная активность на антиген-позитивных клетках аттенуирована только незначительно, или не аттенуирована вовсе. Такие конструкции демонстрируют в один, два, три, четыре или пять раз большую эффективность действия на антиген-позитивные клетки в сравнении с антиген-негативными клетками, чем свободный лиганд. В одном варианте осуществления этого изобретения, конструкция "антитело-аттенуированный лиганд" сохраняет по меньшей мере 1%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% эффективности действия на антиген-позитивные клетки от такого действия неаттенуированного свободного (т.е. не присоединенного к антителу) лиганда. Кроме того, в одном варианте осуществления этого изобретения, конструкция "антитело-аттенуированный лиганд" сохраняет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 90% максимальной активности неаттенуированного свободного (т.е. не присоединенного к антителу) лиганда; в этом контексте, "максимальная активность" означает количество сигнальной активности (или ее нисходящего эффекта) в высшей точке плато кривой дозозависимости, когда дальнейшее увеличение количества агента уже не вызывает увеличения ответной реакции.

Термин "специфичность" при употреблении в этом тексте не всегда имеет абсолютное значение и часто является относительным термином, означающим степень селективности гибридной белковой конструкции "антитело-лиганд" в отношении антиген-позитивной клетки в сравнении с антиген-негативной клеткой. Поэтому например, конструкцию можно назвать имеющей "100-кратную специфичность в отношении антиген-позитивных клеток в сравнении с антиген-негативными клетками", и это будет означать, что эта конструкция обладает в 100 раз большей эффективностью действия на клетки, экспрессирующие антиген, в сравнении с клетками, не экспрессирующими антиген. В некоторых случаях, степень специфичности конструкции в сравнении антиген-позитивных клеток с антиген-негативными может основываться не на абсолютном соотношении эффективности конструкции к антиген-позитивным и антиген-негативным клеткам, а на эффективности конструкции к каждому типу клеток относительно эффек-

тивности свободного, неаттенуированного лиганда к тому же виду клеток. Этот подход "соотношение к соотношению" для количественного выражения степени специфичности конструкции "антитело-лиганд" учитывает любую неотъемлемую разницу в эффективности действия лиганда в отношении разных типов клеток и иллюстрируется расчетами индекса специфичности антигена (ASI) в табл. 25. Анализы для определения эффективности гибридной конструкции "антитело-лиганд" приводятся в качестве примеров в примерах и включают основанные на клетках анализы пролиферации, апоптоза, фосфорилирования рецепторов и внутриклеточных белков, миграции, дифференциации (например, дифференциации интактных CD4⁺ Т клеток в Th1, Th17, Th2 vs. Treg клетки), увеличения или понижения экспрессии генов или секреции генных продуктов в среду и так далее.

Соответственно в первом аспекте данное изобретение описывает полипептидную конструкцию для лечения рака, включающая пептидный или полипептидный сигнальный лиганд, связанный с антителом или его антиген-связывающей частью, которая связывается с антигеном, ассоциированным с клеточной поверхностью, в которой сигнальный лиганд является (i) аттенуированным IL-4, включающим, по сравнению с диким типом, мутации, выбранные из группы, состоящей из I5R, T6D, E9Q, R81E, K84D, R88Q, R88A, N89R и W91D, или (ii) аттенуированным IL-6, включающим, по сравнению с диким типом, мутации, выбранные из группы, состоящей из F74E, F78E, R168M, R179E и R179W, в которой сигнальный лиганд способен активировать или ингибировать IL-4 или IL-6 сигнальный путь в клетке, экспрессирующей антиген, и в которой рак экспрессирует антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью.

В другом аспекте, данное изобретение описывает способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту полипептидной конструкции по данному изобретению.

Термин "конструкция "антитело-лиганд" при употреблении в этом тексте означает антитело или его антиген-связывающий фрагмент, ковалентно связанный с сигнальным лигандом, который был аттенуирован одним или несколькими замещениями или удалениями, понижающими эффективность действия лиганда в отношении клеток, не экспрессирующих антиген, соответствующий этому антителу.

Термин "антитело", при употреблении в этом тексте, означает в широком смысле любую молекулу иммуноглобулина (Ig), содержащую четыре полипептидных цепочки, две тяжелых (H) цепочки и две легких (L) цепочки, или любой его функциональный фрагмент, мутант, вариант, или производное, сохраняющее ключевой эпитоп-связывающий функционал молекулы Ig. Такие мутанты, варианты или производные антитела являются известными в данной области, и их неограничивающие примеры обсуждаются ниже.

В полноразмерном антителе тяжелая цепочка состоит из варибельного участка тяжелой цепочки (обозначаемого в этом тексте как HCVR или VH) и константного участка тяжелой цепочки. Константный участок тяжелой цепочки состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепочка состоит из варибельного участка легкой цепочки (обозначаемого в этом тексте как LCVR или VL) и константного участка легкой цепочки. Константный участок легкой цепочки состоит из одного домена, CL. VH и VL участки могут дальше подразделяться на гиперварибельные участки, называемые hv-участками (CDR), перемежаемые более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминного конца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Молекулы иммуноглобулина могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса.

Термин "антиген-связывающий домен" или "антиген-связывающая часть" антитела, при употреблении в этом тексте, относится к одному или нескольким фрагментам антитела или белка, сохраняющим способность специфически связываться с антигеном (например, CD38). Было показано, что антиген-связывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела. Такие антитела по данному изобретению могут также быть биспецифичными, двойной специфичности, или множественной специфичности, специфично связываясь с двумя или более различными антигенами. Примеры связывающих фрагментов, входящих в термин "антиген-связывающая часть" антитела включают (i) Fab фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')₂ фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab фрагмента в дополнение к части шарнирного участка, связанный дисульфидным мостиком с шарнирным участком; (iii) Fd фрагмент, состоящий из VH и CH1 доменов; (iv) Fv фрагмент, состоящий из VL и VH доменов одноплечевого антитела, (v) доменное антитело (dAb) (Ward et al. 1989 Nature 341 544-6, Winter et al., PCT публикация WO 90/05144 A1, включенные в этот документ посредством ссылки), включающее один варибельный домен; и (vi) изолированный гиперварибельный участок (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть объединенным рекомбинантным способом, с помощью синтетического линкера, что позволяет им стать одной белковой цепочкой, в которой VL и VH участки спаиваются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочные Fv (scFv); см. например, Bird et al. 1988 Science 242 423-6; Huston et al. 1988 Proc Natl Acad Sci U S A 85 5879-83). Такие одноцепочные антитела также входят в понятие "антиген-связывающая часть" антитела. Сюда включаются также другие формы одноцепочных антител, такие как диатела. Диатела являются бивалентными, биспецифичными антителами, в которых VH и VL домены экспрессируются на одной полипептидной цепочке,

но с участием линкера, который слишком короткий, чтобы позводить спаривание между двумя доменами на одной и той же цепочке, тем самым вынуждая домены спариваться с комплементарными доменами другой цепочки, приводя к образованию двух антиген-связывающих центров (см. например, Holliger, P., et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al., 1994, Structure 2:1121-1123). Такие антитело-связывающие части известны в данной области (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering 2001 Springer-Verlag. New York. 790 pp., ISBN 3-540-41354-5). В одном варианте реализации данного изобретения антитело-связывающая часть является Fab фрагментом.

Антитело, описанное в этом тексте, может быть гуманизированным антителом. Термин "гуманизированное антитело" при употреблении в этом тексте означает белок, содержащий человекоподобный вариабельный участок, который включает CDR из антитела не-человеческого вида (например, мыши, крысы или не-человеческого примата), привитые или внедренные в FR человеческого антитела (антитело этого типа называется "CDR-привитым антителом"). Гуманизированные антитела также включают белки, в которых один или несколько остатков человеческого белка модифицированы одним или несколькими аминокислотными замещениями и/или один или несколько FR остатков человеческого белка замещены соответствующими не-человеческими остатками. Гуманизированные антитела могут также содержать остатки, не содержащиеся ни в человеческих, ни в не-человеческих антителах. Любые дополнительные участки белка (например, Fc участок) обычно являются человеческими. Гуманизация может быть проведена с помощью способов, известных в данной области, например, описанных в US 5225539, US 6054297, US 7566771 или US 5585089. Термин "гуманизированное антитело" также включает супер-гуманизированное антитело, например, как описано в US 7,732,578.

Антитело, описанное в этом тексте, может быть человеческим. Термин "человеческое антитело" при употреблении в этом тексте означает белок, имеющий вариабельный и, возможно, константный участок антител, находящиеся у людей, например, в человеческих зародышевых или соматических клетках, или в библиотеках, полученных с использованием таких участков. "Человеческие" антитела могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими последовательностями, например мутации, внесенные случайными или направленными мутациями *in vitro* (в особенности мутации, включающие консервативные замещения или мутации в небольшой части белковых остатков, например, в 1, 2, 3, 4 или 5 белковых остатках). Эти "человеческие антитела" не обязательно должны быть созданы в результате иммунного ответа человека, скорее они могут быть созданы рекомбинантными способами (например, скринингом фаговой дисплейной библиотеки), и/или с помощью трансгенного животного (например, мыши), содержащей нуклеиновые кислоты, кодирующие константные и/или вариабельные участки человеческого антитела, и/или с помощью направленной селекции (например, как описано в US 5,565,332). Этот термин также включает аффинно зрелые формы таких антител. Для целей данного изобретения, человеческий белок также будет рассматриваться как включающий белок, содержащий FR из человеческого антитела или FR, содержащие последовательности из консенсусной последовательности человеческих FR и в котором один или несколько CDR являются случайными или полуслучайными, например, как описано в US 6300064 и/или US 6248516.

Части антител полипептидов по данному изобретению могут быть полноразмерными антителами любого класса, предпочтительно IgG1, IgG2 или IgG4. Константные домены таких антител являются предпочтительно человеческими. Вариабельные участки таких антител могут быть не-человеческого происхождения или, предпочтительным образом, быть человеческого происхождения или гуманизированными. Фрагменты антител также могут использоваться вместо полноразмерных антител.

Термин "антитело" также включает искусственно созданные антитела. Как известно, существует много разновидностей искусственно созданных антител (например, мышинные моноклональные, химерные, гуманизированные и человеческие моноклональные антитела, одноцепочные вариабельные фрагменты антител (scFv's), минитела, аптамеры, а также биспецифические антитела и диатела, описанные выше).

Одиночные домены вариабельных участков (называемые dAbs) описаны, например, в (Ward et al., Nature 341: 544-546, 1989; Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-448, 1993; Davies & Riechmann, FEBS Lett. 339: 285-290, 1994).

Минитела являются маленькими разновидностями целых антител, кодирующими в одной цепочке существенные элементы целого антитела. Соответственно, минитело состоит из VH и VL доменов исходного антитела, слитых с шарнирным участком, и CH3 домен молекулы иммуноглобулина как, например, описано в US 5,837,821.

В другом варианте осуществления данного изобретения, искусственно созданное антитело может включать не происходящие от иммуноглобулина белковые структуры. Например, как описано в (Ku & Schutz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6552-6556, 1995) где описан четырехспиральный белок цитохром b562 с двумя рандомизированными петлями для создания CDR, выбранными для антиген-связывания.

Существует множество не-антительных распознавательных белковых и белковых доменных, которые можно использовать в качестве антиген-связывающих доменов в конструкции по этому изобретению. Они включают структуры на основе цитотоксического Т лимфоцит-ассоциированного антигена 4 (CTLA-4) (Evibody; US 7,166,697); человеческого трансферрина (транс-тело); трехспирального комплекта

из Z-домена белка А (аффитело); мономерного или тримерного человеческого лектинового домена С-типа (тетранектин); десятый домен III типа человеческого фибронектина (аднектин); домена Куниц-типа человеческого или бычьего ингибитора трипсина; дефенсина А насекомых (PСА29), АРРІ (домены Куница); липокалинов, белков, связывающихся с жирными кислотами (FABP), билин-связывающих белков, аполопроптеина D (антикалин); молекулы человеческого α -кристаллина или убиквитина (аффилин); ингибитора трипсина II (микротело); α 2р8 или повтора анкирина (белки с повторяющимся мотивом), харибдотоксина (скорпионозные токсины), Min-23, домена, связывающего целлюлозу (кноттины); неокарцинобатина, СВМ4-2 и тендамистата.

Далее, в дополнение к описанным выше структурам доменов, происходящих и не происходящих от антител, существуют природные лиганд-связывающие белки и белковые домены, которые можно использовать в качестве лиганд-связывающих доменов по этому изобретению. Например, белковые домены, обладающие лиганд-связывающими свойствами, включая внеклеточные домены рецепторов, PDZ модули сигнальных белков, такие как Ras-связывающий белок AF-6, адгезионные молекулы и ферменты.

Данное изобретение также включает химические аналоги аминокислот в антителах субъекта. Использование химических аналогов аминокислот полезно *inter alia* для стабилизации молекул, таких необходимых для введения субъекту. Аналоги аминокислот, включенные в это изобретение, включают, не ограничиваясь этим, модификации боковых цепочек, внедрение аминокислот не природного происхождения и/или их производных в процессе синтеза пептидов, полипептидов или белков и использование кросслинкеров, и другие способы, налагающие конформационные ограничения на белковоподобные молекулы или их аналоги.

Примеры модификации боковых цепочек, включенных в данное изобретение, включают модификации аминокислот, такие как восстановительное алкилирование реакцией с альдегидом с последующим восстановлением NaBH_4 ; амидирование метилацетимидатом; ацилирование уксусным ангидридом; карбамилрование аминокислот цианатом; тинитробензилирование аминокислот 2, 4, 6-тринитробензол сульфокислотой (TNBS); ацилирование аминокислот янтарным ангидридом и тетрагидрофталиевым ангидридом; и пиридоксилрование лизина пиридоксаль-5-фосфатом с дальнейшим восстановлением NaBH_4 .

Гуанидиновую группу аргининовых остатков можно модифицировать образованием гетероциклических продуктов конденсации такими реагентами, как 2,3-бутандион, фенилглиоксаль и глиоксаль.

Карбоксильную группу можно модифицировать карбодимидной активацией посредством образования О-ацилизоамочевина с дальнейшей дериватизацией, например, в соответствующий амид.

Сульфгидрильные группы можно модифицировать такими способами, как карбоксиметилирование йодоуксусной кислотой или йодацетамидом; окисление пермуравьиной кислотой в цистеиновую кислоту; получение смешанных дисульфидов с другими тиольными соединениями; реакцией с малеинимидом, малеиновым ангидридом или другими замещенными малеинимидами; образование ртутных производных с использованием 4-хлорртутьбензоата, 4-хлорртутьфенилсульфоновой кислоты, фенилртутьхлорида, 2-хлорртуть-4-нитрофенола и других ртутных соединений; карбамилрование с помощью цианата при щелочном pH.

Триптофановые остатки можно модифицировать, например, окислением N-бромсукцинимидом или алкилированием индольного кольца с помощью 2-гидрокси-5-нитробензил бромида или сульфенил галогенидов. Тирозиновые остатки, можно модифицировать путем нитрования тетранитрометаном с образованием 3-нитротирозинового производного.

Модификацию имидазольного кольца гистидинового остатка можно провести путем алкилирования производными йодоуксусной кислоты или N-карбэтоксилированием с помощью диэтилпирокарбоната.

Примеры введения ненатуральных аминокислот и производных при пептидном синтезе включают, не ограничиваясь этим, использование норлейцина, 4-аминомасляной кислоты, 4-амино-3-гидрокси-5-фенилпентановой кислоты, 6-аминогексановой кислоты, t-бутилглицина, норвалина, фенилглицина, орнитина, саркозина, 4-амино-3-гидрокси-6-метилгептановой кислоты, 2-тиенилаланина и/или D-изомеров аминокислот. Список ненатуральных аминокислот, рассматриваемых в этом изобретении, приведен в табл. 1.

Таблица 1

Неконвенциональная аминокислота	Код	Неконвенциональная аминокислота	Код
α -аминомасляная кислота	Abu	L-N-метилаланин	Nmala
α -амино- α -метилбутират	Mgab	L-N-метиларгинин	Nmarg
аминоциклопропан- карбоксилат	Cpro	L-N-метиласпарагин	Nmasn
аминоизомасляная кислота	Aib	L-N-метиласпарагиновая кислота	Nmasp
аминонорборнил- карбоксилат	Norb	L-N-метилцистеин	Nmcys
циклогексилаланин	Chexa	L-N-метилглутаминовая кислота	Nmgln
циклопенилаланин	Cpen	L-N-метилглутаминовая кислота	Nmglu
D-аланин	Dal	L-N-метилгистидин	Nmhis
D-аргинин	Darg	L-N-метилизолейцин	Nmile
D-аспарагиновая кислота	Das	L-N-метиллейцин	Nmleu
D-цистеин	Dcys	L-N-метиллизин	Nmlys
D-глутамин	Dgln	L-N-метилметионин	Nmmet
D-глутаминовая кислота	Dglu	L-N-метилнорлейцин	Nmnle
		L-N-метилнорвалин	Nmnva
		L-N-метилорнитин	Nmorn

D-гистидин	Dhis	L-N-метилфенилаланин	Nmphe
D-изолейцин	Dile	L-N-метилпролин	Nmpro
D-лейцин	Dleu	L-N-метилсерин	Nmser
D-лизин	Dlys	L-N-метилтреонин	Nmthr
D-метионин	Dmet	L-N-метилтриптофан	Nmtrp
D-орнитин	Dorn	L-N-метилтирозин	Nmtyr
D-фенилаланин	Dphe	L-N-метилвалин	Nmval
D-пролин	Dpro	L-N-метилэтилглицин	Nmetg
D-серин	Dser	L-N-метил- <i>t</i> -бутилглицин	Nmtbug
D-треонин	Dthr	L-норлейцин	Nle
D-триптофан	Dtrp	L-норвалин	Nva
D-тирозин	Dtyr	α -метил-аминоизобутират	Maib
D-валин	Dval	α -метил- γ -аминобутират	Mgabu
D- α -метилаланин	Dmala	α -метилциклопенилаланин	Mchexa
D- α -метиларгинин	Dmarg	α -метилциклопенилаланин	Mcpen
D- α -метиласпарагин	Dmasn	α -метил- α -нафтилаланин	Manap
D- α -метиласпартат	Dmasp	α -метилпеницилламин	Mpen
D- α -метилцистеин	Dmcys	N-(4-аминобутил)глицин	Nglu
D- α -метилглутамин	Dmgln	N-(2-аминоэтил)глицин	Naeg
D- α -метилгистидин	Dmhis	N-(3-аминопропил)глицин	Norn
D- α -метилизольцин	Dmile	N-амино- α -метилбутират	Nmaabu
D- α -метиллейцин	Dmleu	α -нафтилаланин	Anap
D- α -метиллизин	Dmlys	N-бензилглицин	Nphe
D- α -метилметионин	Dmmet	N-(2-карбамилэтил)глицин	Ngln
D- α -метилорнитин	Dmorn	N-(карбамилметил)глицин	Nasn
D- α -метилфенилаланин	Dmphe	N-(2-карбоксиэтил)глицин	Nglu
D- α -метилпролин	Dmpro	N-(карбоксиметил)глицин	Nasp
D- α -метилсерин	Dmser	N-циклобутилглицин	Ncbut
D- α -метилтреонин	Dmthr	N-циклогептилглицин	Nchep
D- α -метилтриптофан	Dmtrp	N-циклогексилглицин	Nchex
D- α -метилтирозин	Dmtty	N-циклодецилглицин	Ncdec
D- α -метилвалин	Dmval	N-циклододецилглицин	Ncdod
D-N-метилаланин	Dnmala	N-циклооктилглицин	Ncoct
D-N-метиларгинин	Dnmarg	N-циклопропилглицин	Ncpro
D-N-метиласпарагин	Dnmasn	N-циклоундецилглицин	Ncund
D-N-метиласпартат	Dnmasp	N-(2,2-дифенилэтил)глицин	Nbhm
D-N-метилцистеин	Dnmcys	N-(3,3-дифенилпропил)глицин	Nbhe
D-N-метилглутамин	Dnmglu	N-(3-гуанидинопропил)глицин	Narg
D-N-метилглутамат	Dnmglu	N-(1-гидроксиэтил)глицин	Nthr
D-N-метилгистидин	Dnmhis	N-(гидроксиэтил)глицин	Nser
D-N-метилизольцин	Dnmile	N-(имидазолилэтил)глицин	Nhis
D-N-метиллейцин	Dnmleu	N-(3-индолилэтил)глицин	Nhtrp
D-N-метиллизин	Dnmlys	N-метил- γ -аминобутират	Nmgabu
N-метилциклогексилаланин		Nmchexa	D-N-метилметионин
			Dnmmt
D-N-метилорнитин	Dnmorn	N-метилциклопенилаланин	Nmcpen
N-метилглицин	Nala	D-N-метилфенилаланин	Dnmphe

N-метиламиноизобутират	Nmaib	D-N-метилпролин	Dnmpro
N-(1-метилпропил)глицин	Nile	D-N-метилсерин	Dnmser
N-(2-метилпропил)глицин	Nleu	D-N-метилтреонин	Dnmthr
D-N-метилтриптофан	Dnmtrp	N-(1-метилэтил)глицин	Nval
D-N-метилтирозин	Dnmtyr	N-метила-нафтилаланин	Nmanap
D-N-метилвалин	Dnmval	N-метилпеницилламин	Nmpen
γ-аминомасляная кислота	Gabu	N-(<i>p</i> -гидроксифенил)глицин	Nhtyr
L- <i>t</i> -бутилглицин	Tbug	N-(тиометил)глицин	Ncys
L-этилглицин	Etg	пеницилламин	Pen
L-гомофенилаланин	Hphe	L-α-метилаланин	Mala
L-α-метиларгинин	Marg	L-α-метиласпарагин	Masn
L-α-метиласпартат	Masp	L-α-метил- <i>t</i> -бутилглицин	Mtbug
L-α-метилцистеин	Mcys	L-метилэтилглицин	Metg
L-α-метилглутамин	Mgln	L-α-метилглутамат	Mglu
L-α-метилгистидин	Mhis	L-α-метилгомофенилаланин	Mhphe
L-α-метилизойцин	Mile	N-(2-метилтиозил)глицин	Nmet
L-α-метиллейцин	Mleu	L-α-метиллизин	Mlys
L-α-метилметионин	Mmet	L-α-метилнорлейцин	Mnle
L-α-метилнорвалин	Mnva	L-α-метилорнитин	Morn
L-α-метилфенилаланин	Mphe	L-α-метилпролин	Mpro
L-α-метилсерин	Mser	L-α-метилтреонин	Mthr
L-α-метилтриптофан	Mtrp	L-α-метилтирозин	Mtyr
L-α-метилвалин	Mval	L-N-метилгомофенилаланин	Nmhph
N-(N-(2,2-дифенилэтил)	Nnbhm	N-(N-(3,3-дифенилпропил)	Nnbhe
карбамилметил)глицин		карбамилметил)глицин	
1-карбокси-1-(2,2-дифенил-		Nmbc	
этиламино)циклопропан			

Кросслинкеры можно использовать, например, для стабилизации 3D конформаций, применяя гомо-бифункциональные кросслинкеры, такие как бифункциональные имидоэфиры с $(\text{CH}_2)_n$ спейсерными группами где $n=1-6$, глутаральдегиды, N-гидроксисукцинимидные эфиры и гетеро-бифункциональные реагенты, которые обычно содержат amino-реактивные группы, такие как N-гидроксисукцинимид и группу другой направленности, такую как малеинамидную или дитиогруппу (SH), или карбодиимид (COOH).

С помощью способов, хорошо известных в этой области, можно увеличить связывание, например, путем аффинного созревания, или уменьшить иммуногенность путем удаления вероятных МНС класс II-связывающих мотивов. Терапевтическое применение антител, описанных в этом тексте, можно далее улучшить с помощью модуляции их функциональных характеристик, таких как антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), период полувыведения из сыворотки, биораспространение и связывание с Fc рецепторами или их комбинации. Этой модуляции можно достичь с помощью белковой инженерии, гликоинженерии или химическими путями. В зависимости от необходимого терапевтического применения, может быть желательно увеличить или уменьшить любые из названных активностей.

Примером гликоинженерии является методика Potelligent®, описанная в Shinkawa T. et al., 2003 (J Biol Chem 278: 3466-73).

В данной области известно много способов проведения аффинного созревания антител. Многие из них основаны на общей стратегии создания панелей или библиотек разновидностей белков с помощью мутагенеза с последующей селекцией и/или скринингом на улучшенную аффинность. Мутагенез часто проводят на уровне ДНК, например с помощью PCR пониженной точности (Thie, Voedisch et al. 2009), генной перетасовкой (Kolkman and Stemmer 2001), с помощью химических мутагенов и облучения, с помощью "мутаторных" штаммов и репликации пониженной точности (Greener 1996) или с применением соматического гипермутационного подхода в сочетании с натуральным аффинным созреванием (Peled, Kuang et al. 2008). Мутагенез также можно проводить на уровне РНК, например с помощью QR репликазы (Kopsidas, Roberts et al. 2006). Способы, основанные на применении библиотек, позволяющие проводить скрининг на улучшенные варианты белков, могут быть основаны на различных дисплейных технологиях, например на основе фагов, дрожжей, рибосом, бактериальных клеток и клеток млекопитающих, и являются хорошо известными в этой области (Benhar 2007). Аффинное созревание может быть достигнуто более направленными/предсказуемыми способами, например с помощью сайт-направленного мутагенеза или генного синтеза, направляемого данными 3D белкового моделирования (см. например Queen, Schneider et al. 1989 или патент США 6,180,370 или патент США 5,225,539).

Способы увеличения ADCC были описаны Ferrara, Brunker et al. 2006; Li, Sethuraman et al. 2006;

Stavenshagen, Gorlatov et al. 2007; Shields, Namenuk et al. 2001; Shinkawa, Nakamura et al. 2003; и WO 2008/006554.

Способы увеличения CDC были описаны Idusogie, Wong et al. 2001; Dall'Acqua, Cook et al. 2006; Michael sen, Aase et al. 1990; Brekke, Bremnes et al. 1993; Tan, Shopes et al. 1990; и Norderhaug, Brekke et al. 1991.

Ссылки, описывающие способы увеличения ADCC и CDC включают Natsume, In et al. 2008. Описания, содержащиеся в этих ссылках, являются включенными в этот документ посредством ссылки.

Ряд способов модулирования времени полувыведения антитела из сыворотки и биораспределения основаны на модификации взаимодействия между антителом и неонатальным Fc рецептором (FcRn), играющим ключевую роль в защите IgG от катаболизма и поддержании высокой концентрации антитела в сыворотке. Dall'Acqua et al описал замещения в Fc участке IgG1, повышающие аффинность связывания с FcRn, тем самым повышая время полувыведения из сыворотки (Dall'Acqua, Woods et al. 2002) и далее продемонстрировал улучшенную биодоступность и модуляцию ADCC активности тройным замещением M252Y/S254T/T256E (Dall'Acqua, Kiener et al. 2006). См. также патенты США № 6,277,375; 6,821,505; и 7,083,784. Hinton et al описал аминокислотные замещения в константных доменах в позициях 250 и 428, способствующие повышению периода полувыведения *in vivo* (Hinton, Johlf et al. 2004). (Hinton, Xiong et al. 2006). См. также патент США № 7,217,797. Petkova et al описала аминокислотные замещения в константных доменах в позициях 307, 380 и 434 способствующие повышению периода полувыведения *in vivo* (Petkova, Akilesh et al. 2006). См. также Shields et al 2001 и WO 2000/42072. Другие примеры аминокислотных замещений в константных доменах, модулирующие связывание с Fc рецепторами и последующие функции, осуществляемые при посредстве этих рецепторов, включая связывание FcRn и период полувыведения из сыворотки, описаны в патентных заявках США № 20090142340; 20090068175 и 20090092599.

Гликаны, связанные с молекулами антитела, известны как влияющие на взаимодействие антитела с Fc рецепторами и гликановыми рецепторами, и тем самым влияющие на активность антитела, включая время полувыведения из сыворотки (Kaneko, Nimmerjahn et al. 2006; Jones, Papas et al. 2007; и Kanda, Yamada et al. 2007). Таким образом, некоторые гликоформы, модулирующие желаемую активность антитела, могут приносить терапевтическое преимущество. Способы создания гликоформ известны в этой области и включают, не ограничиваясь этим, описанные в патентах США № 6,602,684; 7,326,681; 7,388,081 и WO 2008/006554.

Увеличение периода полувывода путем добавления полиэтиленгликоля (PEG) широко применялось для увеличения времени полувыведения из сыворотки белков, как сообщал, например, Fishburn 2008.

Как станет понятно, в последовательностях по данному изобретению можно произвести консервативные аминокислотные замещения. Под "консервативными замещениями" подразумеваются аминокислоты со сходными свойствами. Согласно этому документу, следующие группы аминокислот считаются консервативными замещениями: H, R и K; D, E, N и Q; V, I и L; C и M; S, T, P, A и G; и F, Y и W.

Термин "антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью", при употреблении в этом тексте, относится в широком смысле к любому антигену, экспрессируемому на клеточной поверхности, включая инфекционные и чужеродные клетки и вирусы.

В некоторых аспектах по данному изобретению, полипептидные конструкции или композиции по данному изобретению можно использовать для лечения пациентов, страдающих раковым заболеванием. Рассматриваемые раковые заболевания включают: группу заболеваний и расстройств, для которых характерен неконтролируемый рост клеток (например, образование раковой опухоли) без дифференциации этих клеток в специализированные и различные клетки. Такие заболевания и расстройства включают ABL1 протоонкоген, раковые заболевания, связанные со СПИД, невриноу слухового нерва, острый лимфобластный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, аденокистозную карциному, рак коры надпочечников, идиопатическую миелоидную метаплазию, алопецию, альвеолярную мягкую саркому, рак анального канала, ангиосаркому, апластическую анемию, астроцитому, атаксию-телеангиэктазию, базально-клеточную карциному (кожи), рак мочевого пузыря, рак костей, рак кишечника, глиома ствола мозга, раковые опухоли мозга и ЦНС, рак молочной железы, раковые опухоли ЦНС, карциноидные опухоли, рак шейки матки, раковые опухоли головного мозга в детстве, детский рак, детскую лейкемию, детскую саркому мягких тканей, хондросаркому, хориокарциному, хронический лимфолейкоз, хронический миелолейкоз, колоректальный рак, кожную Т-клеточную лимфому, возвышающуюся дерматофибросаркому, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, дуктальную карциному, эндокринный рак, рак эндометрия, эпендимома, рак пищевода, саркому Юинга, экстра-печеночный рак желчных протоков, рак глаза, глазную меланому, ретинобластому, рак фаллопиевых труб, анемию Фанкони, фибросаркому, рак желчного пузыря, рак желудка, двенадцатиперстной кишки, желудочно-кишечные раковые опухоли, рака мочеполовой системы, опухоли зародышевых клеток, гестационную трофобластическую болезнь, глиому, гинекологические раки, гемобластозы, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак, наследственный рак молочной железы, гистиоцитоз, болезнь Ходжкина, вирус папилломы человека, доброкачественную гестационную трофобластическую болезнь, гиперкальциемию, рак гортаноглотки, внутриглазную меланому, рак островных клеток, саркома Капоши, рак почки, клеточный гистиоцитоз Лангерхана, рак гортани, лейомиосаркому, лейкоз, синдром Ли-Фраумени, рак губы, липо-

саркому, рак печени, рак легких, лимфедему, лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рака молочной железы у мужчин, злокачественную палочковидную опухоль почек, медуллобластому, меланому, рак клеток Меркеля, мезотелиому, метастатический рак, рак ротовой полости, множественную эндокринную неоплазию, грибовидный микоз, миелодиспластические синдромы, множественную миелому, миелолифоидные заболевания, рак носа, рак носоглотки, нефробластому, нейробластому, нейрофиброматоз, синдром ломки Наймегена, немеланомный рак кожи, не-мелкоклеточный рак легких (NSCLC), глазные раки, раки пищевода, рак ротовой полости, рак мезофаринкса, остеосаркому, рак стомы яичника, рак поджелудочной железы, околоушной рак, рак парашитовидной железы, рак околоушной железы, рак полового члена, периферические нейроэктодермальные опухоли, рак гипофиза, болезнь Вакеза-Ослера, рак простаты, редкие раковые и ассоциативно-связанные расстройства, почечно-клеточную карциному, ретинобластому, рабдомиосаркому, синдром Ротмунда-Томсона, рак слюнных желез, саркому, шванному, синдром Сезари, рак кожи, мелкоклеточный рак легкого (МРЛ), малый рак кишечника, саркому мягких тканей, раковые опухоли спинного мозга, плоскоклеточная карцинома (кожи), рак желудка, синовиальную саркому, рак яичка, рак тимуса, рак щитовидной железы, переходноклеточный рак (мочевого пузыря), переходноклеточный рак (почечной лоханки/мочеточника), рак трофобластической железы, рак уретры, рак мочеполовой системы, уроплакины, саркому матки, рак матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденштрёма и рак Вильмса. В одном варианте осуществления данного изобретения рак выбирают из группы, содержащей множественную миелому и неходжкинскую лимфому.

Как предусмотрено при лечении рака, части антитела конструкции по данному изобретению могут связываться с антигенами, ассоциированными с раковым заболеванием, то есть, с антигенами клеточной поверхности, селективно экспрессируемыми раковыми клетками или избыточно экспрессируемыми раковыми клетками по сравнению с нормальными клетками. В данной области известно много опухолевых специфических антигенов (ТАА). Неограничивающие примеры ТАА включают фермент тирозиназу; меланомный антиген GM2; альфафетопротейн (AFP); канцерозембриональный антиген (CEA); муцин 1 (MUC1); рецептор человеческого эпидермального фактора роста (Her2/Neu); онкобелок Т-клеток лейкемии/лимфомы 1 (TCL1). Примерами ТАА, ассоциированными с различными раковыми заболеваниями является теломераза (hTERT); простато-специфический мембранный антиген (PSMA); урокиназный плазминогенный активатор и его рецептор (uPA/uPAR); васкулярный эндотелиальный фактор роста и его рецептор (VEGF/VEGFR); внеклеточный матричный индуктор металлопротеиназы (EMMPRIN/CD147); эпидермальный фактор роста (EGFR); фактор роста тромбоцитов и его рецептор (PDGF/PDGFR) и c-kit (CD117).

Список других ТАА представлен в патенте США № 2010/0297076, который является включенным в этот документ посредством ссылки. Особенно интересными являются антигены клеточной поверхности, ассоциированные с клетками множественной миеломы, включающие, не ограничиваясь этим, CD38, CD138, CS1, и HM1.24. В одном варианте осуществления этого изобретения, антигеном к конструкции "антитело-аттенуированный лиганд", например, конструкции "антитело-аттенуированный интерферон", является CD38.

CD38 является трансмембранным гликопротеином II типа массой 46 кДа. Он обладает коротким N-терминальным концевым сегментом из 20 аминокислот, одной трансмембранной спиралью и длинным внеклеточным доменом из 256 аминокислот (Bergsagel, P., Blood; 85:436, 1995 и Liu, Q., Structure, 13:1331, 2005). Он экспрессируется на поверхности многих иммунных клеток, включая CD4 и CD8 позитивные Т клетки, В клетки, NK клетки, моноциты, клетки плазмы, и на значительной части нормальных клеток-предшественников костного мозга (Malavasi, F., Hum. Immunol. 9:9, 1984). В лимфоцитах, однако, экспрессия зависит от дифференциации и активационного состояния клетки. Дремлющие Т и В клетки в незрелом состоянии негативны, тогда как активированные лимфоциты преимущественно позитивны в отношении экспрессии CD38 (Funaro, A., J. Immunol. 145:2390, 1990). Дополнительные исследования указывают на экспрессию мРНК в не-кроветворных органах, таких как поджелудочная железа, мозг, селезенка и печень (Koguma, T., Biochim. Biophys. Acta 1223:160, 1994.)

CD38 является многофункциональным эктоферментом, вовлеченным в трансмембранную передачу сигнала и клеточную адгезию. Он также известен как циклическая ADP рибоза гидролаза, так как способен трансформировать NAD^+ и NADP^+ в cADPR, ADPR и NAADP, в зависимости от внеклеточного pH. Эти продукты стимулируют Ca^{2+} -мобилизацию внутри клетки, которая может вести к фосфорилированию тирозина и активации клетки. CD38 также является рецептором, взаимодействующим с лигандом, CD31. Активация рецептора посредством CD31 приводит к внутриклеточным событиям, включая Ca^{2+} мобилизацию, клеточную активацию, пролиферацию, дифференциацию и миграцию (см. Deaglio, S., Trends in Mol. Med. 14:210, 2008.)

CD38 экспрессируется на высоком уровне на клетках множественной миеломы, в большинстве случаев Т- и В-линии острой лимфобластной лейкемии, некоторых острых миелоцитарных лейкозиев, клеточных лимфом фолликулярных центров и Т лимобластных лимфом. (Malavasi, F., J. Clin Lab Res. 22:73, 1992). Не так давно экспрессия CD38 стала надежным прогностическим маркером В-линии хронической лимфобластной лейкемии (B-CLL) (Ibrahim, S., Blood. 98:181, 2001 и Durig, J., Leuk. Res. 25:927, 2002).

Независимые группы продемонстрировали, что пациенты с В-CLL, получившие клон CD38⁺, характеризуются неблагоприятным течением болезни с более тяжелой ее стадией, ухудшенной реакцией на химиотерапию и более коротким периодом выживания (Morabito, F., *Haematologica*. 87:217,2002). Последовательная и усиленная экспрессия CD38 на лимфоидных раковых опухолях делает ее привлекательной мишенью для терапевтического применения антител.

Предпочтительными антигенами для разработки гибридных белковых конструкций "антитело-аттенуированный лиганд", направленных на рак, являются антигены, демонстрирующие селективную или повышенную экспрессию на раковых клетках по сравнению с большинством других нетрансформированных клеток тела. Небелковые примеры таких антигенов включают сфинголипиды, ганглиозид GD2 (Saleh et al., 1993, *J. Immunol.*, 151, 3390-3398), ганглиозид GD3 (Shitara et al., 1993, *Cancer Immunol. Immunother.* 36:373-380), ганглиозид GM2 (Livingston et al., 1994, *J. Clin. Oncol.* 12:1036-1044), ганглиозид GM3 (Hoon et al., 1993, *Cancer Res.* 53:5244-5250) и Lewis^x, lewis^y и lewis^{xy} углеводные антигены, которые могут демонстрироваться на белках или гликолипидах. Примерами белковых антигенов служат HER-2/neu, человеческий вирус папилломы -E6 или -E7, MUC-1; KS 1/4 пан-карциномный антиген (Perez и Walker, 1990, *J. Immunol.* 142:3662-3667; Bumal, 1988, *Hybridoma* 7(4):407-415); антиген карциномы яичников CA125 (Yu et al., 1991, *Cancer Res.* 51(2):468-475); простатический кислый фосфат (Tailor et al., 1990, *Nucl. Acids Res.* 18(16):4928); простатический специфический антиген (Henttu и Vihko, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160(2):903-910; Israeli et al., 1993, *Cancer Res.* 53:227-230); меланома-ассоциированный антиген p97 (Estin et al., 1989, *J. Natl. Cancer Instit.* 81(6):445-446); меланомный антиген gp75 (Vijayasardahl et al., 1990, *J. Exp. Med.* 171(4): 1375-1380); простато-специфический мембранный антиген; канцерозембриональный антиген (CEA) (Foon et al., 1994, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 13:294), MUC16 (антитела включают MJ-170, MJ-171, MJ-172 и MJ-173 [US 7,202,346], 3A5 [US 7,723,485]), NMB (US 8,039,593), злокачественный человеческий лимфоцитный антиген-APO-1 (Bernhard et al., 1989, *Science* 245:301-304); высокомолекулярный меланомный антиген (HMW-MAA) (Natali et al., 1987, *Cancer* 59:55-63; Mittelman et al., 1990, *J. Clin. Invest.* 86:2136-2144); антиген-38.13 лимфосаркомы Беркитта; CD19 (Ghetie et al., 1994, *Blood* 83:1329-1336); антиген-CD20 человеческой В-лимфомы (Reff et al., 1994, *Blood* 83:435-445); GICA 19-9 (Herlyn et al., 1982, *J. Clin. Immunol.* 2:135), CTA-1 и LEA; CD33 (Sgouros et al., 1993, *J. Nucl. Med.* 34:422-430); онкофетальные антигены, такие как альфа-фетопротейн рака печени или онкофетальный антиген рака мочевого пузыря (Hellstrom et al., 1985, *Cancer Res.* 45:2210-2188); дифференцировочные антигены, такие как антиген L6 или L20 человеческой легочной карциномы (Hellstrom et al., 1986, *Cancer Res.* 46:3917-3923); антигены фибросаркомы; Т-клеточный антиген-Gp37 человеческой лейкемии (Bhattacharya-Chatterjee et al., 1988, *J. Immunol.* 141:1398-1403); рак-специфические трансплантационные типы клеточно-поверхностного антигена (TSTA), такие как антигены вирусно-индуцированного рака, включая Т-антиген, вирус рака ДНК и капсульные антигены РНК раковых вирусов; неогликопротеины, антигены рака груди, такие как EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), полиморфный эпителиальный муцин (PEM) (Hilkens et al., 1992, *Trends in Bio. Chem. Sci.* 17:359); антиген полиморфного эпителиального муцина; антиген жировой глобулы человеческого молока; антигены, ассоциированные с колоректальным раком, такие как TAG-72 (Yokata et al., 1992, *Cancer Res.* 52:3402-3408), CO 17-1A (Ragnhammar et al., 1993, *Int. J. Cancer* 53:751-758); дифференцировочные антигены (Feizi, 1985, *Nature* 314:53-57) такие как I(Ma), обнаруживаемый при аденокарциноме желудка, SSEA-1 обнаруживаемый в миелоидных клетках, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, M18 и M39 обнаруживаемые при эпителиальных раках груди, D₁₅₆₋₂₂ обнаруживаемый при колоректальном раке, TRA-1-85 (группа крови Н), C14 обнаруживаемый при аденокарциноме кишечника, F3 обнаруживаемый при аденокарциноме легких, АН6 обнаруживаемый при раке ЖКТ, Y гаптен, обнаруживаемый в клетках эмбриональной карциномы, TL5 (группа крови А), E1 серия (группа крови В) антигенов, обнаруживаемых при раке поджелудочной железы, FC10,2 обнаруживаемый в клетках эмбриональной карциномы, антиген аденокарциномы желудка, CO-514 (группа крови Le^a) обнаруживаемый в аденокарциноме, NS-10 обнаруживаемый в аденокарциноме, CO-43 (группа крови Le^a), G49 обнаруживаемый в клетках A431, 19.9 обнаруживаемый при раке кишечника; муцин желудочного рака; R₂₄ обнаруживаемый в меланоме, MH2 (группа крови ALe^b/Le^y) обнаруживаемый в аденокарциноме кишечника, 4.2, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2 и M1:22:25:8 обнаруживаемый в клетках эмбриональной карциномы и SSEA-3 и SSEA-4. HMW-MAA (SEQ ID NO:433), также известный как хондроэтин сульфат протеогликан меланомы, является мембранно-связанным белком из 2322 остатков, сверхэкспрессирующимся на более чем 90% хирургически удаленных доброкачественных невусов и меланомных повреждений (Camplois, et. al, *Crit Rev Immunol.*; 24:267,2004). Соответственно этот антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью, может служить потенциальной мишенью.

Другие примеры раковых антигенов для использования в качестве мишеней для гибридных белковых конструкций по данному изобретению включают (примеры рака указаны в скобках): CD5 (Т-клеточная лейкемия/лимфома), CA15-3 (карциномы), CA19-9 (карциномы), L6 (карциномы), CA 242 (колоректальный), плацентарная щелочная фосфатаза (карциномы), простатическая кислотная фосфатаза (простата), MAGE-1 (карциномы), MAGE-2 (карциномы), MAGE-3 (карциномы), MAGE-4 (карциномы), рецептор трансферрина (карциномы), p97 (меланома), MUC1 (рак груди), MART1 (меланома), CD20 (не-

ходжкинская лимфома), CD52 (лейкемия), CD33 (лейкемия), человеческий хорионический гонадотропный гормон (карцинома), CD38 (множественная миелома), CD21 (лимфома В-клеток), CD22 (лимфома), CD25 (лимфома В-клеток), CD37 (лимфома В-клеток), CD45 (острая миелобластическая лейкемия), HLA-DR (лимфома В-клеток), IL-2 рецептор (лейкемия и лимфомы Т-клеток), CD40 (лимфома), различные муцины (карциномы), P21 (карциномы), MPG (меланома), Ер-САМ (эпителиальные раки), фолатный рецептор альфа (Ovarian), A33 (колоректальный), G250 (почечный), ферритин (лимфома Ходжкина), de2-7 EGFR (глиобластома, грудь и легкие), фибробластический активационный белок (эпителиальный) и тенацин металлопротеиназы (глиобластома). Некоторые специфичные пригодные антитела включают, не ограничиваясь этим, BR64 (Trail et al., 1997, Cancer Research 57:100 105), BR96 mAb (Trail et al., 1993, Science 261:212-215), mAbs против CD40 антигена, такие как S2C6 mAb (Francisco et al., 2000, Cancer Res. 60:3225-3231) или другие анти-CD40 антитела, такие как описанные в патенте США № 2003-0211100 и 2002-0142358; mAbs против CD30 антигена, такие как AC10 (Bowen et al., 1993, J. Immunol. 151:5896-5906; Wahl et al., 2002 Cancer Res. 62(13):3736-42) или MDX-0060 (U.S. Patent Publication No. 2004-0006215) и mAbs против CD70 антигена, такие как 1F6 mAb и 2F2 mAb (см., например, патент США № 2006-0083736) или антитела 2H5, 10B4, 8B5, 18E7, 69A7 (US 8,124,738). Сообщалось также о других антителах (Franke et al., 2000, Cancer Biother. Radiopharm. 15:459 76; Murray, 2000, Semin. Oncol. 27:64 70; Breitling, F., и Dubel, S., Recombinant Antibodies, John Wiley, и Sons, New York, 1998).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, пригодные антитела могут связываться с рецептором или комплексом рецепторов, экспрессируемых на целевой клетке. Рецептор или комплекс рецепторов может включать член суперсемейства иммуноглобулиновых генов, главный белок гистосовместимости, цитокинный рецептор, член суперсемейства TNF рецепторов, хемокинный рецептор, интегрин, лектин, комплементный контрольный белок, рецептор фактора роста, рецептор гормона или нейротрансмиттера. Неограничивающие примеры соответствующих членов суперсемейства иммуноглобулинов включают CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD22, CD79, CD90, CD152/CTLA-4, PD-1, B7-H4, B7-H3, и ICOS. Неограничивающие примеры подходящих членов суперсемейства TNF рецепторов включают TACI, BCMA, CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4-1BB, TNFR1, TNFR2, RANK, остеопрогерин, APO 3, Apo2/TRAIL R1, TRAIL R2, TRAIL R3, и TRAIL R4. Неограничивающие примеры подходящих интегринов включают CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD103 и CD104. Неограничивающие примеры подходящих лектинов включают лектин S типа, С типа, и I типа. Примеры антител к CEA показаны в табл. 2.

Таблица 2

CEA Антитела			
Аб Клоны	Патент	Владелец	Комментарии
COL-1	US 6,417,337	The Dow Chemical Company	Гуманизированное
806.077	US 6,903,203	AstraZeneca UK Ltd.	Гуманизированное
T84.66	US 7,776,330	City of Hope	Гуманизированное

Антитела, связывающие CD22 антиген, экспрессирующийся на человеческих В клетках включают, например, HD6, RFB4, UV22-2, To15, 4KB128 и гуманизированное анти-CD22 антитело (hLL2) (см., например, Li et al. (1989) Cell. Immunol. 111: 85-99; Mason et al. (1987) Blood 69: 836-40; Behr et al. (1999) Clin. Cancer Res. 5: 3304s-3314s; Bonardi et al. (1993) Cancer Res. 53: 3015-3021).

Антитела к CD33 включают, например, HuM195 (см., например, Kossman et al. (1999) Clin. Cancer Res. 5: 2748-2755; US5693761) и CMA-676 (см., например, Sievers et al., (1999) Blood 93: 3678-3684).

Примеры анти-MUC-1 антител включают, не ограничиваясь этим, Mc5 (см., например, Peterson et al. (1997) Cancer Res. 57: 1103-1108; Ozzello et al. (1993) Breast Cancer Res. Treat. 25: 265-276), и hCTMO1 (см., например, Van Hof et al. (1996) Cancer Res. 56: 5179-5185).

Примеры анти-TAG-72 антител включают, не ограничиваясь этим, CC49 (см., например, Pavlinkova et al. (1999) Clin. Cancer Res. 5: 2613-2619), B72.3 (см., например, Divgi et al. (1994) Nucl. Med. Biol. 21:9-

15), и описанные в патенте США № 5,976,531.

Примеры анти-HER2 антител включают, не ограничиваясь этим, мышиное моноклональное анти-HER2 и гуманизированное анти-HER2 IgG1 каппа антитело (см., например, Ono et al. (1999) *Mol. Immunol.* 36:387-395).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения целевая группа включает анти-HER2 антитело. Ген *erbB 2*, более известный как (*Her-2/neu*), является онкогеном, кодирующим трансмембранный рецептор. Против *Her-2/neu* было разработано несколько антител, включая трастузумаб (например, HERCEPTIN™; Fournier et al. (1999) *Oncology (Huntingt)* 13: 647-58), TAB-250 (Rosenblum et al. (1999) *Clin. Cancer Res.* 5: 865-874), BACH-250 (Id.), TA1 (Maier et al. (1991) *Cancer Res.* 51: 5361-5369), и mAbs, описанные в патентах США №. 5,772,997; 5,770,195 (mAb 4D5; ATCC CRL 10463); и патенте США № 5,677,171.

Был получен ряд антител, специфично связывающих bind HER2 и некоторые из них нашли клиническое применение. Среди них, например, трастузумаб (например, HERCEPTIN™, Fournier et al. (1999) *Oncology (Huntingt)* 13: 647-658), TAB-250 (Rosenblum et al. (1999) *Clin. Cancer Res.* 5: 865-874), BACH-250 (Id.), TA1 (см., например, Maier et al. (1991) *Cancer Res.* 51: 5361-5369), и антитела, описанные в патентах США №. 5,772,997; 5,770,195, и 5,677,171.

Другие полностью человеческие анти-HER2/neu антитела хорошо известны специалистам в этой области. Такие антитела включают, не ограничиваясь этим, C6 антитела такие как C6.5, DPL5, G98A, C6MH3-B1, B1D2, C6VLB, C6VLD, C6VLE, C6VLF, C6MH3-D7, C6MH3-D6, C6MH3-D5, C6MH3-D3, C6MH3-D2, C6MH3-D1, C6MH3-C4, C6MH3-C3, C6MH3-B9, C6MH3-B5, C6MH3-B48, C6MH3-B47, C6MH3-B46, C6MH3-B43, C6MH3-B41, C6MH3-B39, C6MH3-B34, C6MH3-B33, C6MH3-B31, C6MH3-B27, C6MH3-B25, C6MH3-B21, C6MH3-B20, C6MH3-B2, C6MH3-B16, C6MH3-B15, C6MH3-B11, C6MH3-B1, C6MH3-A3, C6MH3-A2, и C6ML3-9. Эти и другие анти-HER2/neu антитела описаны в патентах США №. 6,512,097 и 5,977,322, in PCT публикации WO 97/00271, in Schier et al. (1996) *J Mol Biol* 255: 28-43, Schier et al. (1996) *J Mol Biol* 263: 551-567 и так далее.

В целом антитела, направленные на различных членов семейства рецепторов эпидермального фактора роста хорошо подходят для использования в качестве нацеленных антител или их антиген-связывающих частей в конструкции по данному изобретению. Такие антитела включают, не ограничиваясь этим, анти-EGF-R антитела, как описано в патентах США №. 5,844,093 и 5,558,864, и европейском патенте № 706,799A. Другие примеры антител семейства анти-EGFR включают, не ограничиваясь этим, такие антитела как C6.5, C6ML3-9, C6MH3-B1, C6-B1D2, F5, HER3.A5, HER3.F4, HER3.H1, HER3.H3, HER3.E12, HER3.B12, EGFR.E12, EGFR.C10, EGFR.B11, EGFR.E8, HER4.B4, HER4.G4, HER4.F4, HER4.A8, HER4.B6, HER4.D4, HER4.D7, HER4.D11, HER4.D12, HER4.E3, HER4.E7, HER4.F8 и HER4.C7 и подобные (см., например, патенты США № 2006/0099205 A1 и US 2004/0071696 A1, которые включены сюда посредством ссылки).

Предпочтительно, чтобы для антигена, ассоциированного с клеточной поверхностью, экспрессирующегося в достаточном количестве на целевой клетке, присутствовало достаточное терапевтическое количество полипептидной конструкции на лигандных рецепторах поверхности целевой клетки. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью, экспрессируется с плотностью более чем 12600 копий на клетку или более чем 15000 копий на клетку. Способы определения числа копийности антигена на клеточной поверхности хорошо известны специалистам в этой области, например методика Jilana (*Am J Clin Pathol* 118:560-566, 2002).

Предпочтительно, чтобы антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью, экспрессировался на клеточной поверхности в такой конфигурации, чтобы полипептидная конструкция могла вступать в контакт как с антигеном клеточной поверхности, так и рецептором лиганда на целевой клетке. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью, обладает внеклеточным доменом с молекулярной массой менее 240 кД.

Предпочтительно, чтобы антитело или его антиген-связывающая часть связывалась с антигеном, ассоциированным с клеточной поверхностью, с достаточной аффинностью, для облегчения связывания лиганда с лигандным рецептором на клеточной поверхности. Соответственно в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептидные конструкции обладают антиген-связывающей аффинностью, измеренной при EC50, со значением от 50 нмоль/л, от 25 нмоль/л, от 10 нмоль/л или от 5 нмоль/л до 0,1 пмоль/л.

Как описано в патентах США №. 6,512,097 и 5,977,322, другие антитела-члены семейства анти-EGFR, могут с легкостью быть получены перетасовкой легкой и/или тяжелой цепочек с последующими одним или несколькими циклами аффинной селекции. Так, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, оно включает использование одного, двух или трех CDR в VL и/или VH участках, являющихся CDR, описанными в упомянутых выше антителах и/или в упомянутых выше публикациях.

В различных вариантах осуществления этого изобретения, целевое антитело или его антиген-связывающая часть включает антитело или его антиген-связывающую часть, специфически или предпочтительно связывающую CD20, Анти-CD20 антитела хорошо известны специалистам в этой области и

включают, не ограничиваясь этим, ритуксимаб, ибритумомаб и тозитумомаб, AME-133v (Applied Molecular Evolution), Ocrelizumab (Roche), Ofatumumab (Genmab), TRU-015 (Trubion) и IMMU-106 (Immuno-medicines).

В патентной заявке WO 2010/105290 описывается антитело, обозначенное "SC104" вместе с рядом гуманизированных вариантов, связывающих антиген, экспрессируемый на ряде раковых клеток.

В одном из вариантов осуществления данного изобретения, присоединение антитела и его аттенуирующая мутация в лиганде повышает индекс антиген-специфичности (ASI) более чем в 10 раз, предпочтительным образом более чем в 50 раз, предпочтительным образом более чем в 100 раз, предпочтительным образом более чем в 1000 раз, или предпочтительным образом более чем в 10000 раз. Индекс антиген-специфичности (ASI) в этом документе определяется как кратность увеличения эффективности сигнальной активности полипептидной конструкции по данному изобретению относительно свободного, не мутировавшего полипептидного лиганда в отношении целевых антиген-позитивных клеток, умноженная на кратность понижения эффективности сигнальной активности полипептидной конструкции по данному изобретению относительно свободного, не мутировавшего полипептидного лиганда в отношении целевых антиген-негативных клеток. Термин "эффективность" в этом контексте можно количественно представить значением EC50, которое является математической средней точкой дозо-зависимой кривой, в которой доза означает концентрацию лиганда или конструкции «антитело-лиганд» в анализе, и ответ означает количественный ответ клетки на сигнальную активность лиганда при определенной дозе. Так, например, если первое соединение демонстрирует значение EC50 (выраженное, например, в молярных единицах), которое в 10 раз ниже значения EC50 второго соединения в отношении такой же клетки, обычно измеренное тем же способом, говорят что первое соединение обладает в 10 раз более высокой эффективностью. И наоборот, если первое соединение демонстрирует значение EC50 которое в 10 раз выше значения EC50 второго соединения в отношении такой же клетки, обычно измеренное тем же способом, говорят что первое соединение обладает в 10 раз более низкой эффективностью.

Хотя подавляющее большинство протестированных антител показали эффективное нацеливание аттенуированного IFN α , авторы данного изобретения идентифицировали два примера антигенов, у которых нацеливание аттенуированного IFN α на экспрессирующую мишень клеточную линию демонстрировало ASI, не превышающий существенным образом таковой у свободного, не мутировавшего лиганда. Первым примером является антиген CSPG4 (также известный как HMW-MAA, высокомолекулярный меланома-ассоциированный антиген). Авторы данного изобретения тестировали две различные анти-HMW-MAA-антитело-IFN α гибридные белковые конструкции в целевом пролиферационном анализе с использованием клеточных линий A375 или CHL-1. Авторы данного изобретения не наблюдали ингибиторную активность с этими клеточными линиями и антителами в использованных дозах (EC50>21 нмоль/л). Внеклеточный домен этого антигена исключительно велик (молекулярная масса внеклеточного домена приблизительно 240 кД -450 кД в зависимости от гликозилирования). Возможно, что некоторые "антитело-IFN" гибридные белковые конструкции, связывающиеся с очень большими антигенами, могут испытывать стерические затруднения при одновременном взаимодействии с рецепторами IFN на тех же клетках. Возможно однако, что другие антитела, нацеленные на другие эпитопы этого антигена, могут поддерживать целевую IFN активность. Несмотря на эту возможность, предпочтительно, чтобы антитело или его антиген-связывающая часть полипептидной конструкции по данному изобретению связывали антиген при том, что молекулярная масса его внеклеточного домена менее 240 кД.

Второй пример гибридной белковой конструкции "антитело-аттенуированный IFN α ", которая не продемонстрировала достаточную активность, был основан на антителе, которое связывается с миелоидным антигеном CD33. CD33 экспрессируется на относительно низком уровне на клетках KG-1, в количестве 12600 копий на клетку (Sutherland, MAbs. 1(5): 481-490, 2009). Обработка KG-1 клетки анти-CD33 гибридной белковой конструкцией "антитело-аттенуированный IFN α " не привело к ингибированию пролиферации в тестируемом интервале дозировок (IC50>76 нмоль/л). Авторы данного изобретения считают, что относительно небольшое количество копий этой мишени может в некоторых случаях, в зависимости от других факторов, таких как позиция эпитопа, плотность рецепторов IFN рецепторов и т.д., ограничивать эффективность действия гибридной белковой конструкции "антитело-аттенуированный IFN". Возможно однако, что, например, другие антитела, нацеленные на другие эпитопы этого антигена, могут поддержать целевую активность IFN, или что другие клетки с небольшим числом копий CD33 могут тем не менее ответить на такие гибридные белковые конструкции благодаря более высокой собственной IFN чувствительности. Несмотря на эту возможность, является предпочтительным, чтобы антитело или его антиген-связывающая часть полипептидной конструкции по данному изобретению связывалась с антигеном при том, что антиген присутствует на клетке с плотностью более чем 12600 копий на клетку, предпочтительным образом более чем 15000 копий на клетку.

Другим примером гибридной белковой конструкции "антитело-аттенуированный лиганд", в которой антитело не проявило достаточной нацеленности на раковые клетки, было анти-GM2 ганглиозидное антитело, связанное с аттенуированным IFN α . В этом случае антитело к углеводному эпитопу и, что типично для таких антител, обладает низкой аффинностью (значение EC50 для связывания целевых клеток

было определено с помощью поточной цитометрии как ~50 нмоль/л). Поэтому, в предпочтительных вариантах осуществления этого изобретения, антитела проявляют высокую аффинность к их антигенам, со значением EC50 предпочтительным образом менее 50 нмоль/л, более предпочтительным образом менее 25 нмоль/л, еще более предпочтительным образом менее 10 нмоль/л и в самом предпочтительном случае 5 нмоль/л. Кроме того, предпочтительные варианты осуществления этого изобретения включают антитела, связывающиеся скорее с белковыми и пептидными эпитопами, чем с углеводными эпитопами.

Множественная миелома является особенно интересной для некоторых вариантов осуществления данного изобретения, и особенно гибридные белковые конструкции, содержащие антитела к антигенам множественной миеломы и аттенуированные IFN пептиды. В табл. 3 приведены примеры антигенов множественной миеломы и антител, со ссылкой на последовательности антител.

Таблица 3

Мишень	Примеры Ab в предклинической или клинической разработке	Цитата последовательнос ти	Ссылка на клиническое исследование
CD40	Дацетумаб SGN-40	USPTO выданный патент № 7,666,422	NCT00664898 & NCT00525447
CD40	Лукатумумаб HCD-122 CHIR12.12	USPTO#200700987 18	NCT00231166

HM1.24	XmAb5592 гуманизированный+Fc	USPTO#201001045 57	1999, Ozaki, Blood, 93:3922
CD56	HuN901-DM1 BB-10901	1994, Roguska <i>et al.</i> , PNAS 91:969-973	NCT00346255 & NCT00991562
CS1	Элотузумаб HuLuc63	USPTO выданный патент № 7,709,610	NCT00742560 &NCT00726869
CD138	nBT062	USPTO #20090175863	2008, Tassone, Blood, 104:3688
CD74	Милатузумаб Immu-110	US. выданный патент № 7,312,318	NCT00421525, Stein et. Al. 2007 и 2009
IL-6R	Тоцилизумаб MRA	US выданный патент №5,795,965	2007, Yoshio- Hoshino, Canc Res, 67:871
Trail-R1	Мапатумумаб, анти- DR4	US выданный патент № 7,252,994	NCT00315757
Trail-R2 (DR5, APO-2)	Лексатумумаб, ETR2- ST01, анти-DR5	US выданный патент № 6,872,568	2006, Menoret, Blood, 132:1356
Baff	Белимумаб LY2127399	US выданный патент № 7,317,089	
ICOSL	AMG-557	USPTO Application Number 20080166352	
BCMA	SG1	USPTO Application Number 2012008266	2007, Ryan, Mol Cancer Ther, 6:3009

HLA-DR	1D09C3	USPTO Granted Patent # 7,521,047	2007, Carlo-Stella, Canc. Res.,
Kininogen	C11C1	USPTO выданный патент № 4,908,431	2006, Sainz, Canc Immunol Immunother
β2microglobulin		ATCC Cat #HB-149	2007, Yang, Blood, 110:3028; 2009, Clin Can Res, 15:951
FGFR3	Pro-001	USPTO выданный патент № 8,187,601	2006, Trudel, Blood, 2:4908
ICAM-1	cUV3	USPTO выданный патент № 7,943,744	2004, Smallshaw, J Immunother; 2006, Coleman
Matriptase	M24-DOX	USPTO выданный патент № 7,355,015	2010, Bertino, AACR abstract no. 2596
CD20	Ритаксан и другие	U.S. Patent Application Number: US 2010/0189729 A1	NCT00258206 & NCT00505895
CD52	Капмат-1H	USPTO выданный патент № 6,569,430	NCT00625144
EGFR	Эрбитукс (Емма-1)	USPTO выданный патент № 6,217,866	NCT00368121
GM2	BIW-8962	USPTO выданный патент № 6,872,392	Biowa, no ref
α4-integrin	Натализумаб	USPTO выданный патент № 5,840,299	NCT00675428
IGF-1R	CD-751,871 фигитумумаб	USPTO выданный патент № 7,700,742 (TBD – need to connect Ab 4.9.2 to CD751,871)	Lacy, J. Clin. Oncol, 26:3196
KIR	IPH2101	USPTO выданный патент № 8,119,775	NCT00552396; 2009, ASCO abs 09-AB-3032;

CD38 вызывает особенный интерес как мишень для антител гибридных белковых конструкций по данному изобретению. Антитела к CD38 включают, например, AT13/5 (см., например, Ellis et al. (1995) J. Immunol. 155: 925-937), HB7, и так далее. В табл. 4 приведены некоторые известные антитела к CD38, которые можно использовать в этом контексте.

Таблица 4

Фирма	Название клона	Цитата последовательности	Ссылка
Genmab/ Janssen Biotech Inc	G003, G005, G024 (Даратумумаб)	W0 2006/099875 A1	De Weers, M., J Immunol. 186:1840, 2011
MorphoSys AG	MOR03077, MOR03079, MOR03080, MOR03100 (MOR202)	US 2009/0123950 A1	
Sanofi-Aventis US, LLC.	38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, 38SB39 (SAR650984)	US 2009/0304710 A1	
Tenovus UK	Химерный ОКТ10	US 2010/0285004 A1 Parental hybridoma ATCC accession: CRL- 8022	Stevenson, F., Blood. 77:1071, 1991
Immunogen	HB7-Рицин	Hybridoma: ATCC HB- 136	Goldmacher, V., Blood, 84:3017, 1994

Термин "сигнальный лиганд" при употреблении в этом тексте в широком смысле включает любой лиганд, вовлеченный в процесс активации клеточной передачи сигнала, включая любые молекулы, способные активировать или ингибировать рецепторы клеточной поверхности. Этот термин также включает ссылку на молекулы, способные проходить сквозь двойной липидный слой клеточной мембраны для активации клеточных сигнальных путей в клетке. Термин "полипептидный сигнальный лиганд" при употреблении в этом тексте означает пептидные и полипептидные последовательности длиной от 6 до 1000 аминокислот, которые связываются с определенными молекулами клеточной поверхности ("рецепторами") на некоторых клетках тем самым передают сигнал или сигналы этим клеткам. Примеры сигнальных лигандов и полипептидных сигнальных лигандов по данному изобретению включают, не ограничиваясь этим, цитокины, хемокины, факторы роста, гомоны, нейротрансмиттеры и факторы, стимулирующие апоптоз.

Неограничивающие примеры подходящих цитокинов включают интерлейкины IL-1, IL-2 IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-35 и их подсемейства; подсемейство интерферона (IFN), включая интерферон I типа (IFN- α (IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA16, IFNA17, IFNA21), IFN- β (IFN- β 1 (IFNB1) и IFN- β 3 (IFNB3)), IFN- ω ((IFNW1), IFNWP2, IFNWP4, IFNWP5, IFNWP9, IFNWP15, IFNWP18, и IFNWP19 и IFNK), интерферон II типа (IFN- γ) и интерферон III типа (IFN-эпсилон, -каппа, -омега, -дельта, -тау и -гамма) и интерфероно-подобные молекулы (лимитин, IL-28A, IL-28B, и IL-29; семейство IL-1, включая IL-1 α , IL-1 β , антагонист рецептора IL-1 (IL-1RA) и IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9 и IL1F10 и семейство IL-17 включая IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25), и IL-17F. В одном из вариантов осуществления данного изобретения пептидный или полипептидный сигнальный лиганд выбирают из группы, состоящей из IFN, IL-4 и IL-6. NOs 1-3, 80-90, 434 и 435.

Примеры хемокинов включают, например, RANTES, MCAF, MIP1-альфа, IP-10, моноцитный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1 или CCL2), интерлейкин-8 (IL-8), CXCL13, XCL1 (лимфотактин- α), XCL2 (лимфотактин- β) и фракталкин (CX3CL1).

Неограничивающие примеры факторов роста включают, например, адrenomедуллин (AM), ангиопозтин (Ang), аутокринный фактор миграции, костные морфогенетические белки (BMPs), нейротрофиче-

ский фактор головного мозга (BDNF), эпидермальный фактор роста (EGF), эритропоэтин (EPO), фибробластный фактор роста (FGF), нейротрофический фактор, происходящий от глиальной клеточной линии (GDNF), фактор, стимулирующий гранулоцитные колонии (G-CSF), фактор, стимулирующий колонии гранулоцитных макрофагов (GM-CSF), фактор дифференциации роста-9 (GDF9), фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста гепатомного происхождения (HDGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF), фактор, стимулирующий миграцию, миостатин (GDF-8), фактор роста нервов (NGF) и другие нейротрофины, фактор роста тромбоцитного происхождения (PDGF), тромбопоэтин (TPO), трансформационный фактор роста альфа ($TGF-\alpha$), трансформационный фактор роста бета ($TGF-\beta$), фактор некроза опухоли альфа ($TNF-\alpha$), васкулярный эндотелиальный фактор роста (VEGF), плацентарный фактор роста (PlGF), IL-1-кофактор для IL-3 и IL-6, IL-2- T-клеточный фактор роста, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 и IL-7.

Примеры факторов, вызывающих апоптоз, включают FasL и TRAIL.

Примеры гормонов включают пептидные гормоны, такие как TRH и вазопрессин, белковые гормоны, такие как инсулин и гормон роста, гликопротеиновые гормоны, такие как лютеинизирующий гормон, фолликул-стимулирующий гормон и тиреоид-стимулирующий гормон, гормоны, происходящие от липидов и фосфолипидов, такие как стероидные гормоны например, тестостерон и кортизол, стероловые гормоны, такие как кальцитрол и эйкозаноиды, такие как простагландины.

Неограничивающие примеры подходящих нейротрансмиттеров включают моноамины и другие биогенные амины: допамин (DA), норэпинефрин (норадреналин; NE, NA), эпинефрин (адреналин), гистамин, серотонин (SE, 5-HT), соматостатин, вещество P, опиоидные пептиды и ацетилхолин (ACh).

Связь между антителом и лигандом можно создать посредством простой пептидной связи путем создания гибридного белка между лигандом и легкой или тяжелой цепочкой антитела. Лиганд можно присоединить к N- или C-концу тяжелой или легкой цепочки антитела, с использованием или без использования промежуточной линкерной пептидной последовательности. В одном из вариантов осуществления данного изобретения лиганд связан с антителом или его антиген-связывающей частью посредством пептидной связи. В одном варианте осуществления этого изобретения, лиганд связан с C-концом тяжелой цепочки человеческого, гуманизированного или химерного IgG1, IgG2 или IgG4 напрямую или посредством промежуточного линкера длиной 1-20 аминокислот.

Мутировавшие полипептидные лиганды можно присоединить к антителу или его фрагменту путем химической конъюгации, нековалентного белок-белкового взаимодействия или генетического слияния. Конъюгация лигандов, описанных в этом тексте, с антителами могут быть легко осуществлена специалистами в данной области. Является очевидным, что общеупотребительные способы химического присоединения можно использовать для связи лигандов с антителами например, с помощью свободных аминов, карбоновых кислот или сульфгидрильных групп. Лиганды также можно связать с антителами посредством карбониллов ($-CHO$); эти альдегидные группы можно получить окислением углеводных групп гликопротеинов.

Общеупотребительные реагенты включают глутаральдегид, который связывает белковые или пептидные молекулы с N-концом или алифатическими аминными группами пептидов или полипептидов, карбодииимид (EDC), который присоединяет белки или пептиды к C-концу или карбоксильным группами боковой цепочки белков или пептидов, эфиры сукцинимиды (например, MBS, SMCC), конъюгирующие свободные аминогруппы и тиолы из Суз остатков, бензидин (BDB) который связывается с Туг остатками, перйодат, который связывается с углеводными группами и изотиоцианатом. Также включено применение коммерчески доступных конъюгационных наборов.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, метки присоединяют с помощью спейсеров различной длины для уменьшения потенциального стерического препятствия. Например, химический линкер можно использовать между лигандом и антителом. Примеры линкерных последовательностей хорошо известны специалистам в этой области и включают такие линкеры, как C6, C7 и C12 аминные модификаторы и линкеры, включающие тиоловые группы.

Антитело-лиганд гибридные белковые конструкции по данному изобретению включают мутации или удаления в лигандах, которые делают лиганды менее активными при стимулировании их рецепторов на клетках, не экспрессирующих на своей поверхности антиген, с которым связывается антитело.

αααβαααααααααααααβ

αα
ααβαααα

Данное изобретение также описывает комбинацию конструкций по данному изобретению с другими медикаментами и/или в дополнение к другим режимам или способам лечения, таким как хирургия и радиационная терапия. Когда конструкции по данному изобретению используются в комбинации с известными терапевтическими агентами, эти комбинации могут вводиться как последовательно (непрерывно или с перерывами) так и одновременно или в виде смеси. В случае рака, ряд известных противоопухолевых агентов может использоваться таким образом. Лечение в комбинации также включает лечение

любой конструкцией по данному изобретению с последующим лечением известным способом, или лечение известным лекарством с последующим лечением конструкцией по данному изобретению, например, в качестве поддерживающей терапии. Например, при лечении рака предполагается, что конструкции по данному изобретению могут вводиться в комбинации с алкилирующим агентом (таким, как мехлоретамин, циклофосфамид, хлорамбуцил, ифосфамидцисплатин или платина-содержащие алкилирующие агенты, такие как цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин), антиметаболитом (таким как аналог пурина или пиримидина или антифолатный агент, такой как азатиоприн и меркаптопурин), антрациклином (таким как даунорубин, доксорубин, эпирубицин, идарубин, валрубицин, митоксантрон или аналог антрациклина), растительным алкалоидом (таким как алкалоид барвинка или таксан, такой как винкристин, винбластин, винорелбин, виндезин, паклитаксел или дозетаксел), ингибитором типизомеразы (таким как ингибитор типизомеразы I или II типа), подофиллотоксином (таким как этопозид или тенипозид), или ингибитором тирозин киназы (таким как иматиниб мезилат, нилотиниб или дасатиниб).

В случае лечения множественной миеломы, предполагается, что конструкции по данному изобретению могут вводиться в комбинации с текущим лечением, таким как стероиды такие как дексаметазон, ингибиторы протеасомы (такие как бортезомиб или карфилзомиб), иммуномодуляторные медикаменты (такие как талидомид, леналидомид или помалидомид), или индукционная химиотерапия с последующей трансплантацией аутологичных гематопозитических стволовых клеток, с применением или без применения других химиотерапевтических агентов, таких как мелфалан гидрохлорид или вышеперечисленные химиотерапевтические агенты.

В случае лечения лимфомы Ходжкина предполагается, что конструкции по данному изобретению могут вводиться в комбинации с текущим лечением, таким как ABVD (адриамицин (доксорубин), блеомицин, винбластин и дакарбазин), или Stanford V (доксорубин, блеомицин, винбластин, винкристин, мехлоретамин, этопозид, преднизолон), или BEACOPP (доксорубин, блеомицин, винкристин, циклофосфамид, прокарбазин, этопозид, преднизолон).

В случае неходжкинской лимфомы или других лимфом предполагается, что конструкции по данному изобретению могут вводиться в комбинации с текущим лечением. Примеры медикаментов, одобренных при лимфоме не Ходжкина, включают абитрексат (метотрексат), адриамицин PFS (доксорубин гидрохлорид), адриамицин RDF (доксорубин гидрохлорид), амбохлорин (хлорамбуцил), арранон (неларабин), бендамустин гидрохлорид, бексар (тозитумомаб и йод I 131 тозитумомаб), бленксан (блеомицин), блеомицин, бортехомиб, хлорамбуцил, клафен (циклофосфамид), циклофосфамид, цитоксан (циклофосфамид), денилэйкин дифтитокс, депоцит (липосомальный цитарабин), доксорубин гидрохлорид, DTIC-Dome (дакарбазин), фолекс (метотрексат), фолекс PFS (Метотрексат), фолотин (пратрексат), ибритумомаб тиуксетан, истодакс (ромидепсин), лейкокеран (хлорамбуцил), линфолизин (хлорамбуцил), липосомальный цитарабин, матулан (прокарбазин гидрохлорид), метотрексат, метотрексат LPF (метотрексат), мексат (метотрексат), мексат-AQ (метотрексат), мозобил (плериксафор), неларабин, неосар (циклофосфамид), онтак (денилэйкин дифтитокс), плериксафор, пратрексат, ритуксан (ритуксимаб), ритуксимаб, ромидепсин, тозитумомаб и йод I 131 тозитумомаб, треанда (бендамустин гидрохлорид), велбан (винбластин сульфат), велкаде (бортехомиб), велсар (винбластин сульфат), винбластин сульфат, винкасар PFS (винкристин сульфат), винкристин сульфат, вориностат, зевалин (ибритумомаб тиуксетан), золинза (вориностат). Примеры комбинаций медикаментов, применяемых при лечении неходжкинской лимфомы, включают CHOP (C = циклофосфамид, H = доксорубин гидрохлорид (гидроксиддауномицин), O = винкристин сульфат (онковин), P = преднизолон); COPP (C = циклофосфамид, O = винкристин сульфат (онковин), P = прокарбазин гидрохлорид, P = преднизолон); CVP (C = циклофосфамид, V = винкристин сульфат, P = преднизолон); EPOCH (E = этопозид, P = преднизолон, O = винкристин сульфат (онковин), C = циклофосфамид, H = доксорубин гидрохлорид (гидроксиддауномицин)); ICE (I = ифосфамид, C = карбоплатин, E = этопозид) и R-CHOP (R = ритуксимаб, C = циклофосфамид, H = доксорубин гидрохлорид (гидроксиддауномицин), O = винкристин сульфат (онковин), P = преднизолон).

Также предполагается комбинация ретиноидов с гибридными белковыми конструкциями на основе интерферона. Ретиноиды являются семейством молекул, играющих главную роль во многих биологических функциях, включая рост, зрение, репродукцию, дифференциацию эпителиальных клеток и иммунную функцию (Meyskens, F. et al. Crit Rev Oncol Hematol 3:75, 1987, Herold, M. et al. Acta Dermatovenereol 74:29 1975). Ранние доклинические исследования ретинола полностью транс-ретиноловой кислоты или ATRA одной или в комбинации с другими агентами, показали активность против острой промиелоцитарной лейкемии (APL), миелодиспластического синдрома, хронического миелолейкоза, грибовидного микоза и множественной миеломы (см. Smith, M. J. Clin. Oncol. 10:839, 1992). Эти исследования привели к одобрению ATRA для лечения APL. В данное время существует более 100 клинических исследований, оценивающих активность ATRA в комбинации с другими медикаментами для лечения гематологического рака, рака почек, рака легких, плоскоклеточной карциномы и т.д. Особенно интересными и напрямую касающимися этого изобретения являются исследования, демонстрирующие повышенную эффективность лечения интерфероном- α в комбинации с ATRA. Это описано в отношении лимфома мантийных клеток (Col, J. et al. Cancer Res. 72:1825, 2012), почечноклеточного рака (Aass, N. et al. J. Clin. Oncol. 23:4172, 2005; Motzer, R. J. Clin. Oncol. 18:2972, 2000), хронического миелолейкоза, меланомы, миеломы

и почечноклеточного рака (Kast, R. Cancer Biology and Therapy, 7:1515, 2008) и рака груди (Recchia, F. et al. J. Interferon Cytokine Res. 15:605, 1995). Поэтому авторы данного изобретения предсказывают повышенную активность целевых аттенуированных IFN в комбинации с терапевтическими дозами ATRA. Кроме того, Mehta (Mol Cancer Ther 3(3):345-52, 2004) продемонстрировал что *in vitro* лечение лейкемии клеток ретиноидной кислотой стимулирует экспрессию CD38 антигена. Таким образом, повышенная эффективность интерферона плюс стимулированная экспрессия целевого CD38 будет означать комбинационную терапию ATRA с анти-CD38 антитело-аттенуированный IFN α при лечении IFN-чувствительного рака экспрессирующего CD38 или стимуляцию ATRA экспрессии CD38. Примерами таких раков являются множественная миелома, неходжкинская лимфома, хронический миелолейкоз и AML.

$\alpha\alpha\beta\beta\beta$

В одном из вариантов осуществления данного изобретения, аттенуированную разновидность IL-14 или IL-16 можно присоединить к антителу, нацеленному на маркер клеточной поверхности, специфичный для Т клеток, для лечения заболеваний, при которых IL-14 или IL-16 может быть эффективным.

Таким образом, в одном аспекте по данному изобретению, аттенуированный IL-14 или IL-16 прикрепляют к анти-CD3 антителу, нацеленному на все Т клетки, которые включают CD4⁺, CD8⁺, Treg, Th1, Th2 и Th17 клетки. Примеры CD3 антител, которые можно инкорпорировать в гибридные белковые конструкции по данному изобретению, приведены в табл. 8.

Таблица 8

CD3 Антитела			
Ab Клоны	Патент	Владелец	Комментарии
TF NSO CD3A.122	US 7,994,289	BTG International	Гуманизированное
M291	US 7,381,803	PDL BioPharma	Гуманизированное
28F1, 27H5, 23F10, 15C3	US 7,728,114	Novimmune S.A.	Человеческий

Альтернативным образом, гибридная белковая конструкция "аттенуированный IL-4 или аттенуированный IL-6-анти-CD4" представляет более ограниченный подход, нацеленный на аутореактивные и регуляторные Т клетки, включая Th1 и Th17 клетки и CD4⁺CD25⁺ Treg клетки. Примеры CD4 антител, которые можно инкорпорировать в гибридные белковые конструкции по данному изобретению приведены в табл. 9.

Таблица 9

CD4 Антитела			
Ab Клоны	Патент	Владелец	Комментарии
CE9.1	US 7,452,534	Biogen Idec	Не-человеческие приматные переменные участки
TRX1	US 7,541,443	Tolerx	Гуманизированное
1E11, 1G2, 6G5, 10C5, 4D1	US 8,231,877	GenPharm	Человеческое

Примеры CD8 антител приведены в табл. 10.

Таблица 10

CD8 Антитела			
Аб Клоны	Патент	Владелец	Комментарии
37B1, 8G6	US 7,247,474	Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc.	Гибридомы направлены в ATCC (HB-12441, HB-12657)
ОКТ8	US 4,361,550	Ortho Pharmaceutical Corporation	Гибридома направлена в ATCC (CRL-8014)
Несколько примеров	US2009/0304659	Baylor Research Institute	

Маркеры активированных Т клеток, включая, но не ограничиваясь ими, CD25, CD38, CD44, CD69, CD71, CD83, CD86, CD96, HLA-DR, ICOS и PD-1, также представляют собой привлекательные мишени для этого подхода. Антитела, нацеленные на любые из этих антигенов, можно присоединить к аттенуированному IL-4 или аттенуированному IL-6. Примеры антител, которые можно использовать в данном изобретении, включают следующие: CD71 антитела включая BA120g (US 7736647) и различные антитела упомянутые в Wang et al (Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao (Academic journal of the first medical college of PLA) 22(5):409-411, 2002). Примеры антител к CD83 включают 20B08, 6G05, 20D04, 11G05, 14C12, 96G08 и 95F04 (US 7,700,740). Примеры антител к CD86 включают 1G10H6D10 (US 6,071,519). HLA-DR антитела включают HD3, HD4, HD6, HD7, HD8 и HD10 (US 7,262,278), DN1921 и DN1924 (US2005/0208048). Одной из привлекательных мишеней среди этих линий может быть PD-1, которое экспрессируется на недавно активированных Т клетках. В идеальном случае можно использовать не-антагонизирующее антитело, такое как J110 антитело, подробно описанное ниже.

Примеры антител к ICOS включают JMabs (US 6,803,039) и JMab 136 (US 2011/0243929).

Дальнейшие примеры антител к этим мишеням приведены в табл. 11 и 12.

Таблица 11

CD25 Антитела			
Аб Клоны	Патент	Владелец	Комментарии
‘Анти-tac’ Abs	US 5,530,101	PDL, Inc	даклизумаб
RFT5	US 6,521,230	Novartis AG	Химерное, ингибирует MLR
AB1, AB7, AB11, AB12	US 8,182,812 (или US 7,438,907)	Genmab A/S	Человеческие антитела, предотвращают CD25-IL-2 взаимодействие и ингибируют MLR

Таблица 12

CD44 Антитела			
Ab Клоны	Патент	Владелец	Комментарии
H90	US2007/0237761		Химерное
1A9, 2D1, 14G9, 10C8	US2010/0092484		Человеческий
SACK-1	US 7,816,500	Sackstein	Связывает CD44 гликоформы

В другом варианте осуществления данного изобретения, аттенуированные разновидности IL-4 или IL-6 могут быть слиты с антителом, нацеленным на маркеры клеточной поверхности миелоидных клеток, известных как участвующие в MS патогенезе вызывая активацию и дифференциацию Т клеток. Например, пан-миелоидные маркеры CD33, CD115 или маркеры дендритных клеток CD11c могут использоваться как мишени. Подход с широким нацеливанием может быть предпочтительным, например, при использовании антител против CD33 или CD115.

Антитела к CD33, которые можно использовать в данном изобретении, включают My9-6 (US 7,557,189), любые из 14 антител, описанных в патентной заявке США № US2012/0082670, или антитело, известное как huM195 (US 5693761). Антитела к CD115, которые можно использовать, включают Ab1 и Ab16 (US 8,206,715) или CXIIIG6 (US2011/0178278). Примером CD11c антитела, которые можно использовать в соответствии с данным изобретением, является mab 107 (US 7,998,738, ATCC номер РТА-11614). Аттенуированный IL-4 или аттенуированный IL-6 можно альтернативным образом нацелить на CD14 антиген, присутствующий в основном на макрофагах. Примеры CD14 антител приведены в табл. 13.

Таблица 13

CD14 Антитела			
Ab Клоны	Патент	Владелец	Комментарии
4C1	US 6,245,897	Seikagaku Corporation	Mouse Ab
F1024-1-3	US 7,264,967	Mochida Pharmaceutical Co.	Гуманизированное, ингибирует CD14/TLR связывание
F1024, F1031-13-2	US 8,252,905/ US 2008/0286290	Mochida Pharmaceutical Co.	Часть гибридных белков с протеазой

В другом варианте осуществления данного изобретения, нацеленные на CD52-экспрессию клетки доставляют аттенуированный IL-4 или аттенуированный IL-6 ко всем лимфоцитам и, кроме того, моноцитам и периферическим дендритным клеткам (Buggins, 2002 Blood 100:1715; Ratzinger, 2003 Blood 101:1422). Этот подход направляет активность аттенуированного IL-4 или аттенуированного IL-6 на ключевые типы клеток, известные как напрямую подверженные влиянию IL-4 или IL-6 и способствует его терапевтической активности. Примеры CD52 антител, которые можно использовать в соответствии с данным изобретением включают, не ограничиваясь этим, DIVHv5/DIVKv2 (US 7,910,104), любые из CD52 антител, описанных в (US 2012/0100152) или CAMPATH.

Любые из вышеупомянутых антитело-направленных гибридных белковых конструкций с аттенуированным IL-4 или аттенуированным IL-6 могут обладать терапевтической активностью в контексте многих воспалительных и аутоиммунных заболеваний, благодаря их общей иммунологической этиологии.

Рассматриваемые аутоиммунные заболевания включают inter alia очаговая алопеция, анкилози-

рующий спондилоартрит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную болезнь Аддисона, множественный склероз, аутоиммунные заболевания надпочечников, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный оофорит и орхит, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, целиакийный спру-дерматит, синдром хронической усталости (CFIDS), хроническое воспалительное демиелинизирование, хронические воспалительные полинейропатии, синдром Черджа-Стросса, рубцовый пемфигоид, синдром Тибержа-Вейсенбаха, синдром холодовой агглютинации, болезнь Крона, синдром раздраженного кишечника, воспалительные заболевания кишечника, герпетический дерматит, дискоидную волчанку, криоглобулинемию смешанного типа, фибромиалгии, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, идиопатический легочный фиброз, идиопатическую тромбоцитопению пурпура (ITP), IgA нефропатию, инсулинозависимый сахарный диабет (тип I), красный плоский лишай, красную волчанку, болезнь Меньера, смешанное заболевание соединительной ткани, множественный склероз, тяжелую псевдопаралитическую миастению, миокардит, пузырчатку обыкновенную, злокачественную анемию, узелковый полиартрит, полихондрит, плюригландулярные синдромы, ревматическую полимиалгию, полимиозит и дерматомиозит, паучит, первичную агаммаглобулинемию, первичный билиарный цирроз, псориаз, синдром Рейно, синдром Рейтера, ревматический полиартрит, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, синдром мышечной скованности, системную красную волчанку, артериит Такаясу, височный артериит / синдром Хортона-Магата-Брауна, язвенный колит, увеит, васкулит и витилиго.

α

Примеры воспалительных заболеваний, рассматриваемых в данном изобретении включают, не ограничиваясь этим, такие заболевания и расстройства, которые имеют своим результатом покраснение, отек, боль, и ощущение тепла в определенных местах, призванное защитить ткани, пострадавшие от повреждения или болезни. Воспалительные заболевания, которые можно лечить с помощью способов по данному изобретению, включают, не ограничиваясь этим, акне, ангину, артрит, аспирационную пневмонию, эмпиему, гастроэнтерит, воспаление, желудочный грипп, некротизирующий энтероколит (NEC), воспалительное заболевание тазовых органов, фарингит, ущемление межпозвоночного диска (PID), плеврит, боль в горле, красноту, покраснение кожи, боль в горле, гастроэнтерит и инфекции мочеполового тракта, хроническую воспалительную демиелинизирующую полиневропатию, хроническую воспалительную демиелинизирующую полирадикулонейропатию.

βββ

βαβαβαα

Примеры антител к FAP и PDGF рецепторам приведены в табл. 15 и 16.

Таблица 15

FAP Антитела			
Ab Клоны	Патент	Владелец	Комментарии
MFP5, BIBN1	US2009/0304718	Boehringer Ingelheim USA Corporation	Гуманизированное
Many	US2012/0128591	Bacac <i>et al.</i>	Гуманизированное
F19	US2003/0143229	Boehringer Ingelheim International GmbH	

Таблица 16

PDGFR- α и - β Антитела			
Ab Клоны	Патент	Владелец	Комментарии
2.175.3, 2.499.1, 2.998.2	US 7,754,859	AstraZeneca AB	Человеческий abs против PDGFR α
IMC-3G3	US2012/0027767	Imclone LLC	Человеческий abs против PDGFR α
2C5	US2012/00221267	Imclone LLC	Человеческий abs против PDGFR β

 $\alpha\alpha$

Интерлейкин-4 (IL-4), является цитокином, стимулирующим дифференциацию наивных CD4⁺ Т клеток в Th2 клетки. После активации, Th2 клетки производят больше IL-4, и в результате IL-4 считается главным побудителем Th2-опосредствованных иммунных ответов. Концепцию Th1/Th2 дисбаланса (в пользу Th1), влияющего на аутоиммунные и другие воспалительные заболевания, впервые озвучили в 1980-х (см. Kidd, 2003 Altern Med Rev 8:223), и задокументировали роль Th1/Th17 клеток как стимулятора псориаза (Ghoreschi, 2007 Clin Dermatol 25:574), определенных типов воспалительного заболевания кишечника, особенно болезни Крона (Sanchez-Munoz, 2008 World J Gastroenterol 14:4280), или тяжелых форм астмы (Hansbro, 2011 Br J Pharmacol 163:81).

В доклинических моделях инфекционных заболеваний, отклонение иммунного ответа от Th1 к Th2 и активация макрофагов IL-4, защищенным от иммунопатологии (Hunig, 2010 Med Microbiol Immunol 199:239), и IL-4 терапия пациентов, страдающих псориазом, привела к стимуляции дифференциации Th2 и улучшению клинических показателей (Ghoreschi, 2003 Nat Med 9:40).

Переключение на Th2 может привести к терапевтическому преимуществу при некоторых типах диабета. Этого можно достичь доставкой IL-4 к CD4⁺ Т клеткам, или же можно направить активность IL-4 на макрофаги для защиты от иммунопатологии (Ghoreschi, 2007 Clin Dermatol 25:574; Hunig, 2010 Med Microbiol Immunol 199:239).

Аттенуирующие мутации в IL-4 которые можно использовать при дизайне гибридных белковых конструкций "антитело-аттенуированный IL-4" по данному изобретению включают перечисленные в табл. 17.

Таблица 17

Разновидность IL4	$K_{off} \times 10^3 \text{ s}^{-1}$	EC ₅₀ Т-клеточная пролиферация (нмоль/л)
IL4	2,1	0,12
I5R	8,7	
T6D	15	
E9Q	270	3,1
R81E	6,1	
K84D	9,3	
R88Q	140	2,5
R88A	760	8,1
N89R	6,1	
W91D	8,5	

ND. Специфического связывания не обнаружено.

Мутанты IL-4 в этой таблице, свойства их связывания и биологическая активность были описаны в Wang Y, Shen B and Sebald W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997 March 4; 94(5): 1657-62.

В другом примере интерлейкин-6 (IL-6) также может быть аттенуирован и нацелен на определен-

ные типы клеток. Механизм, с помощью которого рак избегает противораковой иммунной активности, заключается в том, что Treg клетки вовлекаются в опухолевую среду, что приводит к толерантности в местах образования опухолей. IL-6 является цитокином, участвующим в регулировании баланса между клетками Treg и Th17, и стимулирующим развитие Th17 клеток, и при этом ингибирующим дифференциацию Treg (Kimura, 2010 Eur J Immunol 40:1830).

IL-6, благодаря направлению дифференциации наивных CD4⁺ Т клеток в сторону линии Th17 или перепрограммированию Th17 клеток, обладает потенциалом для инверсии ассоциированного с раком иммунного подавления Treg клетками в контексте рака, тем самым позволяя иммунной системе контролировать рак.

Эта стратегия оказалась успешной в мышинной модели рака поджелудочной железы, при которой мыши, получившие инъекцию раковых клеток, экспрессирующих IL-6, продемонстрировали существенную задержку роста раковой опухоли и увеличение выживания, сопровождающееся увеличением количества Th17 клеток в микроокружении опухоли, в сравнении с мышами с раковыми клетками, не экспрессирующими IL-6 (Gnerlich, 2010 J Immunol 185:4063).

Адоптивный перенос Т клеток является эффективным способом лечения солидных (Rosenberg, 2011 Clin Cancer Res 17:4550) и гематологических (Kochenderfer, 2012 Blood 119:2709) злокачественных опухолей. Анализ пяти различных клинических исследований, в ходе которых адоптивный перенос Т-клеток осуществляли в различных предварительных условиях, показал, что глубина и продолжительность истощения Treg коррелирует с клинической реакцией, что подтверждает важную роль остаточных Tregs в контроле противоракового ответа (Yao, 2012 Blood 119:5688). Прямая связь между выжившими Tregs и эффективность терапии адоптивного переноса у мышей говорит в пользу этих клинических наблюдений (Baba, 2012 Blood 120:2417).

Важность Tregs в процессе контроля противораковой активности также подтверждается существенным увеличением гуморального ответа на пептидную вакцинацию у пациентов с глиобластомой после истощения Tregs с помощью анти-IL-2 рецепторного антитела даклизумаба (Sampson, 2012 PLoS ONE 7:e31046).

В целом, опубликованные данные свидетельствуют о роли Tregs в ингибировании иммунного ответа, направленного против рака. Направление активности IL-6 на CD4⁺ клетки с целью стимулировать дифференциацию Th17 и понизить образование Treg влечет за собой усиление противоракового ответа. Этого можно добиться с применением или без применения сопутствующих вакцинационных стратегий. Слияние аттенуированного IL-6 с антителом против антигена Т-клеток (например, нацеленного на CD4) или активированного антигена Т-клеток (такого как PD-1) предоставляет комплексную доставку напрямую к целевым клеткам.

Аттенуированные мутанты IL-6 включают перечисленные в табл. 18.

Таблица 18

Разновидности IL6	Связывание (в % от дикого типа)	EC ₅₀ в анализе стимуляции роста XG-1 (пг/мл)
IL6	100	600
F74E	1	Низкая активность
F78E	5	Низкая активность
R168M	2	Низкая активность
R179E	Не обнаружено	Низкая активность
R179W	Не обнаружено	Низкая активность

Эти мутанты IL-6 и их свойства были описаны в Kalai M et.al. Blood. 1997 Feb 15;89(4):1319-1333.

Во многих аспектах данного изобретения упоминаются специфические мутации в различных лигандах. При этом, специалисту в данной области известны способы идентификации и других мутаций в сигнальных лигандах, также как и способы мутагенеза белков. Такие способы включают случайный мутагенез, например, обработку белка UV радиацией или мутагенными химикатами и выбор мутантов с желаемыми характеристиками. Случайный мутагенез также можно осуществить с использованием активированных нуклеотидов в олигонуклеотидном синтезе, или проводя PCR реакцию в условиях, повышающих ошибку включения нуклеотида, тем самым получая мутанты. Другой методикой является сайт-направленный мутагенез, с помощью которого вносят специфические изменения в ДНК. Одним примером сайт-направленного мутагенеза является использование мутагенных олигонуклеотидов в реакции удлинения праймера с ДНК полимеразой. Этот способ позволяет проводить точечную мутацию, или удаление или внедрение маленьких фрагментов ДНК в определенные места. Сайт-направленный подход может осуществляться систематически в виде аланин-сканированного мутагенеза, при котором остатки система-

тически мутируют в аланин и определяется его эффект на пептидную активность. Каждый из аминокислотных остатков пептида анализируется таким образом для определения важных участков пептида.

Другим примером является комбинированный мутагенез, позволяющий проводить скрининг большого количества мутантов на определенную характеристику. При этом подходе, несколько выбранных позиций или короткий фрагмент ДНК истощающе модифицируют для получения полной библиотеки мутантных белков. Одним из подходов этой методики является удаление части ДНК и замена библиотечной последовательностей, содержащих все возможные комбинации в желаемых центрах мутации. Этот сегмент может быть в ферментно-активном центре или последовательностях, обладающих структурной значимостью или иммуногенным качеством. Сегмент, однако, может быть случайным образом вставлен в ген с целью оценки структурной или функциональной значимости определенной части белка.

Способы скрининга мутировавших лигандов для определения эффективности включают анализ на присутствие комплексов между лигандом и мишенью. Одна форма анализа включает анализы конкурентного связывания. При таких анализах конкурентного связывания, на мишень обычно наносят метку. Свободную мишень отделяют от любых предполагаемых комплексов и количество свободной (т.е. не-комплексированной) метки является мерой связывание проверяемого агента с целевой молекулой. Также можно измерять количество связанной, а не свободной мишени. Также возможно наносить метку на соединение, а не на мишень, и измерять количество соединения, связывающегося с мишенью в присутствии и отсутствии проверяемого медикамента.

Одним примером бесклеточного анализа является анализ связывания. Без прямой связи с функцией, способность модулятора связывать целевую молекулу определенным образом является надежным свидетельством соответствующего биологического эффекта. Например, связывание молекулы с мишенью может само по себе быть ингибирующим вследствие стерических, аллостерических или заряд-зарядных взаимодействий. Цель может быть свободно растворена, прикреплена к носителю, экспрессировать в клетке или на ее поверхности. Как мишень, так и соединение могут быть помечены, тем самым позволяя обнаружить связывание. Обычно метку несет мишень, что уменьшает возможность помехи или усиления связывания из-за метки. Конкурентное связывание может быть проведено с участием меченых агентов, и таким образом можно измерить количество свободной метки по отношению к связанной метке для определения влияния на связывание.

В зависимости от анализа могут понадобиться клеточные культуры. Клетки проверяют с помощью любого из ряда физиологических анализов. Альтернативным образом, можно провести молекулярный анализ, например, белковой экспрессии, экспрессии мРНК (включая дифференциальный дисплей целой клетки или полиА РНК) и другие. Неограничивающие примеры *in vitro* биологических анализов, которые можно использовать для скрининга разновидностей белков, показаны в Примерах ниже и также включают анализы апоптоза, миграции, инвазивные анализы, анализы активации каспазы, анализы производства цитокина, и так далее.

Это изобретение также описывает композиции, включающие полипептиды по данному изобретению. Эти композиции могут далее включать по меньшей мере один из подходящих дополнительных агентов, таких как, не ограничиваясь этим, разбавитель, связывающее вещество, стабилизатор, буферные составы, соли, липофильные растворители, консерванты, адъюванты и так далее. Фармацевтически приемлемые дополнительные агенты являются предпочтительными. Неограничивающие примеры и способы получения стерильных растворов известны в данной области, и включают такие как описанные, не ограничиваясь этим, в Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, Pa.) 1990. Фармацевтически приемлемые носители выбирают в зависимости от подходящего способа приема, растворимости и/или стабильности композиции антителя, в соответствии с известным в этой области или с описанным в этом тексте.

Фармацевтические наполнители и добавки, пригодные для использования в композициях по данному изобретению, включают, не ограничиваясь этим, белки, пептиды, аминокислоты, липиды и углеводы (например, сахара, включая моносахариды, ди-, три-, тетра-, и олигосахариды; производные сахаров, такие как альдитолы, альдоновые кислоты, эстерифицированные сахара и так далее; а также полисахариды и сахарные полимеры), которые можно применять отдельно или в комбинациях, в количестве 1-99,99% по весу или объему. Примеры белковых наполнителей включают сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин (HSA), рекомбинантный человеческий альбумин (гНА), желатин, казеин, и так далее. Примеры аминокислот которые могут служить буферным агентом включают аланин, глицин, аргинин, бетаин, гистидин, глютаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам, и так далее. Одной предпочтительной аминокислотой является гистидин. Другой предпочтительной аминокислотой является аргинин.

Углеводные наполнители, подходящие для использования в данном изобретении включают, например, моносахариды, такие как фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза, и так далее; дисахариды, такие как лактоза, сахароза, трегалоза, целобиоза, и так далее; полисахариды, такие как раффиноза, мелезитоза, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы, и так далее; и альдитолы, такие как маннитол, ксилитол, мальтитол, лактитол, ксилитол, сорбитол (глюцитол), миоинозитол и так далее. Предпочтительными углеводными наполнителями для использования в данном изобретении являются

маннитол, трегалоза, и раффиноза.

Композиции антител также могут включать буферы или pH регулирующие агенты; обычно буфер является солью, приготовленной из органической кислоты или основания. Примеры буферов включают соли органических кислот, такие как соли лимонной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, карбоновой кислоты, винной кислоты, янтарной кислоты, уксусной кислоты или фталиевой кислоты; Tris, трометамин гидрохлорид, или фосфатные буферы. Предпочтительными буферами для использования в композициях по данному изобретению являются соли органических кислот, такие как цитрат.

Кроме того, композиции по данному изобретению могут включать полимерные наполнители/добавки, такие как поливинилпирролидоны, фикоиллы (полимерные сахара), декстраты (например, циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин), полиэтиленгликоли, ароматические агенты, антимикробные агенты, подсластители, атниоксиданты, антистатические агенты, поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты, такие как "TWEEN® 20" и "TWEEN® 80"), липиды (например, фосфолипиды, жирные кислоты), стероиды (например, холестерол), и хелатирующие агенты (например, EDTA).

Эти и другие известные фармацевтические известные наполнители и/или добавки, подходящие для использования в композициях, содержащих антитела по данному изобретению, являются известными в этой области, например, как описано в "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19 th ed., Williams & Williams, (1995), и в "Physician's Desk Reference", 52 nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ. (1998), содержание которых является включенным в этот документ во всей полное посредством ссылки. Предпочтительными носителями или наполнителями являются углеводы (например, сахараиды и альдитолы) и буферы (например, цитрат) или полимерные агенты.

При употреблении в этом документе, термин "включает", или его разновидности, такие как "содержит" или "содержащий", следует понимать как охватывающий включение указанного элемента, числа или стадии, или групп элементов, чисел или стадий, но не исключающий любых других элементов, чисел или стадий или групп элементов, чисел или стадий.

Все публикации, упомянутые в этом описании, являются включенными в него посредством ссылки. Все дискуссии относительно документов, актов, материалов, устройств, статей и т.д., включенные в данное описание, присутствуют исключительно для предоставления контекста данного изобретения. Не следует допускать, что любой или все из упомянутых образуют часть уровня техники или являлись частью общего знания в области, релевантной данному изобретению в Австралии или где-либо еще до даты приоритета каждого пункта формулы данной патентной заявки.

Необходимо заметить, что при употреблении в этом описании, все упоминания единственного числа включают множественное число, если контекст ясно не указывает на иное. Так, например, ссылка на единственное число включает также две или более единицы обсуждаемой сущности и т.д.

В поддержку общего описания изобретения и для более полного его понимания приводятся ниже следующие примеры, которые используются исключительно в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничивающие это изобретение.

Примеры, иллюстрирующие изобретение

Получение гибридных белковых конструкций "антитело-IFN α ".

Экспрессионные векторы.

ДНК, кодирующую переменные участки ритуксимаба (Anderson et al., Патент США 5,843,439, Dec. 1, 1998) и паливизумаба (Johnson, Патент США 5,824,307, Oct. 20, 1998), получили из 18 (тяжелая цепочка) и 16 (легкая цепочка) ДНК олигонуклеотидов, которые были созданы в соответствии с опубликованными аминокислотными последовательностями с помощью основанной на PCR генной сборки. ДНК, кодирующую переменные участки G005 анти-CD38 и nBT062 анти-CD138 моноклональных антител были взяты из публикаций De Weers et al. (Патент США 7829673) и by Daelken et al. (WO 2009/080832), соответственно, и синтезированы в Integrated DNA Technology, Inc. (Coralville, IA) после модификации последовательности для удаления редких кодонов и нежелательных ограничивающих сайтов.

ДНК последовательности, кодирующие переменные участки античеловеческого HLA (HB95), анти-человеческого PD-1 (J110) и антивируса желтой лихорадки (2D12) моноклональных антител были определены после клонирования из гибридомы W6/32 (ATCC HB-95, Barnstable et al. (1978), Cell 14:9-20), J110 (International Patent Organism Depository FERM-8392, Iwai et al. (2002), Immunol. Lett, 83:215-220) и 2D12 (ATCC CRL-1689, Schlesinger et al. (1983), Virol. 125:8-17), соответственно, с использованием наборов SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech, Mountain View, CA) и Mouse Ig-Primer Sets (Novagen/EMD Chemicals, San Diego, CA). Определение последовательности и субклонирование новых выделенных анти-CD38 антител описаны в следующих секциях.

ДНК, кодирующая человеческий интерферон- α 2b (IFN α 2b; аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 3) была выделена из геномной ДНК клеточной линии HEK с помощью PCR. Последовательности человеческого интерферона- β 1 (IFN β 1, SEQ ID NO: 91), человеческого интерлейкина-4 (IL-4, SEQ

ID NO: 119) и человеческого интерлейкина-6 (IL-6, SEQ ID NO: 123) были сконструированы из белковых последовательностей, таких как NP_002167, NP_000580 и NP_000591, соответственно, и синтезированы в Integrated DNA Technology, Inc. (Coralville, IA) или GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ) с помощью способов, хорошо известных в этой области. Изменения в цитокинных последовательностях, например добавление линкеров или точечные мутации, вносились в цитокиновые гены с помощью методики PCR, хорошо известной в этой области.

Цитокин-кодирующие генные фрагменты были затем клонированы в рТТ5 экспрессионный вектор (Durocher, Nucleic Acids Research volume 30, number 2, pages E1-9, 2002) содержащий полный или частичный константный участок тяжелой цепочки человеческого IgG1 (такой как Swissprot accession number P01857), константный участок тяжелой цепочки человеческого IgG4 (такой как Swissprot accession number P01861 включающий замещение S228P), константный участок человеческого Ig каппа (Swissprot accession number P01834) или константный участок человеческого Ig лямбда (Swissprot accession number P0CG05), в виде голого Ig или в форме слияния с цитокинным геном, с помощью методики PCR и участков рестрикции, в соответствии со способами клонирования, хорошо известными специалистам в этой области.

Получение гибридных белковых конструкций IgG и IgG интерферонов.

ДНК плазмиды, кодирующие IgG и IgG-цитокин гибридные белковые конструкции, были получены с помощью набора Plasmid Plus Maxi kit (Qiagen, Valencia, CA) и трансфектированы в HEK293-6E клетки (CNRC, Montreal, Canada) выращенные в F17 синтетической среде с добавкой 0,1% Pluronic F-68, 4 mM L-глутамина (Invitrogen, Carlsbad, CA) с помощью коммерчески доступного трансфекционного реагента и среды OptiMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA). После экспрессии в течение 6 дней в инкубаторе с 5% CO₂ и легким потряхиванием, культурную среду выделили и подвергли IgG аффинной очистке с помощью белок G-агарозных гранул (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Очищенные IgG и IgG-цитокин гибридные белковые конструкции затем сконцентрировали и обработали фосфатным буферным солевым раствором (PBS) pH 7,4 с помощью устройства для фильтрования Amicon Ultra centrifugal filter devices (Millipore, Billerica, MA), с последующим определением концентрации белка с помощью NanoDrop 2000 спектрофотометра (Thermo Scientific, Waltham, MA).

Хотя различные антитело-цитокин гибридные белковые конструкции экспрессировались в НЕК системе с различными выходами, несколько из них, в особенности несколько из основанных на IFN α , были произведены в количестве по меньшей мере 100 мг/л среды, демонстрируя высокую растворимость и отсутствие агрегации, как было показано с помощью эксклюзионной хроматографии.

Аминокислотные последовательности антител и гибридных белковых конструкций "антитело-лигандная конструкция" описаны ниже. Для гибридных белковых конструкций "антитело-цитокин" в которых цитокин был слит с С-концом тяжелой или легкой цепочки, использовалась следующая конвенсия названия:

[название таб]-[связь с тяжелой цепочкой ("HC") или легкой цепочкой ("LC")]-[название линкера]-[название лиганда] [(мутация)] [изотип].

Так, например, конструкция "ритуксимаб-НС-L6-IFN α (A145G) IgG1" является антителом ритуксимаб, с IFN α 2b (с A145G точечной мутацией), связанным с С-концом тяжелой цепочки IgG1, с промежуточным линкером L6.

Линкеры, использовавшиеся в экспериментах, были следующими:

L0: нет линкера (прямое слияние С-конца цепочки антитела с N-концом цитокина)

L6: SGGGGS (SEQ ID NO:132)

L16: SGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:133)

Способ измерения антиген-нацеленной активности гибридных белковых конструкций "антитело-IFN α ".

"Целевой (Daudi) анализ".

Этот анализ использовали для количественного определения антипролиферативной активности гибридных белковых конструкций IFN и антитело-IFN на клетках, демонстрирующих антиген, соответствующий антителу, с которым слит IFN, и его можно использовать как часть анализа для расчета индекса антиген-чувствительности (ASI), описанного в этом тексте. Клетки Daudi экспрессируют как CD20 так и CD38 в качестве антигенов, ассоциированных с клеточной поверхностью. Жизнеспособность клеток измеряли с использованием реагента CellTiter-Glo®, Cat #G7570, от Promega (Madison, Wisconsin). Это анализ, основанный на люминесценции, который используется для определения жизнеспособности клеток в культуре на основе количественного выражения АТФ. Сила сигнала пропорциональна количеству живых клеток в лунке микротитровочного планшета.

Детали анализа следующие.

Клетки Daudi (полученные от ATCC, Manassas, VA) культивировали в Т75 колбе (TPP, Trasadingen,

Switzerland, cat# 90076) до предпочтительной плотности между $0,5 \times 10^5$ и $0,8 \times 10^5$ живых клеток/мл в RPMI 1640 (Mediatech, Inc., Manassas, VA, cat#10-040-CV) с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS; Hyclone, Logan, UT cat# SH30070,03). Клетки собрали центрифугированием при 400g в течение пяти минут, декантировали надосадочную жидкость, и повторно суспендировали клеточную таблетку в RPMI 1640 +10% FBS. Клетки посчитали и плотность отрегулировали до $3,0 \times 10^5$ клетки/мл в RPMI 1640+10% FBS. Затем, 50 мкл клеточной суспензии добавили в каждую лунку 96-луночного круглодонного культивировочного планшета (далее называемого "экспериментальным планшетом") (TPP, cat#92067). На отдельном стерильном 96-луночном планшете (далее называемом "разбавительный планшет"; Costar, Corning, NY cat#3879), проверяемые соединения серийно разбавили с дублированием в RPMI 1640 + 10% FBS. Затем, 50 мкл/на лунку перенесли с разбавительного планшета на экспериментальный планшет. Затем экспериментальный планшет инкубировали в течение четырех дней при 37°C с 5% CO₂.

Смесь предоставленного производителем аналитического буфера и аналитический субстрат (далее называемый "CellTiterGlo reagent", смешанный по инструкции производителя) добавили на экспериментальный планшет в количестве 100 мкл на лунку. Планшет встряхивали в течение двух минут. После этого, 100 мкл на лунку перенесли с экспериментального планшета на 96-луночный круглодонный белый непрозрачный планшет (далее называемый "анализационный планшет"; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ cat#35 3296). Содержимое аналитического планшета после этого стабилизировали в темноте в течение 15 мин при комнатной температуре. Планшет считали на счетчике Victor 3V Multilabel Counter (Perkin Elmer, Waltham, MA, model#1420-041) на люминиметрическом канале и измерили люминесценцию. Результаты представили в виде "относительных единиц люминесценции (RLU)".

Данные проанализировали с помощью Prism 5 (Graphpad, San Diego, CA) с помощью нелинейной регрессии и подбора кривой по трем параметрам для определения средней точки кривой (EC50). Для каждого проверяемого соединения, эффективность относительно свободного IFN α 2b (или другой формы IFN с известной эффективностью относительно IFN α 2b) рассчитывали как соотношение значений EC50.

Специалист в данной области заметит, что существует множество других способов анализа, которые можно использовать для измерения жизнеспособности клеток.

"Целевой (ARP) анализ" (также иногда называемый "нацеленным анализом").

Клеточная линия множественной миеломы ARP-1 была подарком от Bart Barlogie MD, PhD, директора Института миеломы при Университете медицинского центра Арканзаса (Little Rock, AK). Она описана в Hardin J. et al., (Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death. Blood; 84:3063, 1994). ARP-1 клетки (CD38⁺) использовали для проверки CD38 нацеленных гибридных белковых конструкций "антитело-IFN". Культура и условия анализа были такими же, как и в случае вышеописанного анализа, основанного на Daudi, со следующими исключениями: ARP-1 культивировали до плотности от $4,0 \times 10^5$ до $6,0 \times 10^5$ клеток/мл. Концентрацию ARP-1 регулировали до $1,0 \times 10^4$ клеток/мл перед анализом.

Способ измерения не-антиген-направленной активности гибридных белковых конструкций "антитело-IFN α ".

"Нецелевой анализ" (также иногда называемый "ненацеленным" анализом).

iLite анализ из PBL Interferon Source (Piscataway, NJ, Cat# 51100), проводили в основном в соответствии с описанием производителя с добавлением блокирующей стадии человеческого IgG. Клеточная линия iLite описывается производителем как "стабильная трансфектированная клеточная линия, происходящая от коммерчески доступной про-моноцитной человеческой клеточной линии, характеризующаяся экспрессией МНС класс II антигенов, в особенности человеческого лимфоцитарного антигена (HLA-DR), на клеточной поверхности." Клеточная линия содержит ген стабильной трансфектированной люциферазы, экспрессия которого поддерживается интерферон-ответным элементом (IRE), что позволяет количественно оценить активность интерферона на основе люминесценции. Предоставленный производителем iLite планшет (далее называемый "анализационный планшет") и разбавитель достали из -80°C холодильника и уравнили с комнатной температурой. После этого, 50 мкл разбавителя добавили в каждую лунку аналитического планшета. Емкость с предоставленными производителем репортерными клетками достали из -80°C холодильника и расплавили в 37°C водяной бане. После этого, 25 мкл аликвоты клеток поместили в каждую лунку аналитического планшета. После этого, в каждую лунку добавили 12,5 мкл 8 мг/мл человеческого IgG, разбавленного в RPMI 1640 +10% FBS (Sigma Chemicals, St. Louis, MO; cat# 14506). Содержимое перемешали и инкубировали при 37°C в течение 15 мин. На отдельном "разбавительном планшете" серийно разбавили проверяемое вещество с дублированием в RPMI 1640 + 10% FBS. После этого, 12,5 мкл проверяемого вещества перенесли из разбавительного планшета на аналитический планшет. После этого аналитический планшет инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 17 ч. Предоставленные производителем аналитический буфер и субстрат достали из -80°C холодильника и уравнили с комнатной температурой в течение 2 ч. Предоставленный производителем аналитический буфер добавили к предоставленному производителем субстратному сосуду перемешали в соответствии с инструкциями производителя для создания "люминесцирующего раствора". После этого, 100 мкл люминесцирующего раствора добавили к каждой лунке аналитического планшета. Планшет

встряивали в течение 2 мин. После этого планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин в темноте и наконец считали с помощью счетчика Victor 3V Multilabel Counter на канале люминесценции, измерили люминесценцию и представили в виде RLU. Данные проанализировали с помощью Graphpad Prism 5, как описано для "целевого (Daudi) анализа", выше. Для тестирования гибридных белковых конструкций "анти-CD38 антитело-IFN" в iLite анализе, к предоставленному производителем реагенту добавили 2 мг/мл человеческого IgG и 0,5 мг/мл анти-CD38 антитела (такой же клон антитела проверяли как гибридную белковую конструкцию "антитело-IFN" для блокировки любого связывания гибридных белковых конструкций "анти-CD38 антитело-IFN" с CD38 экспрессируемым на iLite клетках).

Результаты: антигенная специфичность гибридных белковых конструкций "антитело-IFN".

На фиг. 6 показана интерферонная активность свободного IFN α 2b (SEQ ID NO: 3; "IFN α " на фигуре) а также IFN α 2b, слитого с С-концами тяжелых цепочек двух различных антител (ритуксимаб и паливизумаб, антитело изотипного контроля), при действии на клеточную линию iLite. Эта клеточная линия не демонстрирует антиген для этих антител, так что этот анализ раскрывает эффективность различных IFN α 2b-содержащих белков в отсутствии антитело-антиген-основанного нацеливания. Детали этого анализа описаны выше в разделе "Способы измерения не-антиген-нацеленной активности" гибридных белковых конструкций "антитело-IFN α " и в сокращенном виде называется в этом тексте "нецелевой анализ." "Ритуксимаб-НС-L6-IFN α IgG1" означает CD20-нацеленное химерное антитело Ритуксимаб, в котором легкая цепочка (SEQ ID NO: 276) не изменена, но IgG1 тяжелая цепочка (SEQ ID NO: 277) имеет присоединенную к С-концу 6-аминокислотную линкерную последовательность ("L6;" SGGGGS, SEQ ID NO: 132), с последующей последовательностью для IFN α 2b (SEQ ID NO:3); эта последовательность "тяжелая цепочка-линкер-IFN α " показана как SEQ ID NO: 280. "Изотип-НС-L6-IFN α IgG1" означает RSV-нацеленное гуманизированное антитело паливизумаб, в котором легкая цепочка (SEQ ID NO: 290) не изменена, а IgG1 тяжелая цепочка (SEQ ID NO: 291) имеет присоединенную к С-концу 6-аминокислотную линкерную последовательность ("L6;" SGGGGS, , SEQ ID NO: 132), с последующей последовательностью для IFN α 2b (SEQ ID NO: 3); эта последовательность "тяжелая цепочка-линкер-IFN α 2b" показана как SEQ ID NO: 294. В этом анализе свободный IFN α 2b показал значение EC₅₀ для активации генной экспрессии посредством элемента интерферонного ответа (IRE) со значением 1,9 пмоль/л. При присоединении IFN α 2b к ритуксимабу, наблюдалось 3,1-кратное (5,9/1,9 = 3,1) понижение эффективности. Похожее умеренное понижение эффективности наблюдалось при связывании IFN α 2b с паливизумабом. Снова, клеточная линия, используемая в этом исследовании, не имеет антигена, соответствующего этим антителам на своей клеточной поверхности, демонстрируя что присоединение IgG к N-концу IFN α 2b вызывает умеренное (в 3-4 раза) уменьшение его не-антиген-нацеленной IFN активности. Это согласуется с другими наблюдениями (например US 7,456,257).

Ни паливизумаб, ни ритуксимаб сам по себе (без слияния с интерфероном) не показали активности в этом анализе (данные не показаны).

Для определения того, обладают ли гибридные белковые конструкции "антитело-IFN α 2b" повышенной активностью по сравнению со свободным IFN α 2b в отношении клеток, не демонстрирующих соответствующий антиген на своей поверхности, исследовали их действие на клетки Daudi, демонстрирующие CD20 антиген ритуксимаба, но не демонстрирующих RSV F белковый антиген, соответствующий паливизумабу. Анализ, использованный в этом случае, описан выше в разделе "Способ измерения антиген-нацеленной активности гибридных белковых конструкций "антитело-IFN α " или просто "целевой (Daudi) анализ," позволяет измерить эффект проверяемых субстанций на жизнеспособность клеток Daudi. С этими клетками, гибридная белковая конструкция "ритуксимаб-IFN α 2b" (ритуксимаб-НС-L6-IFN α IgG1) была в 3,25 раза (1,3/0,4 = 3,25) более эффективна, чем свободный IFN α 2b (фиг. 7). Другими словами, присоединение ритуксимаба к IFN α 2b привело к небольшому уменьшению (3,1-кратному) активности в отношении антиген-негативных клеток (фиг. 6), и к небольшому увеличению (3,25-кратному) активности в отношении антиген-позитивных клеток (фиг. 7). В целом, присоединение антитела таким образом повышает индекс антиген-специфичности (ASI), определяемый как кратность повышения эффективности по отношению к свободному IFN α 2b на антиген-позитивные клетки, умноженная на кратность уменьшения эффективности относительно свободного IFN α 2b на антиген-негативные клетки, в 10 раз (3,1 $\times$ 3,25) в этом эксперименте. Повторение экспериментов показало ASI равным 14, как видно из табл. 20, ряд 2. EC50 (математическая средняя точка кривой доза-ответ) использовали в качестве меры эффективности для представленных здесь расчетов. Другими словами, если соединение А показывало EC50 в 10 раз меньше, чем у соединения В, то считалось, что его эффективность больше в 10 раз.

Результаты, показанные на фиг. 8, соответствуют таковым для антительного нацеливания на основе антитело-антиген реактивности: гибридная белковая конструкция "ритуксимаб-IFN α " (ритуксимаб-НС-L6-IFN α -IgG1) была в 12 раз (2,2/0,18=12) более эффективной при уменьшении жизнеспособности CD20⁺ Daudi клеток, чем гибридная белковая конструкция "паливизумаб-IFN α " (изотип-НС-L6-IFN α -IgG1), антиген к которой не присутствует на Daudi клетках.

Умеренное уменьшение активности IFN α , происходящее в результате связывания его с антителом,

может быть недостаточно для предотвращения токсичности IFN α компонента конструкции у человеческого субъекта. Поэтому в IFN α 2b были внесены различные мутации с целью уменьшения его активности и токсичности. Например, было генерировано пять различных мутировавших разновидностей IFN α 2b и в каждом случае они были связаны с С-концом тяжелой цепочки ритуксимаба посредством линкера из шести аминокислот L6, обладающего последовательностью SGGGGS (SEQ ID NO: 132). Эти конструкции сравнивали гибридной белковой конструкцией "ритуксимаб-дикий тип IFN", ритуксимаб-НС-L6-IFN α IgG1 (также использовалась в экспериментах, показанных на фиг. 6-8). Пятью мутировавшими разновидностями были R144A, A145G, R33A+YNS, R33A и R144A+YNS. Последовательности этих разновидностей описаны ниже. Степень ожидаемой пониженной аффинности для рецепторов интерферона I типа на основе ранее охарактеризованных IFN мутантов и количество ожидаемого аттенуирования активности интерферона приведены в табл. 6 и 7 выше.

На фиг. 9, 10 и в табл. 20 приведена степень уменьшения активности интерферона для каждой из этих гибридных белковых конструкций "ритуксимаб-аттенуированный IFN α 2b" относительно свободного, дикого типа IFN α 2b, на антиген-негативных (т.е. CD20-негативных) клетках. R144A мутант гибридной белковой конструкции "ритуксимаб-IFN α 2b" (состоящий из SEQ ID NOS: 282 (тяжелая цепочка) и 276 (легкая цепочка)) показал 386-кратное понижение активности интерферона ($2200/5,7=386$). A145G и R33A+YNS разновидности (состоящие из тяжелых цепочек SEQ ID NOS: 284 и 286 соответственно, каждая из которых комбинирована с легкой цепочкой SEQ ID NO: 276) показали 491-кратное ($2800/5,7=491$) и 1071-кратное ($6100/5,7=1,071$) понижение активности соответственно. На фиг. 10 показана степень уменьшения активности интерферона для гибридной белковой конструкции R144A+YNS (состоящей из SEQ ID NOS: 288 (тяжелая цепочка) и 276 (легкая цепочка)) в 303 раза ($1700/5,6=303$) относительно гибридной белковой конструкции ритуксимаба без IFN мутации (ритуксимаб-НС-L6-IFN α IgG1); так как ритуксимаб-НС-L6-IFN α IgG1 является в 3,8 раза менее эффективным в отношении антиген-негативных клеток чем свободный, дикий тип IFN α 2b (данные на фиг. 9; $22/5,7=3,8$), то это означает, что R144A+YNS разновидность гибридной белковой конструкции в 1150 раз менее эффективна, чем свободный, дикий тип IFN α ($303 \times 3,8=1150$). R33A разновидность гибридной белковой конструкции (состоящей из SEQ ID NOS: 436 (тяжелая цепочка) и 276 (легкая цепочка)) была аттенуирована в такой высокой степени, что не продемонстрировала способную к обнаружению активность в нецелевом анализе.

Таблица 20

Проверяемая гибридная белковая конструкция	Целевая эффективность относительно свободного IFN α 2b (EC50 гибридной белковой конструкции) Колонка А	Нецелевая эффективность относительно свободного IFN α 2b (EC50 гибридной белковой конструкции) Колонка В	Индекс антиген-специфичности (ASI; рассчитан как колонка А/колонка В)
Ritux-IFN α 2b	3,6	0,26	14
Ritux-IFN α 2b (R144A)	0,86	0,0026	330
Ritux-IFN α 2b (A145G)	1,2	0,0020	600
Ritux-IFN α 2b (R33A+YNS)	1,6	0,00093	1700
Ritux-IFN α 2b (R33A)	0,0022*	Нет обнаруживаемой активности в нецелевом анализе	ND
Ritux-IFN α 2b (R144A+YNS)	0,23*	0,00086*	270

* Свободный IFN α 2b не тестировали в тот же день, как проверяемые композиции в этих рядах. Таким образом, эти измерения основаны на сравнении проверяемых композиций с ритуксимаб-НС-L6-IFN α

IgG1, который анализировали в тот же день на том же планшете и умножали на фактор коррекции, основанный на относительной активности IFN α 2b по сравнению с ритуксимаб-НС-L6-IFN α IgG1 (напр., данные, приведенные во втором сверху ряду), измеренной в тот же день.

Неожиданным образом, когда количество активности интерферона в этих сильно аттенуированных гибридных белковых конструкциях "ритуксимаб-мутировавший IFN α 2b" измеряли на антиген-позитивных клетках (Daudi, CD20⁺), то наблюдали в целом очень небольшое аттенуирование в сравнении с диким типом IFN α 2b разновидностью гибридной белковой конструкции "ритуксимаб-IFN α 2b" (фиг. 11-12), и таким образом мутировавшие интерфероны все еще обладали способностью активировать IFN рецептор на "целевых" клетках, обладая при этом значительно пониженной способностью активировать его на "нецелевых" клетках. Например, R33A+YNS разновидность конструкции была только в 2,2 раза ($0,74/0,33 = 2,2$) менее активна, чем "ритуксимаб-IFN α 2b дикий тип" конструкция на антиген-позитивных (Daudi) клетках. Это в сравнении с 277-кратным ($6100/22=277$; фиг. 9) понижением активности на антиген-негативных клетках. Мутации в IFN α 2b, в контексте гибридной белковой конструкции "ритуксимаб-IFN α 2b", вызывали намного большее аттенуирование активности на антиген-негативных клетках, чем на антиген-позитивных клетках. В результате, гибридная белковая конструкция "ритуксимаб-НС-L6-IFN α 2b (R33A+YNS) IgG1" показала существенно более высокий индекс антиген-специфичности (ASI, в 1700 раз) в сравнении с "ритуксимаб-НС-L6-IFN α 2b IgG1" (от 10 до 14 раз) или свободный IFN α 2b (1 раз, по определению), что позволяет предположить, что его нецелевой эффект *in vivo* будет существенно понижен.

Другие "ритуксимаб-IFN α 2b" конструкции с мутациями в IFN α 2b части также показали неожиданно небольшое уменьшение активности на антиген-позитивных клетках (фиг. 11 и 12) относительно понижения эффективности на антиген-негативных клетках (фиг. 9 и 10). За исключением R33A разновидности гибридной белковой конструкции, обсуждаемой ниже, аттенуирующие мутации вызвали 384-1160-кратное понижение активности интерферона относительно свободного дикого типа IFN α 2b на антиген-негативных клетках, но только 0,23-1,2-кратное понижение активности относительно дикого типа IFN α 2b на антиген-позитивных клетках. R33A мутировавшая гибридная белковая конструкция, обладавшая необнаруживаемой IFN активностью в отсутствие антитело-антиген нацеленности, тем не менее показала значительную активность в присутствии антитело-нацеленности; эффективность R33A разновидности гибридной белковой конструкции была в 1620 раз ниже, чем у такой же гибридной белковой конструкции, лишенной аттенуирующей мутации, в целевом анализе ($340/0,21=1620$ -кратное аттенуирование). Это остро контрастирует с по меньшей мере 100000-кратным аттенуированием, вызываемым такой же мутацией в отсутствие антитело-основанной нацеленности (фиг. 10). Эти результаты обобщены в табл. 20.

Для определения того, можно ли распространить эту значительную разницу в способности мутации в IFN α компоненте гибридных белковых конструкций существенно уменьшать ее активность на антиген-негативных клетках в сравнении с антиген-позитивными клетками на другие гибридные белковые конструкции, нацеленные на другие антигены, антитела, нацеленные на антиген множественной миеломы CD 38 (SEQ ID NO: 131) сливали с диким типом и аттенуированными формами IFN α и охарактеризовывали. Некоторые из этих экспериментов проводили с использованием антитела G005 (De Weers et al. (патент США 7829673)); последовательности тяжелой и легкой цепочек этого человеческого антитела показаны в SEQ ID NOS: 135 и 134 соответственно.

Кроме того, несколько новых человеческих и крысиных антител против CD38 были получены согласно нижеприведенному описанию.

Разработка новых CD38 антител.

Форматирование CD38 конструкции для экспрессии.

Внеклеточные домены (ECD) CD38 белков человека и яванской макаки форматировали для включения отделяемой N-терминальной лидерной последовательности, AvitagTM, поли-гистидинового тэга и тромбинового участка рестрикции для получения белков SEQ ID NO: 127 и 128 соответственно. Их обратно транслировали в ДНК последовательности и синтезировали *de novo* сборкой синтетических олигонуклеотидов способами, известными в этой области. После генного синтеза, гены субклонировали в вектор pTT5 (Durocher, Nucleic Acids Research volume 30, number 2, pages E1-9, 2002) для получения конструкции, производящей растворимые секретируемые формы этих белков посредством промежуточной экспрессии в HEK293E клетках (Durocher, *supra*).

Создание векторов для экспрессии антител.

Вариабельные участки легкой и тяжелой цепочек последовательностей субклонировали в разновидности вектора pTT5 содержащего человеческий IgG1 константный участок тяжелой цепочки (такой как Swissprot accession number P01857), человеческий IgG4 константный участок тяжелой цепочки (такой как Swissprot accession number P01861 включающий замещение S228P), человеческий каппа константный участок (Swissprot accession number P01834) или человеческий лямбда участок (Swissprot accession number P0CG05) для получения полноразмерных цепочек антитела.

Промежуточная экспрессия конструкций в HEK293-6E клетках.

HEK293-6E клетки культивировали в полной клеточной растительной среде (1 л F17 среды (Invitrogen™), 9 мл Pluronic F68 (Invitrogen™), 2мМ глутамина содержащего 20% (w/v) Tryptone NI (Organotechnie®) и генетицин (50 мг/мл, Invitrogen™) на 50 мкл/100 мл культуры). За день до трансфекции клетки собрали центрифугированием и повторно суспендировали в свежей среде (без генетицина). На следующий день ДНК смешали с коммерческим трансфекционным реагентом и добавили трансфекционную смесь ДНК к культуре по каплям. Культуру инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO₂ и 120 об/мин без генетицина. На следующий день, 12,5 мл триптона добавили вместе с 250 мкл генетицина на 500 мл культуры. Культуру инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и 120 об/мин. Через 7 дней, надосадочную жидкость собрали центрифугированием и приготовили к очистке.

Экспрессия и очистка антител.

Промежуточная со-экспрессия тяжелых и легких цепочек в HEK293-6E клетках (как описано выше) привела к получению антител, далее очищенных белок А хроматографией. Вкратце, надосадочные жидкости происходящие от этих трансфекций отрегулировали до pH 7,4 перед загрузкой в HiTrap Protein A колонку (5 мл, GE Healthcare). Колонку промывали с 50 мл 1x PBS (pH 7,4). Элюирование проводили с 0,1 М лимонной кислоты pH 2,5. Элюированное антитело опреснили с помощью колонок Zeba Desalting (Pierce) в 1X PBS (pH 7,4). Антитела проанализировали с помощью SDS-PAGE. Концентрацию антител определили с использованием набора для анализа BCA (Pierce).

Очищение гистидин-меченных белков из надосадочных жидкостей культур.

Аффинную хроматографию с использованием иммобилизованных металлов (IMAC) использовали для очистки человеческого и яванской макаки CD38 внеклеточного домена (ED) белков от надосадочных жидкостей культур. Вкратце, белковые надосадочные жидкости разбавили в связывающем буфере (20 mM фосфат натрия, 0,5 M NaCl, 30 mM имидзол, pH 7,4) перед загрузкой в колонку HisTrap™ FF (1 мл, GE Healthcare). Колонку промывали с 5 мл связывающего буфера (pH 7,4) и элюировали с помощью 20 mM фосфата натрия, 0,5 M NaCl, 500 mM имидазол, pH 7,4. Элюированные белки опреснили и подвергли буферному обмену с помощью Amicon Ultra-15 центрифужной фильтрации с Ultracel-10 мембраной (Millipore) в 1 X PBS (pH 7,4). Абсорбцию 280 нмоль/л (A₂₈₀) белка оценивали с помощью Nanodrop спектрофотометра и корректировали данные использованием предсказанного коэффициента затухания для определения концентрации белка.

Биотинилирование антигенов для фагового дисплея.

Avitag™ мотивы человеческого и яванской макаки CD38 ED биотинилировали по инструкции производителя (Avidity LLC, Aurora, CO). Избыток некоъюгированного биотина удалили от биотинилированных белков опреснением в 1x PBS с помощью 7KD отсечения молекулярного веса (MWCO) на колонке Zeba spin column (Thermo Scientific, Logan, UT) по инструкции производителя. Успешное биотинилирование CD38 ED белков подтвердили с помощью комбинации полиакриламидного гелевого электрофореза и вестерн-блоттинга. Western blots проводили с помощью Streptavidin-HRP (BD Biosciences, San Diego, CA) и проявляли с TMB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Для каждого антигена определили мономерное биотинилирование CD38 ED.

Создание анти-CD38 антитела с помощью фагового дисплея.

FAb, связывающиеся с человеческим и яванской макаки CD38 ED выделили из наивной фагмидной библиотеки, содержащей приблизительно $2,5 \times 10^{11}$ отдельных человеческих FAb фрагментов. Способы генерирования библиотек фаговых антительных фрагментов описаны в "Phage display: A Practical Approach" (Eds. Clackson и Lowman; Oxford University Press, Oxford, UK) и "Antibody Phage Display Methods and Protocols" (Eds. O'Brien и Aitken; Humana Press Inc, NJ 07512). Вкратце, варибельные участки легкой и тяжелой цепочек антитела амплифицировали на основе РНК донорных образцов. После этого варибельные участки легкой и тяжелой цепочек антитела внедрили в фагемидные векторы для создания библиотеки фрагментов антител, слитых с белком, покрытым фагом. Используемая библиотека антител была наивной фагмидной библиотекой высокого разнообразия экспрессирующей фрагменты антител в Fab формате.

Анти-CD38 FAb выделили из фаговой дисплейной библиотеки в ходе двух "кампаний" пэннинга (т.е. отдельных фаговых дисплейных экспериментов с разными реагентами или условиями пэннинга). Общий протокол эксперимента следовал описанию в Marks et al. (Marks, J.D. & Bradbury, A., 2004, Methods Mol Biol, 248, 161-76).

Каждая кампания фагового дисплея включала три цикла пэннинга. Для каждого цикла, $\sim 2,5 \times 10^{12}$ фаговых частиц блокировали путем смешивания 1:1 с блокирующим буфером (4% снятого латекса в фосфатно-буферном солевом растворе PBS, pH 7,4) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Блокированную фаговую библиотеку затем предварительно обедняли на любые биотинилированные белковые тэг мотив биндеры путем инкубации в течение 45 мин с 50-200 пмоль нерелевантного антигена содержащего идентичный биотинилированный тэг мотив. Тэг- и стрептавидин-биндеры связывали добавлением избытка (75-300 мкл) покрытых стрептавидином гранул Dynabeads (Invitrogen), блокированных как было описано для библиотеки. Гранулы (включая прикрепленные к ним тэг- и стрептавидиновые биндеры) иммобилизовали с помощью магнита и выбрасывали.

Пэннинг библиотеки проводили путем смешивания блокированной и предварительно обедненной библиотеки с 50-200 пмоль биотинилированного рекомбинантного CD38 ED в 2 мл центрифужной кювете с вращением в течение 2 ч при комнатной температуре. После этого добавляли 100 мкл покрытых стрептавидином гранул Dynabeads (Invitrogen, Carlsbad, CA) и смесь инкубировали еще 15 мин как описано ранее. Неспецифически связанные фаги удаляли с помощью серии промываний. Каждое промывание включало вынимание комплексов гранул из раствора на стенку кюветы с помощью магнита, отсос надосадочной жидкости и повторное суспендирование гранул в новом промывочном буфере. Так повторяли несколько раз с PBS буфером (1×PBS с 0,5% снятого латекса) или PBS-T буфером (1×PBS с добавкой 0,05% TWEEN-20 [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO] и 0,5% снятого латекса). Фаги, оставшиеся связанными после промывания, элюировали от комплекса "биотинилированный-CD38 ED-гранулы" путем инкубации с двадцатикратным избытком небитинилированного CD38 ED в течение 1 ч при комнатной температуре или с 0,5 мл 100 мМ триэтиламин (TEA) (Merck Chemicals, Darmstadt) в течение 20 мин при комнатной температуре. TEA-элированные 'конечные' фаги нейтрализовывали добавлением 0,25 мл 1 М Tris-HCl pH 7,4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

В конце первого и второго циклов пэннинга конечные фаги добавляли к 10 мл культуры для экспоненциального роста TGI *E. coli* (2х дрожжи-триптон (2YT) растительная среда) и оставляли инфицировать клетки инкубацией в течение 30 мин при 37°C без встряхивания, и затем со встряхиванием при 250 об/мин в течение 30 мин. Фагмиды, кодирующие выход фагового дисплея, изымали в виде фаговых частиц по стандартному протоколу (Marks, J.D. & Bradbury, A., 2004, *Methods Mol Biol*, 248, 161-76). В конце третьего цикла пэннинга конечными фагами заражали TG1 клетки, нанесенные на твердую среду роста 2YT агар (с добавкой 2% глюкозы и 100 мкг/мл карбенициллина) с достаточным разбавлением для получения отдельных колоний *E. coli*. Эти колонии использовали для инокулирования 1 мл жидкой культуры для экспрессии FAb фрагментов для использования в скрининговых экспериментах.

ELISA-скрининг FAb на связывание CD38.

Каждую индивидуальную колонию *E. coli* использовали для экспрессии Fab, который подвергали скринингу на CD38 ED-связывающую активность. Колонии инокулировали в 1 мл заквасочные культуры (с добавкой 100 мкг/мл карбенициллина и 2% глюкозы) на 96-луночном глубоком планшете (Costar) и инкубировали в течение ночи при 37°C при встряхивании с 350 об/мин (Innova R44 shaker; 1 inch orbit). Эти заквасочные культуры разбавили 1:100 с получением 1 мл экспрессионной культуры (2YT с добавкой 100 мкг/мл карбенициллина) и вырастили до оптической плотности (600 нмоль/л) 0,5-0,8. Экспрессию FAb стимулировали добавлением изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид до финальной концентрации 1 mM. Культуры инкубировали при 25°C в течение 16 ч.

Образцы FAb получали путем сбора клеток центрифугированием (2000g, 10 мин) и проведением лизозимной экстракции. Клеточную таблетку повторно суспендировали в 200 мкл лизисного буфера (160 мкг/мл лизозима, 10 мкг/мл RNase A, 5 мкг/мл DNase и полные ингибиторы протеазы (Roche, Nutley, NJ)) и встряхивали при 400 об/мин в течение 30 мин при 21°C. После добавления дополнительных 100 мкл лизисного буфера, реакции инкубировали еще 30 мин как было описано выше. Очищенные лизаты выделяли с последующим центрифугированием при 3,000g в течение 10 мин и хранили при 4°C до использования в дальнейших экспериментах.

Для скрининга с помощью ELISA на человеческие CD38 ED-биндеры, полученные с помощью фагового дисплея, человеческий CD38 внеклеточный домен (ED) (полученный в HEK 293-6E клетках и биотинилированный по вышеприведенному описанию) фиксировали на стрептавидиновых планшетах ELISA (Nunc) с концентрацией 1 мкг/мл. Затем пластины промывали и добавляли отдельные образцы FAb (полученные по вышеприведенному описанию) в индивидуальные лунки планшетов ELISA. Fab оставляли связывать фиксированный CD38 ED на 1 ч при комнатной температуре и после этого чего промывали три раза с PBS-T (1×PBS с добавкой 0,1% Tween®20). FAb связанные с CD38 ED определяли инкубацией в течение 30 мин при комнатной температуре с анти-VS-HRP конъюгированным антителом (Invitrogen, Carlsbad, CA) для обнаружения V5 тэгов, слитых с C-концом тяжелой цепочки FAb. Планшеты промывали для удаления несвязанных антител и сигналы анализа проявили инкубацией с 50 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Sigma-Adrich, St. Louis, MO) и разложили 50 мкл 1 М HCl. Сигналы анализа считывали при A450 нмоль/л с использованием микропланшетного ридера (BMG Labtech). Результаты выразили в виде необработанных значений при A450 нм, при этом рассматривая как позитивный любой сигнал, в 2 раза превышающий средний уровень фона.

В последующих анализах кросс-реактивность FAb с CD38 ED оценивали с помощью покрытия биотинилированным CD38 ED яванской макаки стрептавидиновых планшетов ELISA с обработкой, как было описано выше. Плазмиды кодирующие FAbs кросс-реактивные в отношении человеческого и обезьяньего CD38 ED изолировали и секвенировали. Из приблизительно 1000 FAb подверженных скринингу на связывание с человеческим и обезьяньим CD38 ED идентифицировали шесть генетически уникальных FAb. В табл. 21 обобщены данные о полученных FAb последовательностях. Вариабельные участки некоторых из этих антител приведены на фиг. 13.

Таблица 21

Номер кампании	Название FAb	V _H последовательность	V _K /V _L последовательность
1	X910/12	SEQ ID NO:395	SEQ ID NO:394
1	X913/15	SEQ ID NO:397	SEQ ID NO:396
2	X355/01	SEQ ID NO:421	SEQ ID NO:420
2	X355/02	SEQ ID NO:391	SEQ ID NO:390
2	X355/04	SEQ ID NO:423	SEQ ID NO:422
2	X355/07	SEQ ID NO:393	SEQ ID NO:392

Все FAb конвертировали в IgG1 формат клонированием в pTT5 векторы (описанный выше), экспрессировали в HEK293-6E клетках и полученные IgG очистили белок А аффинной хроматографией, как описано выше.

Анализ связывания IgGs с человеческой CD38 позитивной клеточной линией RPMI-8226.

Способность происходящих от фагов антител связывать модельную человеческую CD38 позитивную миеломную клеточную линию RPMI-8226 (полученную из Health Protection Agency Culture Collections, Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, UK) тестировали с помощью анализа на основе проточной цитометрии. Вкратце, живые RPMI-8226 клетки (2×10^5 , по оценке исключения трипанового синего) инкубировали с каждым антителом или с человеческим IgG₁ изотипным контрольным антителом (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) в различных концентрациях в 100 мкл FACS буфера (PBS плюс 1% эмбриональной телячьей сыворотки, FCS) на 96-луночных планшетах в течение 20 мин на льду в темноте. Клетки дважды промывали FACS буфером перед инкубацией в течение 20 мин в 100 мкл FACS буфера, содержащего козий анти-человеческий IgG (Fc-специфичный, конъюгированный с флуоресцеин изотиоцианатом, FITC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). После промывания с FACS буфером, клетки повторно суспендировали в FACS буфере и анализировали на связывание антитела с помощью поточной цитометрии на FACS Canto (BD Biosciences, San Diego, CA) с помощью EV, бокового светорассеяния и FL-1 пропускания. Результаты выражены как средняя интенсивность флуоресценции (MFI) отложенная относительно концентрации белка (фиг. 14).

Создание анти-CD38 антител с помощью генетической иммунизации.

Моноклональные антитела против человеческого CD38 ED генерировали генетической иммунизацией с соответствующей белковой иммунизацией крыс. Для генетической иммунизации ДНК последовательность человеческого CD38 ED представлена в SEQ ID NO: 129. Соответствующая концептуальная транслированная белковая последовательность представлена в SEQ ID NO: 130. ДНК последовательность из SEQ ID NO: 129 клонировали в плазмид для генетической иммунизации с помощью рестрикционной ферментной технологии. Экспрессия полученных плазмидов позволила секретирование растворимого CD38 ED снабженного *с-мус* эпитопом на N- или C-конце. *с-мус* эпитоп использовали для подтверждения экспрессии CD38 ED.

После этого крыс иммунизировали плазмидом шесть раз с помощью пистолета Helios gene gun (Bio-Rad, Germany) согласно описанной процедуре (Kilpatrick et al., Hybridoma 17: 569-576, 1998). Через неделю после последнего введения иммунизационного плазмиды, каждой крысе интрадермально ввели немеченый рекомбинантный человеческий CD38 ED. Немеченый человеческий CD38 ED для этой цели получили удалением белковой метки из SEQ ID NO: 127 путем отделения тромбина с последующей очисткой на колонке с отсечением размера.

Через 4 дня крыс умертвили и их лимфоциты слили с клетками миеломы с помощью полиэтиленгликоля (HybriMax™; Sigma-Aldrich, Germany), с посевом 100000 клеток на лунку 96-луночного микротитровочного планшета и выращиванием в DMEM среде с добавкой 10% эмбриональной бычьей сыворотки и НАТ добавки для гибридной селекции (Kilpatrick et al., 1998, supra).

Скрининг гибридных надосадочных жидкостей на кросс-реактивность человеческого и обезьяньего CD-38.

Дублированные 100 мкл образцы каждой гибридной надосадочной жидкости нанесли на отдельные лунки планшета maxisorp ELISA (Nunc Plasticware, Thermo Scientific, Rochester, NY 14625, USA) при инкубации при комнатной температуре в течение часа. Затем планшеты трижды промыли в 1xPBS-T и блокировали добавлением 2%BSA/1xPBS. После инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре, планшеты промыли как было описано выше. К одной лунке каждого дублированного крысиного антитела добавили 0,1 мкг биотинилированного человеческого CD38 в конечном объеме 100 мкл 1xPBS. Ко второй лунке каждого дублированного крысиного антитела добавили 0,1 мкг биотинилированного CD38 ED яванской макаки в конечном объеме 100 мкл 1xPBS. Планшеты промыли как было описано выше с последующим определением связанного биотинилированного CD38 ED с помощью стрептави-

дин-HRP конъюгата (BD Biosciences, San Diego, CA). Планшеты промыли как было описано выше для удаления несвязанного стрептавидин-HRP конъюгата и проявили сигнал анализа инкубацией с 50 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Sigma-Aldrich) и разложением с 50 мкл 1 М HCl. Сигналы анализа считали при A450 нмоль/л с помощью микротитровочного планшетного ридера (BMG Labtech, Cary, NC). Из 15 проверенных гибридомных надосадочных жидкостей все 15 связали человеческий CD38 ED и семь связали обезьяний CD38 ED (табл. 22) по определению с помощью ELISA. Кросс-реактивные антитела обозначены как R5D1, R7F11, R5E8, R10A2, R10B10, R3A6 и R7H11.

Проточное цитометрическое связывание крысиных антител с человеческой CD38 позитивной клеточной линией RPMI-8226.

Живые RPMI-8226 клетки (2×10^5 , по оценке исключения трипанового синего) инкубировали с 100 мкл крысиной гибридомной надосадочной жидкости в течение 20 мин на льду в темноте. Клетки дважды промыли FACS буфером (1x PBS+1% FCS) и инкубировали в течение 20 мин в 100 мкл FACS буфера с содержанием антикрысиного IgG-FITC конъюгата (Sigma-Aldrich). После промывания клеток в FACS буфере их повторно суспендировали в FACS буфере и анализировали на антитело-связывание с помощью поточной цитометрии на FACS Canto (BD Biosciences, San Diego, CA) с помощью EV, бокового рассеяния и FL-1 пропускания. Результаты выразили в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI). Из 15 крысиных антител, проявляющих позитивное связывание с человеческий CD38 ED по ELISA, пять показали слабое или отсутствующее связывание с CD38 экспрессируемым на человеческой миеломной клеточной линии RPMI-8226 по FACS (табл. 22).

Таблица 22

Крысиное антитело	Связывание с человеческим CD38 ED (ELISA)	Связывание с CD38 ED яванской макаки (ELISA)	FACS связывание с RPMI-8226 клетками (MFI)
R3A6	Y	Y	279
R5D1	Y	Y	12207
R5E8	Y	Y	10618
R7F4	Y	N	310
R7F11	Y	Y	11897
R7H11	Y	Y	680
R8A7	Y	N	5994
R9B6	Y	N	146
R9C7	Y	N	143
R9C10	Y	N	645
R9E5	Y	N	179
R9G5	Y	N	2717
R10A2	Y	Y	4470
R10A9	Y	N	12807
R10B10	Y	Y	858

Средняя фоновая MFI FACS связывания была 153.

Молекулярное исследование крысиных антител.

Шесть крысиных антительных гибридом - R5D1, R7F11, R5E8, R10A2, R10B10 и R7H11 - было выбрано для молекулярного исследования. РНК экстракцию из пеллетированных гибридомных клеток каждого клона провели с помощью TRI реагента (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) по инструкции производителя. Варибельные участки каждого антитела амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) с быстрой амплификацией концов кДНК (RACE) по инструкции производителя (Clontech [Mountain View, CA] SMART RACE kit; Ambion Life Technologies [Foster City, CA] RLM-RACE kit). Генно-специфичные обратные PCR праймеры для амплификации крысиных тяжелых цепочек варибельных доменов в 5'-RACE были сконструированы для ренатурирования с доступными крысиными константными участками тяжелых цепочек последовательностей. Аналогично, генно-специфичные обратные PCR праймеры для амплификации крысиных легких цепочек были для ренатурирования с крысиными константными участками каппа цепочек последовательностей, и другие праймеры были сконструированы для ренатурирования с крысиными константными участками лямбда цепочек последовательностей.

5'-RACE PCR проводили по инструкции производителя (Life Technologies; Clontech) с помощью

PfuUltraII полимеразы (Agilent). После 5'-RACE PCR продукты разделили с помощью электрофореза на агарозном геле и удалили с геля полосы приблизительно предсказанного размера на основе расположения обратного праймера в константном участке. ДНК очистили от агарозного геля с помощью набора Qiaquick spin gel extraction kit (Qiagen) по инструкции производителя. Вставки ДНК клонировали и размножили на E.coli с помощью набора StrataClone Blunt PCR Cloning Kit (Agilent, Santa Clara, CA) по инструкции производителя. Отдельные колонии культивировали и приготовили плазмидные ДНК с помощью набора GenElute™ plasmid miniprep kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). ДНК вставки секвенировали и идентифицировали варибельные участки антитела в концептуально транслированных белковых последовательностях.

Векторы построили с использованием последовательностей варибельных участков крысиных антител привитых к человеческим IgG1 константным последовательностям для варибельных участков тяжелых цепочек и человеческих каппа или лямбда структур (с сохранением такого же легкоцепочного изотипа как в крысином антителе). Получившиеся последовательности варибельного участка каждого клона приведены в таблице 23. После последующей со-экспрессии соответствующих тяжелых и легких цепочек в HEK293-6E клетках, в контексте рТТ5 векторов, провели белок А очистку полученных IgGs в соответствии с вышеприведенным описанием.

Таблица 23

Крысиное антитело	Легкая цепочка изотип	Тяжелая цепочка (VH)	Легкая цепочка (VL)
R5D1	Каппа	SEQ ID NO:399	SEQ ID NO:398
R5E8	Каппа	SEQ ID NO:401	SEQ ID NO:400
R10A2	Каппа	SEQ ID NO:403	SEQ ID NO:402
R10B10	Лямбда	SEQ ID NO:425	SEQ ID NO:424
R7H11	Лямбда	SEQ ID NO:427	SEQ ID NO:426
R7F11	Каппа	SEQ ID NO:429	SEQ ID NO:428

Аффинность анти-CD38 антител к человеческому и обезьянному CD38.

Измеряли аффинности связывания антител, полученных против человеческого и обезьяньего CD38. Вкратце, с помощью Biacore T200, Protein A иммобилизовали на Flow Cell (FC) 1 (FC1) и FC2 (или альтернативным образом FC3 и FC4) сенсорного чипа CM5 с помощью аминного связывания, с приблизительно 2000 RU. FC1 в ходе эксперимента использовали пустым. Эксперименты проводили в HBS-P буфере (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,005% v/v Surfactant P20). При скорости потока 20 мкл/мин, 20 мкл 5 мкг/мл антитела пропускали через FC2. Человеческий CD38 ED или отдельно CD38 ED яванской макаки пропускали по поверхности FC1 и FC2 в интервале концентраций от 25 нмоль/л до 200 нмоль/л. Регенерацию поверхности проводили с помощью 10mM глицина, pH 1,0. Данные сенсограммы FC1 вычитали из FCS и выравнивали кривые с помощью 1:1 уравнения Лангмюра для получения значений k_d , k_a и K_D . Эти данные показывают что кросс-реактивность на человеческий и обезьяний CD38 сохраняется при конверсии происходящих от человеческих фагов Fab в человеческий IgG и крысиных антител в химерные крысо-человеческие IgG (табл. 24).

Таблица 24

Антитело	CD38 Лиганд	k_a (1/Ms) $\times 10^5$	k_d (1/s)	K_D (нмоль/л)
X355/02 IgG1	Человеческий	1,18	0,000892	7,6
X355/02 IgG1	Обезьяний	0,834	0,002282	27,4
X355/07 IgG1	Человеческий	1,15	0,00132	11,4
X355/07 IgG1	Обезьяний	11,3	0,01375	12,2
R10A2 IgG1	Человеческий	6,6	0,0004.79	0,7
R10A2 IgG1	Обезьяний	8,98	0,001928	2,2
R5D1 IgG1	Человеческий	2,43	0,000239	1,0
R5D1 IgG1	Обезьяний	11,1	0,001102	1,0
R5E8 IgG1	Человеческий	4,05	0,00118	2,9
R5E8 IgG1	Обезьяний	4,52	0,001898	4,2

Анти-CD38-аттенуированные IFN гибридные белковые конструкции.

Для проверки того, можно ли неожиданный результат, полученный с анти-CD20 антителом, слитым

с аттенуированным IFN α , повторить с другими антителами, и особенно с антителами, нацеленными на антиген, несвязанный с CD20, были созданы гибридные белковые конструкции включающие полностью человеческое IgG1:каппа анти-CD38 антитело G005 (состоящее из SEQ ID NOS: 135 (тяжелая цепочка) и 134 (легкая цепочка)) и IFN α (SEQ ID NO: 3), с различными аттенуирующими мутациями и без них. На фиг. 15 показаны результаты "нецелевого анализа" (в соответствии с вышеприведенным описанием) с использованием iLite kit. Поскольку слабый CD38 сигнал наблюдался на iLite клеточной линии с помощью поточной цитометрии (не показано), CD38 антиген блокировали добавлением избытка чистого (например, без слитых с ним IFN или IFN разновидностей) анти-CD38 антитела во всех iLite экспериментах с анти-CD38-IFN гибридными белковыми конструкциями; в каждом случае, концентрация блокирующего чистого CD38 антитела была 0,5 мг/мл. Также в каждом случае такой же клон антитела анализированный как IFN или IFN-разновидность гибридной белковой конструкции использовали для блокировки любого взаимодействия с CD38.

На фиг. 15 показана нецелевая активность свободного дикого типа IFN α 2b (IFN α) (SEQ ID NO: 3) относительно дикого типа IFN α 2b слитого с С-концом CD38 антитела G005 (De Weers et al. (Патент США 7829673). Последняя гибридная белковая конструкция (G005-HC-L0-IFN α IgG4) была IgG4:каппа изотипа и не имела промежуточного линкера между С-концом тяжелой цепочки и первым остатком IFN α и описана в SEQ ID NOS: 150 (тяжелая цепочка) и 134 (легкая цепочка). Как показано на фиг. 15, гибридная белковая конструкция "анти CD38 антитело-не-аттенуированный IFN α 2b" была в 27 раз менее эффективна ($19.5/0.726=27$) чем свободный IFN α 2b в нецелевом анализе (например, в отсутствие CD38-нацеливания). На фиг. 16 показано сравнение между теми же двумя конструкциями в "целевом (ARP1) анализе", в котором анти-CD38 антитело связывалось с CD38, который экспрессировался на высоком уровне на ARP-1 клеточной линии. Гибридная белковая конструкция "G005-HC-L0-IFN α IgG4" была в 3,6 раза ($14,7/4,08=3,6$) более эффективна чем свободный IFN α 2b, предположительно из-за целевой доставки IFN к CD38⁺ миеломным клеткам. Таким образом, гибридная белковая конструкция "G005-HC-L0-IFN α IgG4" имеет индекс антигенной специфичности (ASI) 97 ($27 \times 3,6 = 97$; табл. 25).

Таблица 25

Проверяемая конструкция (ТА)	EC50 целевой (пмоль/л) ARP-1	EC50 IFN α /EC50 ТА (целевой; ARP-1)	EC50 нецелевой (пмоль/л) iLite	EC50 IFN α /EC50 ТА (нецелевой; iLite)	Индекс антигенной специфичности Колонка 3/ Колонка 5
IFN α	10,8	1.00	0,260	1.00	1.00
G005-HC-L0-IFN α IgG4		3,6*		0,037**	97
G005-HC-L0-IFN α (R144A) IgG4	186	0,0581	25800	$1,01 \times 10^{-5}$	5750
G005-HC-L0-IFN α (R144S) IgG4	290	0,0372	$1,08 \times 10^5$	$2,41 \times 10^{-6}$	15400
G005-HC-L0-IFN α (R144E) IgG4	ND	ND	$>10^5$	ND	ND
G005-HC-L0-IFN α (R144G) IgG4	ND	ND	9970	2.61×10^{-5}	ND
G005-HC-L0-IFN α (R144H) IgG4	ND	ND	1,690	$1,54 \times 10^{-4}$	ND
G005-HC-L0-IFN α (R144K) IgG4	ND	ND	<100	ND	ND
G005-HC-L0-IFN α (R144N) IgG4	ND	ND	431	0,000603	ND

G005-HC-L0-IFN α (R144Q) IgG4	ND	ND	3500	$7,43 \times 10^{-5}$	ND
G005-HC-L0-IFN α (R144T) IgG4	333	0,0324	30800	$8,44 \times 10^{-6}$	3840
G005-HC-L0-IFN α (R144Y) IgG4	306	0,0353	92100	$2,82 \times 10^{-6}$	12500
G005-HC-L0-IFN α (R144I) IgG4	257	0,0420	$1,59 \times 10^5$	$1,64 \times 10^{-6}$	25600
G005-HC-L0-IFN α (R144L) IgG4	191	0,0565	26700	$9,74 \times 10^{-6}$	5800
G005-HC-L0-IFN α (R144V) IgG4	ND	ND	86900	$2,99 \times 10^{-6}$	ND
G005-HC-L0-IFN α (A145G) IgG4	23.8	0,454	2040	0,000127	3570
G005-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	222	0,0486	52600	$4,94 \times 10^{-6}$	9840
G005-HC-L0-IFN α (A145E) IgG4	ND	ND	<100	ND	ND
G005-HC-L0-IFN α (A145H) IgG4	113	0,0956	24900	$1,04 \times 10^{-5}$	9190
G005-HC-L0-IFN α (A145I) IgG4	ND	ND	28,9	0,00900	ND
G005-HC-L0-IFN α (A145K) IgG4	174	0,0621	$6,62 \times 10^5$	$3,93 \times 10^{-7}$	$1,58 \times 10^5$
G005-HC-L0-IFN α (A145L) IgG4	ND	ND	239	0,00109	ND
G005-HC-L0-IFN α (A145N) IgG4	ND	ND	309	0,000841	ND
G005-HC-L0-IFN α (A145Q) IgG4	ND	ND	709	0,000367	ND
G005-HC-L0-IFN α (A145R) IgG4	ND	ND	$>10^6$	ND	ND
G005-HC-L0-IFN α (A145T) IgG4	ND	ND	<2	ND	ND
G005-HC-L0-IFN α (A145Y) IgG4	91.4	0,118	19200	$1,35 \times 10^{-5}$	8740

С целью определения возможности повышения ASI, как наблюдалось в случае анти-CD20-IFN α гибридных белковых конструкций, было создано несколько разновидностей с помощью аттенуирования IFN части гибридной белковой конструкции "анти-CD38-IFN α " путем мутации. Несколько различных аттенуирующих мутаций было сделано в контексте G005 или других CD38 моноклональных антител. Кроме того, были созданы конструкции различных IgG изотипов (IgG1 и IgG4) и длиной линкера (L0, нет линкера; L6, 6 аминокислотный линкер (SGGGGS, SEQ ID NO: 132)). Нецелевой анализ и два типа целевых анализов (с Daudi и ARP-1), оба подробно описанные выше, были проведены и результаты приведены на фиг. 17-38 и в табл. 25-33. В дискуссии ниже эти результаты обобщены со ссылками на данные в этих таблицах (которые следуют из фиг. 17-38).

Табл. 26 описывает CD38 антитело G005, слитое в разных конфигурациях посредством С-конца тяжелой цепочки с IFN α с R144A аттенуирующей мутацией. Примеры в этой таблице представляют IgG1 и IgG4 изотип и или не имеют линкера между тяжелой цепочкой антитела и IFN, L0, или имеют промежуточный 6-аминокислотный линкер, L6 (состоящей из SEQ ID NOS: 138,140,152,146 (тяжелая цепочка) каждый комбинированный с 134 (легкая цепочка)). Во всех случаях, гибридные белковые конструкции демонстрируют значительно пониженную эффективность в отношении антиген-негативных iLite клеток (понижение от 8300-кратного до 100000-кратного в сравнении со свободным IFN α), но в существенной степени сохраняют эффективность свободного IFN α в отношении CD38 позитивных клеток (Daudi). G005-HC-L0-IFN α (R144A) IgG4 конструкция (состоящая из SEQ ID NOS: 152 (тяжелая цепочка) и 134 (легкая цепочка)), например, обладает 10⁵-кратно пониженной эффективностью по сравнению с диким типом IFN α в отношении антиген-негативных клеток, но его эффективность всего в 3,5 раза (2,7/0,77=3,5) ниже чем у свободного дикого типа IFN α в отношении антиген-позитивных клеток (табл. 26). Это дает индекс антигенной специфичности (ASI) равный 29000 для этой гибридной белковой конструкции.

Таблица 26

Проверяемая конструкция (ТА)	EC50 целевой (пмоль/л) Daudi	EC50 IFN α /EC50 TA (целевой; Daudi)	EC50 нецелевой (пмоль/л) iLite	EC50 IFN α /EC50 TA (нецелевой; iLite)	Индекс антигенной специфичности Колонка 3/ Колонка 5
IFN α	0,77	1.0	0,30	1.0	1.0
G005-HC-L6-IFN α (R144A) IgG4	1.3	0,59	11000	2.7 x 10 ⁻⁵	22000
G005-HC-L0-IFN α (R144A) IgG4	2.7	0,29	30000	1,0 x 10 ⁻⁵	29000
G005-HC-L6-IFN α (R144A) IgG1	1.9	0,41	2600	0,00012	3400
G005-HC-L0-IFN α (R144A) IgG1	7.3	0,11	6800	4,4 x 10 ⁻⁵	2500

В табл. 27 показаны примеры с другой IFN α аттенуирующей мутацией, A145G, в качестве конструкции с таким же G005 антителом IgG1 или IgG4 изотипа, без линкера или с L6 линкером (состоящим из SEQ ID NOS: 142,144,148 (тяжелая цепочка) каждая комбинирована с SEQ ID 134 (легкая цепочка)). G005-HC-L6-IFN α (A145G) IgG4 конструкция (состоящая из SEQ ID NOS: 148 (тяжелая цепочка) и 134 (легкая цепочка)), например, демонстрирует ASI равный 20000.

Таблица 27

Проверяемая конструкция (ТА)	EC50 целевой (пмоль/л) Daudi	EC50 IFN α /EC50 TA (целевой; Daudi)	EC50 нецелевой (пмоль/л) iLite	EC50 IFN α /EC50 TA (нецелевой; iLite)	Индекс антигенной специфичности Колонка 3/ Колонка 5
IFN α	0,48	1.0	0,087	1.0	1.0
G005-HC-L0-IFN α (A145G) IgG1	0,74	0,65	510	0,00017	3800
G005-HC-L6-IFN α (A145G) IgG1	1,0	0,48	730	0,00012	4000
G005-HC-L6-IFN α (A145G) IgG4	0,59	0,81	2200	4.0 x 10 ⁻⁵	20000

В табл. 28 показаны примеры в которых мутировавший IFN α присоединен к легкой цепочке а не к тяжелой цепочке, без линкера или с L6 линкером (состоящим из SEQ ID NOS: 210 или 208 (легкая цепочка), соответственно, каждая комбинирована с SEQ ID NO: 135 (тяжелая цепочка)). В обоих случаях, гибридные белковые конструкции продемонстрировали высокий ASI равный 5900 и 7200 соответственно.

Таблица 28

Проверяемая конструкция (ТА)	EC50 целевой (пмоль/л) Daudi	EC50 IFN α /EC50 ТА (целевой; Daudi)	EC50 нецелевой (пмоль/л) iLite	EC50 IFN α /EC50 ТА (нецелевой; iLite)	Индекс антигенной специфичности Колонка 3/ Колонка 5
IFN α	1,1	1,0	0,21	1,0	1,0
G005-LC-L6-IFN α (A145G) IgG1	8,5	0,13	12000	$1,8 \times 10^{-5}$	7200
G005-LC-L0-IFN α (A145G) IgG1	21	0,052	24000	$8,8 \times 10^{-6}$	5900

В табл. 29 и 30 показаны ASI для тех же гибридных белковых конструкций но с альтернативной клеточной линией (ARP-1, миелома) для определения активности на CD38 клетках. С помощью этого способа ASI этих гибридных белковых конструкций получены в интервале 1200-55000.

Таблица 29

Проверяемая конструкция (ТА)	EC50 целевой (пмоль/л) ARP-1	EC50 IFN α /EC50 ТА (целевой; ARP-1)	EC50 нецелевой (пмоль/л) iLite	EC50 IFN α /EC50 ТА (нецелевой; iLite)	Индекс антигенной специфичности Колонка 3/ Колонка 5
IFN α	6,0	1,0	0,30	1,0	1,0
G005-HC-L6-IFN α (R144A) IgG4	28	0,21	11000	$2,7 \times 10^{-5}$	7800
G005-HC-L0-IFN α (R144A) IgG4	85	0,071	30000	$1,0 \times 10^{-5}$	7100
G005-HC-L6-IFN α (R144A) IgG1	21	0,29	2600	0,00012	2400
G005-HC-L0-IFN α (R144A) IgG1	110	0,054	6800	$4,4 \times 10^{-5}$	1200

Таблица 30

Проверяемая конструкция (ТА)	EC50 целевой (пмоль/л) ARP-1	EC50 IFN α /EC50 ТА (целевой; ARP-1)	EC50 нецелевой (пмоль/л) iLite	EC50 IFN α /EC50 ТА (нецелевой; iLite)	Индекс антигенной специфичности Колонка 3/ Колонка 5
IFN α	9,5	1,0	0,087	1,0	1,0
G005-HC-L0-IFN α (A145G) IgG1	8,0	1,2	510	0,00017	7100
G005-HC-L6-IFN α (A145G) IgG1	4,0	2,4	730	0,00012	20000
G005-HC-L6-IFN α (A145G) IgG4	4,4	2,2	2200	$4,0 \times 10^{-5}$	55000

Отдельные примеры мутировавших разновидностей IFN α , в контексте G005-HC-L0-IFN α IgG4 гибридной белковой конструкции показаны в табл. 25. Большинство этих мутантов (R144 мутирован в A, S, E, G, H, N, Q, T, Y, I, L или V (состоящей из SEQ ID NOS: 152, 172, 156, 158, 160, 168, 170, 174, 178, 162, 166, 176 (тяжелая цепочка) соответственно, каждый комбинирован с SEQ ID NO: 134 (легкая цепочка)) и A145 мутирован в G, D, H, I, K, L, N, Q, R или Y (SEQ ID NOS: 184, 180, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 206 (тяжелая цепочка) соответственно, каждый комбинирован с SEQ ID NO: 134 (легкая цепочка)) демонстрируют значительную аттенуацию IFN α активности в сравнении со свободным диким типом IFN α . В этом контексте, A145V и A145S мутанты не показали особенной аттенуации. Любые из этих точно мутировавших, аттенуированных разновидностей IFN α можно использовать в данном изобретении в

качестве антител гибридных белковых конструкций. Некоторые разновидности IFN являются предпочтительными из-за более высоких значений ASI. При оценке пригодности использования конструкций могут приниматься во внимание также другие соображения, такие как уровень экспрессии, иммуногенность, биофизические характеристики, и т.д. Из множества разновидностей IFN α описанных в этом документе, т.е. которые показывают высокий ASI в контексте антитело-гибридных белковых конструкций включают R144A, R144S, R144T, R144Y, R144I, R144L, R145G, R145D, R145H, R145Y (табл. 25), R33A+YNS (как показано в конструкции включающей SEQ ID NOS: 286 (тяжелая цепочка) и 276 (легкая цепочка)), R33A (как показано в конструкции включающей SEQ ID NOS: 436 (тяжелая цепочка) и 276 (легкая цепочка)) и R144A+YNS (как показано в конструкции включающей SEQ ID NOS: 288 (тяжелая цепочка) и 276 (легкая цепочка)).

Мутации A145D в конструкции SEQ ID NOS: 180 (тяжелая цепочка) и 134 (легкая цепочка) в сравнении с A145E мутацией в конструкции SEQ ID NO: 182 (тяжелая цепочка) и 134 (легкая цепочка) показывает неожиданные результаты. Хотя обе конструкции имеют схожие аминокислотные последовательности, отличающиеся только одной метиленовой группой, они демонстрируют очень разное влияние на нецелевую активность IFN α . A145E мутация оказывает минимальное влияние на IFN α активность, однако A145D мутация очень сильно понижает активность (в 20000 раз) и приводит к конструкции с высоким значением ASI (9840).

Другие примеры гибридных белковых конструкций "анти-CD38 антитело-аттенуированный IFN α " приведены в табл. 31-33. Вдобавок к G005 антительной конструкции, эти таблицы показывают целевую активность, нецелевую активность и ASI для гибридных белковых конструкций "анти-CD38 антитело-аттенуированный IFN α " основанных на некоторых новых антителах. Гибридные белковые конструкции этих антител с IFN α A145D или R144A мутациями включают следующие:

X910/12-HC-L0 IFN α (A145D) IgG4 состоящей из SEQ ID NOS: 248 (тяжелая цепочка) и SEQ ID NO: 242 (легкая цепочка);

X910/12-HC-L0 IFN α (R144A) IgG4 состоящей из SEQ ID NOS: 246 (тяжелая цепочка) и SEQ ID NO: 242 (легкая цепочка);

X913/15-HC-L0 IFN α (A145D) IgG4 состоящей из SEQ ID NOS: 256 (тяжелая цепочка) и SEQ ID NO: 250 (легкая цепочка);

X913/15-HC-L0 IFN α (R144A) IgG4 состоящей из SEQ ID NOS: 254 (тяжелая цепочка) и SEQ ID NO: 250 (легкая цепочка);

X355/02-HC-L0 IFN α (A145D) IgG4 состоящей из SEQ ID NOS: 232 (тяжелая цепочка) и SEQ ID NO: 226 (легкая цепочка);

X355/02-HC-L0 IFN α (R144A) IgG4 состоящей из SEQ ID NOS: 230 и SEQ ID NO: 226 (легкая цепочка);

X355/07-HC-L0 IFN α (A145D) IgG4 состоящей из SEQ ID NOS: 240 (тяжелая цепочка) и SEQ ID NO: 234 (легкая цепочка);

X355/07-HC-L0 IFN α (R144A) IgG4 состоящей из SEQ ID NOS: 238 и SEQ ID NO: 234 (легкая цепочка);

R5D1-HC-L0 IFN α (A145D) IgG4 состоящей из SEQ ID NOS: 262 (тяжелая цепочка) и 258 (легкая цепочка);

R5E8-HC-L0 IFN α (A145D) IgG4 состоящей из SEQ ID NOS: 268 (тяжелая цепочка) и 264 (легкая цепочка); и

R10A2-HC-L0 IFN α (A145D) IgG4 состоящей из SEQ ID NOS: 274 (тяжелая цепочка) и 270 (легкая цепочка).

Все эти гибридные белковые конструкции демонстрируют высокие значения ASI, в интервале от 3820 (X910/12-HC-L0-IFN α (R144A) IgG4) до 166000 (X355/02-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4).

Таблица 31

Проверяемая конструкция (ТА)	EC50 целевой (пмоль/л) ARP-1	EC50 IFN α /EC50 ТА (целевой; ARP-1)	EC50 нецелевой (пмоль/л) iLite	EC50 IFN α /EC50 ТА (нецелевой; iLite)	Индекс антигенной специфичности Колонка 3/ Колонка 5
IFN α	8,91	1,00	0,499	1,00	1,00
G005-HC-L0-IFN α (R144A) IgG4	220	0,0405	73200	6.82×10^{-6}	5940
X910/12-HC-L0-IFN α (R144A) IgG4	191	0,0466	41000	1.22×10^{-5}	3820
X913/15-HC-L0-IFN α (R144A) IgG4	84,1	0,106	29600	1.69×10^{-5}	6270
X355/02-HC-L0-IFN α (R144A) IgG4	147	0,0606	70500	7.08×10^{-6}	8560
X355/07-HC-L0-IFN α (R144A) IgG4	61,2	0,146	70300	7.10×10^{-6}	20600

Таблица 32

Проверяемая конструкция (ТА)	EC50 целевой (пмоль/л) ARP-1	EC50 IFN α /EC50 ТА (целевой; ARP-1)	EC50 нецелевой (пмоль/л) iLite	EC50 IFN α /EC50 ТА (нецелевой; iLite)	Индекс антигенной специфичности Колонка 3/ Колонка 5
IFN α	43,0	1,00	0,304	1,00	1,00
G005-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	85,7	0,502	47100	$6,44 \times 10^{-6}$	78000
X910/12-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	336	0,128	22500	$1,35 \times 10^{-5}$	9480
X913/15-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	68,1	0,631	31800	$9,59 \times 10^{-6}$	65800
X355/02-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	46,0	0,935	53900	$5,64 \times 10^{-6}$	$1,66 \times 10^5$
X355/07-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	61,9	0,695	61800	$4,92 \times 10^{-6}$	$1,41 \times 10^5$

Таблица 33

Проверяемая конструкция (ТА)	EC50 целевой (пмоль/л) ARP-1	EC50 IFN α TA (целевой; ARP-1)	EC50 нецелевой (пмоль/л) iLite	EC50 IFN α TA (нецелевой; iLite)	Индекс антигенной специфичности Колонка 3/ Колонка 5
IFN α	16,1	1,00	0,271	1,00	1,00
R5D1-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	51,3	0,314	49500	5,48 x 10 ⁻⁶	57300
R5E8-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	89,2	0,180	38400	7,06 x 10 ⁻⁶	25500
R10A2-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	32,7	0,492	29600	9,16 x 10 ⁻⁶	53700
X355/02-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	104	0,155	81600	3,32 x 10 ⁻⁶	46700

Вышеприведенные примеры демонстрируют, что мутировавшие, аттенуированные формы IFN α , связанные с антителом, нацеленным на CD20 (SEQ ID NO: 430) или CD38 (SEQ ID NO: 131), показывают в разы увеличенную эффективность передачи сигнала IFN на антиген-позитивных целевых клетках по сравнению с антиген-негативными нецелевыми клетками. Результаты приведенные ниже демонстрируют дальнейшие примеры с антителами, нацеливающими аттенуированный IFN α на два других антигена CD138 и класс I MHC.

CD138 (SEQ ID NO: 432), также называемое Syndecan-1, является гепарин сульфат протеогликаном, который функционирует как адгезивная молекула. Оно экспрессируется на большинстве клеток множественной миеломы (Dhodapkar, Blood; 91: 2679, 1998). Были созданы гибридные белковые конструкции, состоящий из мутированного, аттенуированного IFN α и CD138-нацеливающего антитела pBT062 (Ikeda, Clin Can Res., 15:4028, 2009; USPTO #20090175863, состоящего из SEQ ID NOS: 330 (тяжелая цепочка) и 326 (легкая цепочка)). Как показано на фиг. 39, эта гибридная белковая конструкция, подобно "анти-CD38-аттенуированный IFN α " гибридной белковой конструкции, демонстрирует намного большую анти-пролиферативную эффективность в отношении клеток множественной миеломы (ARP-1, целевой анализ) чем нецелевой изотипный гибридный белок (на основе антитела 2D12). На фиг. 39 показано, что при концентрации 28pM (4-я наиболее высокая из проверенных концентраций) pBT062-HC-L0-IFN α (A145D) демонстрирует большую антипролиферативную активность в отношении ARP-1 миеломной клеточной линии, чем изотип-HC-L0-IFN α (A145D) белок при концентрации 6 нмоль/л (наиболее высокая из проверенных концентраций).

Другим антигеном, который был описан как потенциальная мишень для антителной терапии при лечении рака, является MHC I класса (см. например Stein, Leuk. Lymphoma 52(2):273-84, 2011). С целью определения пригодности использования его в целях данного исследования, антитело W6/32 (Barns таблица et al. (1978), Cell 14:9-20), получили от ATCC (HB95). Это антитело реагирует с мономорфными детерминантами на молекулы человеческого HLA A,B,C. Вариабельные участки антитела клонировали и подвергли секвенированию с помощью наборов SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech, Mountain View, CA) и Mouse Ig-Primer Sets (Novagen/EMD Chemicals, San Diego, CA). Аминокислотные последовательности вариабельных участков тяжелой цепочки и легкой цепочки показаны как SEQ ID NOS: 411 и 410 соответственно. Экспрессировали химерную разновидность HB95 с мышиными вариабельными участками и константными участками человеческого IgG4 каппа, слитое с IFN α с A145D мутацией (HB95-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4, состоящей из SEQ ID NOS: 316 (тяжелая цепочка) и 312 (легкая цепочка)), и его активность сравнивали с изотипным контрольным антителом, слитым таким же образом с таким же IFN α мутантом (Изотип-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4, где изотипные вариабельные участки происходят от антитела 2D12). "Целевой (ARP-1)" анализ проводили в соответствии с вышеприведенным описанием для CD38-нацеленного антитела (ARP-1 является MHC I класса-позитивным). Результаты приведены на фиг. 40а. I класса MHC-нацеленный аттенуированный IFN α в разы более эффективен чем гибридная белковая конструкция "изотипный контроль-аттенуированный IFN α " в отношении таких же клеток, и девятикратно (139/16=8,7) относительно дикого типа IFN α . Хотя HB95-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4 демонстрирует значительную активность при концентрации ниже 100 пмоль/л, изотип-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4 демонстрирует отсутствие значимой активности даже при концентрации 6 нмоль/л.

На фиг. 40b продемонстрировано что фрагменты антитела могут замещать полноразмерные антитела и обладать схожими свойствами, а именно высокими ASI. На фиг. 40b показаны эффекты различных Fab-аттенуированных IFN α гибридных белковых конструкций на пролиферацию ARP-1 клеток. Две не-ARP-1 нацеленные конструкции, "пализумаб-НС-L6-IFN α (A145D) Fab" (состоящая из SEQ ID NOS: 298 (тяжелая цепочка) и 290 (легкая цепочка)) и "2D12-НС-L6-IFN α (A145D) Fab" (состоящая из SEQ ID NOS: 356 (тяжелая цепочка) и 344 (легкая цепочка)), демонстрируют очень низкую эффективность на этой линии клеток (EC50 2410-17000). Для сравнения, когда Fab фрагмент гибридной белковой конструкции нацелен на антиген клеточной поверхности, в данном случае МНС I класса, как в случае гибридной белковой конструкции "HB95-НС-L6-IFN α (A145D) Fab" (состоящей из SEQ ID NOS: 320 (тяжелая цепочка) и 312 (легкая цепочка)), эффективность выше чем у свободного, дикого типа IFN α . Антиген-нацеленная аттенуированная конструкция в 2760-19450 раз более эффективна, чем ненацеленная аттенуированная конструкция.

Антивирусная активность нацеленного, аттенуированного IFN α .

Антивирусная активность IFN α хорошо известна и рекомбинантный IFN α является одобренным FDA лечением для вирусных инфекций гепатита С. Сравнивали эффект нацеленной и не нацеленной на поверхность клетки-хозяина гибридной белковой конструкции "антитело-аттенуированный IFN α " на цитопатическую активность EMC вируса на A549 клетках, которые являются класс I МНС-позитивными.

Способы.

IFN активность измеряли с помощью анализа ингибирования цитопатического эффекта (CPE) как описано в Rubinstein (J. Virol. 37, 755-8, 1981). Вкратце, 10⁴ человеческих аденокарциномных A549 клеток (ATCC, Manassas, Kansas) на лунку инкубировали с проверяемым образцом или IFN (человеческий IFN- α 2A) в течение ночи. Клетки после этого подвергали действию EMC вируса на 48-56 ч, с последующим окрашиванием кристаллическим фиолетовым. Проводили визуальное определение CPE с последующей солубилизацией кристаллического фиолетового и измерением абсорбции при 570 нмоль/л. Нелинейный регрессионный анализ проводили с помощью 4-параметрного сигмодулярного совмещения с вариабельной кривой (GraphPad Prism). Единица активности IFN α определяется как количество интерферон, необходимое для уменьшения цитопатического эффекта на 50%. Единицы определяются в отношении международного стандарта человеческого IFN α 2, предоставленного Национальным институтом здоровья (см. Pestka, S. "Interferon Standards and General Abbreviations," in *Methods in Enzymology* (S. Pestka, ed.), Academic Press, New York vol 119, pp. 14-23, 1986). Образцы, тестируемые в этом анализе, были IFN α (Intron A, обращенные треугольники), анти-МНС класс I нацеленный аттенуированный IFN α обозначенный HB95-НС-L0-IFN α (R145D) IgG4 (закрытые квадраты), и изотипный контроль (2D12)-аттенуированный IFN α (изотип-НС-L0-IFN α (R145D) IgG4; треугольники). Данные показаны в виде жизнеспособности vs IFN α молярные эквиваленты.

Результаты.

Результаты приведены на фиг. 41. В этом анализе IFN α защищает A549 клетки от произведенного вирусом цитопатического эффекта (CPE), демонстрируя EC50 0,18 пмоль/л. Введение R145D мутации в IFN α (и присоединение его к антителу, не связывающему A549 клетки) понижает его антивирусную эффективность в 108000 раз (19461/0,18=108167). в отличие от этого, присоединение того же мутанта IFN к A549-нацеленному антителу (HB95), повышает эффективность в ~17000 раз (19461/1,15=16923). Это соответствует ASI со значением 16900 (19461/1,15=16922).

Нацеленный, аттенуированный IFN β .

В отношении IFN β в ряде публикаций было показано (см. выше), что он обладает антипролиферативной активностью в отношении различных типов раковых клеток. Поэтому была создана гибридная белковая конструкция анти-CD38 антитела (G005) и IFN β (SEQ ID NO: 91), G005-НС-L0-IFN β IgG4 (состоящая из SEQ ID NOS: 212 (тяжелая цепочка) и 134 (легкая цепочка)) а также идентичная конструкция, несущая единичную мутацию мутация (R35A), понижающую эффективность IFN β (Runkel et al. J. Biol. Chem. 273:8003-8 (1998), состоящая из SEQ ID NOS: 214 (тяжелая цепочка) и 134 (легкая цепочка)). В обеих конструкциях, неспаренный цистеин в позиции 17 в IFN β был мутирован в серин с целью улучшения выхода экспрессии и гомогенности продукта. На фиг. 42 показана активность этих трех белков в условиях отсутствия антительного нацеливания ("нецелевой анализ" с помощью iLite kit). В этом анализе присоединение IgG к N-концу IFN β аттенуирует его эффективность в 72 раза (57,6/0,799=72). После R35A мутации в этой гибридной белковой конструкции, его эффективность далее понижается 280 раз (16100/57,6=280) так что она становится в 20150 раз (16100/0,799=20150) менее эффективной, чем свободный, дикий тип IFN β . Для сравнения на фиг. 43 показана эффективность этих трех белков в условиях нацеливания CD38 антителом IFN β на клетки. В этом анализе гибридная белковая конструкция "антитело-аттенуированный IFN β " (G005-НС-L0-IFN β (R35A) IgG4) только в 1,4 раза (46,9/32,7=1,4) менее эффективна, чем гибридная белковая конструкция "антитело-не-аттенуированный IFN β " и только в 4,5 раза (46,9/10,5=4,5) менее эффективна, чем свободный, дикий тип IFN β . Эти данные показаны в табл. 34. Так демонстрируется, что неожиданное открытие, заключающееся в том, что аттенуирующие мутации в ин-

терфероне, который является частью гибридной белковой конструкции "антитело-IFN" может непропорционально влиять на нецелевые vs. целевые клетки, как наблюдалось для IFN α (табл. 20), также подтверждается в отношении IFN β . В данном примере гибридной белковой конструкции "анти-CD38-IFN β ", аттенуирующая мутация понижает эффективность только в 1,4 раза в условиях, когда антитело может направлять IFN на целевые клетки, по сравнению с 280-кратным понижением эффективности для клеток, в которых гибридная белковая конструкция не может нацелиться на антиген клеточной поверхности. В результате, гибридная белковая конструкция "антитело-аттенуированный IFN β " в данном примере демонстрирует ASI со значением 4630 (табл. 34). R147A мутация в IFN β , как альтернатива R35A мутации, также позволяет получить гибридные белковые конструкции "антитело-IFN β " со значительно большим ASI, чем у свободного IFN β (данные не показаны). Примеры ниже показывают, что такое "селективное аттенуирование" также может наблюдаться с лигандами, структурно не связанными с IFN α и β , а именно с IL-4 и IL-6.

Таблица 34

Проверяемая конструкция (ТА)	EC50 целевой (пмоль/л) ARP-1	EC50 IFN β /EC50 ТА (целевой; ARP-1)	EC50 нецелевой (пмоль/л) iLite	EC50 IFN β /EC50 ТА (нецелевой; iLite)	Индекс антигенной специфичности Колонка 3/ Колонка 5
IFN β	10,5	1,00	0,799	1,00	1,00
G005-HC-L0-IFN β (R35A) IgG4	46,9	0,224	16100	$4,84 \times 10^{-5}$	4630
G005-HC-L0-IFN β IgG4	32,7	0,321	57,6	0,0135	23,8

Интерлейкин-4 (IL-4).

IL-4 является спиральным цитокином с различной физиологической активностью, включая способность смещать развитие Т хелперных клеток в сторону Th2, а не Th1. Т.к. Th1 клетки играют патологическую роль в некоторых аутоиммунных процессах, может быть терапевтически выгодным использовать IL-4 для влияния на развитие Т хелперных клеток в сторону от Th1, т.е. создать "Th1 отклонение." Чтобы избежать побочных эффектов, относящихся к активности IL-4 в отношении других типов клеток, может быть желательным аттенуировать IL-4 активность с помощью его мутации, и после этого присоединить его к антителу, которое нацелит его на активированные (предпочтительно недавно активированные) хелперные Т клетки. Выбранным для этой цели антителом является J110, мышинный анти-человеческий PD-1 клон, описанный Iwai et.al. (Immunol Lett. 83:215-20, 2002). PD-1 (SEQ ID NO: 431) экспрессируется на недавно активированных Th0 клетках.

J110 антитело (мышинные вариабельные участки и человеческие IgG1:каппа константные участки; аминокислотные последовательности J110 вариабельных участков тяжелой и легкой цепочек показаны на SEQ ID NOS: 409 и 408, соответственно) слили с человеческим IL-4 (SEQ ID NO: 119), последний присоединили к С-концу тяжелых цепочек с помощью промежуточного шести-аминокислотного линкера, L6 (SGGGGS, SEQ ID NO: 132). Кроме этого J110-HC-L6-IL4 IgG1 белка (состоящего из SEQ ID NOS: 304 (тяжелая цепочка) и 300 (легкая цепочка)), была сделана его разновидность с единичным замещением в IL-4 компоненте, J110-HC-L6-IL-4 (R88Q) IgG1 (состоящий из SEQ ID NOS: 306 (тяжелая цепочка) и 300 (легкая цепочка)). R88Q мутация в IL-4 понижает его эффективность in vitro (Kruse, EMBO Journal vol.12 no. 13 pp.5121 -5129, 1993).

Способы.

"Нецелевой (НВ-IL4) анализ" проводили в основном как описано производителем для HEK-Blue IL4/IL13 клеточной линии. HEK-Blue™ IL-4/IL-13 клетки специфично созданы для контроля активации STAT6 пути, который стимулируется IL-4. Клетки создали введением человеческого STAT6 гена в HEK293 клетки чтобы получить полностью активный STAT6 сигнальный путь. HEK-Blue™ IL-4/IL-13 клетки стабильно экспрессируют репортерный ген, секретируемую эмбрионную щелочную фосфатазу (SEAP), под контролем IFN β минимального промотора слитого с четырьмя STAT6 центрами связывания. Активация STAT6 пути в HEK-Blue™ IL-4/IL-13 клетках стимулирует экспрессию SEAP репортерного гена. SEAP после этого секретируется в среду и может быть количественно оценен с использованием колориметрического реагента QU АНТИ-Blue™. Вкратце, HEK-Blue IL4/IL13 клетки (Invivogen, San Diego CA cat# hkb-stat6) были разморожены и культивированы в DMEM среде (Mediatech, Manassas VA, cat# 10-013-CV) + 10% FBS (Hyclone, Logan UT, cat# SH30070,03) которая была активирована нагреванием (HI FBS). После одного прохода, 10 мкг/мл бластицидина (Invivogen cat# ant-bl-1) и 100 мкг/мл зеоцина (Invivogen cat# ant-zn-1) добавили в культурную среду. После еще одного прохода, клеткам позволили достичь 60-80% слияния и после этого подыняли с помощью Cell Stripper (Mediatech, cat# 25-056-CI). Клетки дважды промыли DMEM + HI FBS и подсчитали. Клетки отрегулировали до $2,8 \times 10^5$ живых кле-

ток/мл в DMEM + HI FBS и разлили по 180 мкл на лунку в плоскодонный 96-луночный культивировочный планшет (далее, "экспериментальный планшет"). После этого, 20 мкл IL-4 или гибридной белковой конструкции, разбавленной DMEM + HI FBS, добавили в каждую лунку. Планшет инкубировали при 37°C 5% CO₂ в течение 16-24 ч. QU АНТИ-Blue (Invivogen, cat# rep-qb1) приготовили в соответствии с рекомендациями производителя. QU АНТИ-Blue (160 мкл) добавили в каждую лунку плоскодонного планшета (далее, "анализационный планшет"). После этого, 40 мкл надосадочной жидкости с лунок экспериментального планшета перенесли на анализационный планшет. Анализационный планшет после этого инкубировали при 37°C в течение 1-3 ч. Адсорбцию анализационного планшета при 630 нм считали с помощью счетчика 1420-41 Victor 3V Multilabel Counter от Perkin-Elmer. Данные проанализировали с помощью Graph Pad Prism.

"Целевой (Th1 отклонения) анализ" разработали для мониторинга доли CD4⁺ Т клеток Th1 фенотипа, по их экспрессии IFN-γ. Th1 отклонение тем самым оценили количественно по понижению количества IFN-γ -позитивных CD4 Т клеток.

Анализ провели следующим образом. "Загруженные" гранулы Dynabeads (M450 Epoxy beads, Invitrogen Dynal, Oslo, Norway cat# 140,11) были получены по описанию производителя с 1,0 мкг/10⁷ гранул анти-человеческого CD3 ипсилон антитела (R&D Systems, Minneapolis MN, cat# MAB100), 1,0 мкг/10⁷ гранул анти-человеческого CD28 антитела (R&D Systems, cat# MAB342) и 3 мкг/10⁷ гранул человеческого IgG (R&D Systems, cat# 1-001-A). PBMC были получены от Stanford Blood Center, Palo Alto CA. Наивные CD4⁺ Т клетки очистили от конусов системы понижения лейкоцитов (LRS) с использованием набора наивных CD4⁺ (Miltenyi Biotech cat# 130-094-131) в соответствии с рекомендациями производителя. Всего 4,0×10⁵ очищенных наивных CD4⁺ Т-клеток нанесли на каждую лунку 24 луночного планшета (далее, "экспериментальный планшет") в 1,3 мл RPMI 1640 (Mediatech, cat# 10-040-CV) + 10% HI FBS+100 единиц/мл IL-2 (Peprotech, cat# 200-02), далее называемой Media-Q. После этого добавили 4,0×10⁵ "нагруженных" Dynabeads на лунку. IL-12 (Peprotech, cat# 200-12) разбавили Media-Q и 100 мкл добавили к соответствующим лункам до финальной концентрации 10 нг/мл. Гибридные белковые конструкции или IL-4 разбавили Media-Q и 100 мкл добавили к соответствующим лункам. Media-Q добавили к соответствующим лункам чтобы довести общий объем каждой лунки до 1,5 мл. Экспериментальный планшет инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение пяти дней. Наутро пятого дня добавили форболмиристацетат (PMA) добавили ко всем лункам до финальной концентрации 50 нг/мл и также добавили ко всем лункам иономицин до финальной концентрации 1,0 мкг/мл. Брефелдин А добавили к до финальной концентрации 1,0 мкг/мл культуры. Экспериментальный планшет инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение минимум 4 ч. Приблизительно 1/3 объема каждой лунки экспериментального планшета после этого подвергли подготовке к внутриклеточной проточной цитометрии в соответствии с инструкциями, поставляющимися с вышеупомянутым набором и используя реагенты из набора. Клетки окрасили для внутриклеточного интерферон-гамма с анти-человеческим интерферон-гамма антителом конъюгированным с AF647 (eBiosciences.com, cat# 51-7319-42). Образцы анализировали с помощью поточной цитометрии на Becton Dickinson FACSort с помощью Cell Quest программы. Полученные образцы анализировали с помощью FloJo программы и данные использовали для построения графиков с помощью Graph Pad Prism программы.

Результаты.

При отсутствии антитело-основанного нацеливания, как измерено в "нецелевом (НВ-IL4) анализе," IL4 показал EC50 1,26 пмоль/л (фиг. 44; табл. 35). Присоединение IgG1 к IL4 (например, конструкция J110-НС-L6-IL4 IgG1, в которой дикий тип человеческой IL-4 последовательно присоединен к С-концу химерного J110 антитела, распознающего PD-1, с промежуточным линкером L6) понижает эффективность в 5,46 раз (6,88/1,26=5,46). При введении R88Q точечной мутации в IL-4 часть этой конструкции, эффективность далее уменьшилась в 35600 раз (44800/1,26 = 35555) по сравнению со свободным IL-4. Гибридная белковая конструкция второго антитела-IL-4 (R88Q) (Изотип-НС-L6-IL4 (R88Q) IgG1, состоящая из SEQ ID NOS: 358 (тяжелая цепочка) и 344 (легкая цепочка)) показала схожую эффективность. Изотипное антитело, использованное в этом эксперименте, было 2D12.

Таблица 35

Проверяемая конструкция (ТА)	ЕС50 целевой (пмоль/л) Th1 отклонение	ЕС50 IL4/ЕС50 ТА (Th1 отклонение)	ЕС50 нецелевой (пмоль/л) HB-IL4	ЕС50 IL4/ЕС50 ТА (нецелевой; HB-IL4)	Индекс антигенной специфичности Колонка 3/ Колонка 5
IL4	11,4	1,00	1,26	1,00	1,00
J110-НС-L6-IL4 IgG1	31,8	0,358	6,88	0,183	1,96
J110-НС-L6-IL4 (R88Q) IgG1	46,1	0,247	44800	$2,81 \times 10^{-5}$	8790
Изотип-НС-L6-IL4 (R88Q) IgG1	>1000	ND	19200	$6,56 \times 10^{-5}$	ND

Результаты "целевого (Th1 отклонение) анализа" приведены на фиг. 45. Активация наивных (Th0) CD4 клеток стимулирует PD-1 экспрессию, так что анти-PD1-IL-4 гибридные белковые конструкции могут нацеливать на них IL-4. В этом анализе свободный, дикий тип IL4 показывает ЕС50 11,4 пмоль/л. Примечательно, что гибридная белковая конструкция "анти-PD1-аттенуированный IL-4" (J110-НС-L6-IL4 (R88Q) IgG1), которая в 35600 раз менее эффективна чем свободный, дикий тип IL-4 в "нецелевом (HB-IL4) анализе" была почти так же эффективна как IL-4 в этом целевом анализе (на 1/4 также эффективна; $11,4/46,1=0,25$). Неаттенуированная PD-1 нацеленная гибридная белковая конструкция (J110-НС-L6-IL4 IgG1) была лишь немного более эффективна чем аттенуированная форма (в 1,45 раза более эффективна; $46,1/31,8=1,45$). Нецелевая, аттенуированная IL-4 гибридная белковая конструкция (Изотип-НС-L6-IL4 R88Q) IgG1, была существенно менее эффективна чем нацеленная аттенуированная гибридная белковая конструкция, но ее эффективность была слишком низка для точного определения ЕС50 в этом эксперименте.

Интерлейкин-6 (IL-6).

IL-6 (SEQ ID NO: 123) обладает рядом активностей в отношении различных типов клеток и может быть полезным использовать некоторый эти активности за счет других. Например, нацеливанием на свежее активированные CD4⁺ Т клетки (посредством присоединения к анти-PD1 антителу, как в примере выше с IL-4 нацеливанием, например), можно сдвинуть популяцию Т хелперных клеток с Treg сигнального пути в пользу Th17 пути. Это может принести пользу раковым пациентам.

Способы.

"IL-6 биоанализ" провели с использованием HEK-Blue™ IL-6 клеток (Invivogen, cat# hkb-il6), разработанной репортерной клеточной линией для мониторинга активации JAK-STAT сигнального пути IL-6. Эти клетки создали с помощью внедрения человеческого IL-6R гена в HEK293 клетки. Кроме того, клетки далее трансфектировали с репортерным геном, экспрессирующим SEAP под контролем IFN β минимального промотора, слитого с четырьмя STAT3 центрами связывания. В этих клетки, IL-6 стимулирует активацию STAT3 и вызывает секрецию SEAP. SEAP после этого наблюдают с использованием SEAP детекционной среды QU АНТИ-Blue™. Анализ проводили в основном по описанию производителя (Invivogen). Вкратце, HEK-Blue IL6 клетки были разморожены и культивированы в DMEM (Mediatech, Manassas VA, cat# 10-013-CV) + 10% FBS (Hyclone, Logan UT, cat# SH30070,03) которая была активирована нагреванием (HI FBS). После одного прохода, 200 мкг/мл HygroGold, (Invivogen cat# ant-hg-1) и 100 мкг/мл Zeocin, (Invivogen cat# ant-zn-1) добавили в культурную среду. После еще одного прохода, клеткам позволили достичь 60-80% слияния и после этого подняли с помощью Cell Stripper (Mediatech, cat# 25-056-CI). Клетки дважды промыли DMEM + HI FBS и подсчитали. Клетки отрегулировали до 2.8×10^5 живых клетки/мл в DMEM+HI FBS и 180 мкл и разлили по 180 мкл на лунку в плоскодонный 96-луночный культивировочный планшет (далее, "экспериментальный планшет"). После этого, 20 мкл IL-6 или гибридной белковой конструкции разбавленной DMEM+HI FBS, добавили в каждую лунку. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 16-24 часов. QU АНТИ-Blue (Invivogen, cat# rep-qb1), приготовили в соответствии с рекомендациями производителя, добавили в каждую лунку плоскодонного планшета (160 мкл на лунку) (далее, "анализационный планшет"). После этого, 40 мкл надосадочной жидкости с лунок экспериментального планшета перенесли на анализационный планшет. Анализационный планшет после этого инкубировали при 37°C в течение 1-3 ч. Адсорбцию анализационного планшета при 630 им считали с помощью 1420-41 Victor 3V Multilabel Counter от Perkin-Elmer. Данные проанализировали с помощью Graph Pad Prism.

С целью проверки, может ли IL-6 быть аттенуирован и нацелен, с тем чтобы достичь высокого индекса антигенной специфичности (ASI), IL-6 несущий 16-мер линкер (L16, SGGGGSGGGSGGGGS, SEQ ID NO: 133) на N-конце слили с антителом, нацеленным на класс I MHC, с использованием HB95 антитела (которое связывается с человеческим класс I MHC антигеном, в соответствии с вышеприведен-

ным описанием) в сравнении с изотипным контрольным антителом 2D12 (как описано выше). Ненацеленную изотипную контрольную гибридную белковую конструкцию 2D12-НС-L16-IL6 IgG1 (состоящую из SEQ ID NOS: 360 (тяжелая цепочка) и 344 (легкая цепочка)), сравнивали с свободным IL-6 в "IL-6 биоанализе" описанном выше (фиг. 46). Гибридное антитело показало в 10 раз пониженную эффективность в сравнении со свободным IL-6 ($10,9/1,04=10,5$). При введении R179E мутации (известной как понижающая эффективность IL-6; Kalai, Blood 89(4): 1319-33, 1997)) в эту гибридную белковую конструкцию, получившаяся конструкция (2D12-НС-L16-IL6(R179E) IgG1, состоящая из SEQ ID NOS: 362 (тяжелая цепочка) и 344 (легкая цепочка)) была еще более аттенуирована, демонстрируя в 79400 раз более низкую эффективность в сравнении со свободным, диким типом IL-6 ($82600/1,04=79400$). В отличие от этого, когда аттенуированный IL-6 присоединяли к антителу (HB95), которое связывает антиген (класс I МНС) на клетках HEK-Blue™ IL-6 (HB95-НС-L16-IL-6(R179E) IgG1, состоящей из SEQ ID NOS: 324 (тяжелая цепочка) и 312 (легкая цепочка)), эффективность увеличилась в сравнении с гибридной белковой конструкцией "нецелевое антитело-аттенуированный IL-6" в 953 раз ($82600/86,7=953$). Эта эффективность всего в 6,99 раз ниже, чем у нацеленного дикого типа IL-6 гибридной белковой конструкции (HB95-НС-L16-IL6 IgG1, состоящей из SEQ ID NOS: 322 (тяжелая цепочка) и 312 (легкая цепочка)); $86,7/12,4=6,99$). Другими словами, в отсутствие антитело-антигенного нацеливания и в контексте антитело-IL-6 гибридных белковых конструкций, R179E мутация понижает эффективность IL-6 в 7580 раз ($82600/10,9=7580$) в сравнении с 6,99-кратным понижением в присутствии нацеливания.

In vivo исследования антитело-направленного аттенуированного IFN α .

Для подтверждения активности "антитело-аттенуированный лиганд" гибридных белковых конструкций по данному изобретению in vivo было проведено несколько экспериментов с конструкциями, состоящими из антитела к CD38, которое экспрессируется на поверхности клеток множественной миеломы, и аттенуированной разновидности IFN α 2b. В большинстве исследований их сравнивали с нецелевой контрольной гибридной белковой конструкцией, называемой здесь "изотипным контролем". Вариабельные участки антитела изотипного контроля происходят от антитела 2D12, которое используется против вируса желтой лихорадки (Shlesinger, Virology 125: 8-17, 1983).

В первом эксперименте использовали ксенотрансплантантную модель, в которой клеточная линия множественной миеломы NCI-H929 (ATCC CRL-9068, Gazdar, Blood 67: 1542-1549, 1986) подкожно растет у иммунокомпрометированных (SCID) мышей.

Способы.

СВ.17 SCID мышам возрастом от 8 до 12 недель подкожно вводили в бок 1×10^7 NCI-H929 раковых клеток в 50% Matrigel. По достижению опухоли среднего размера 120-150 мм³, мышам сгруппировали в 5 групп по 10 животных начали лечение в момент времени ноль (T0). Все лечение вводили посредством внутривенных инъекций (i.p.) дважды в неделю в течение 5 недель (как обозначено под графиком). Все соединения вводили в количестве 200 мкг на дозу (приблизительно 10 мг/кг) за исключением интерферона- α . IFN α 2b (Intron A®, Schering Corp., Merck, Whitehouse Station, NJ) вводили в количестве 2 млн единиц на дозу. Объем опухоли измеряли дважды в неделю штангенциркулем. Конечной точкой был размер опухоли 2000 мм³.

Результаты.

Результаты приведены в фиг. 47. Лечение такой подкожной множественной миеломы интерфероном- α (закрытые ромбы) слегка задержало рост опухоли в сравнении с носителем ($P<0,05$, закрытые кружки). Лечение чистым анти-CD38 антителом (G005 IgG1, состоящим из SEQ ID NOS: 135 (тяжелая цепочка) и 134 (легкая цепочка)), (закрытые квадраты) не оказало существенного эффекта на рост опухоли в сравнении с носителем. Все мыши в этих группах достигли конечной точки (2000 мм³) к 30 дню. Гибридная белковая конструкция "нецелевой изотипный контроль-аттенуированный IFN α " (изотип-НС-L6-IFN α (A145G) IgG1, состоящей из SEQ ID NOS: 348 (тяжелая цепочка) и 344 (легкая цепочка) (открытые обращенные треугольники) не показала существенной активности в задержке роста опухоли, предположительно из-за долгого периода полувыведения "антитело-IFN α " гибридной белковой конструкции и соответствующего увеличенного системного действия. Гибридная белковая конструкция "CD38-нацеленный аттенуированный IFN α " (G005-НС-L6-IFN α (A145G) IgG1, состоящая из SEQ ID NOS: 144 (тяжелая цепочка) и 134 (легкая цепочка)), наоборот, показала очень сильную противораковую активность в сравнении с нецелевой гибридной белковой конструкцией ($P<0,0001$) или другими проверяемыми соединениями. Гибридная белковая конструкция "нацеленный анти-CD38-аттенуированный IFN α " полностью удалила опухоль у всех (10/10) мышей до неопределимого уровня к 22 дню без рецидивов во время исследования.

Гибридную белковую конструкцию "анти-CD38-аттенуированный IFN α " (G005-НС-L6-IFN α (A145G) IgG1) проверяли на модели системной множественной миеломы на клеточной линии MM1S (Crown Bioscience Inc., Santa Clara; Greenstein, Exp Hematol. Apr;31(4):271-82,2003).

Способы.

NOD-SCID мышам возрастом 6-8 недель внутривенно вводили 1×10^7 MM1S клетки опухоли в 0,1 мл фосфатного буферного солевого раствора (PBS) через 24 ч после облучения 200 rad (⁶⁰Co). Мышей

сгруппировали в 4 группы по 10 мышей в момент времени 0 и и начали лечение через 7 дней. Все лечение вводили i.p. дважды в неделю в течение 9 недель. Все соединения вводили в количестве 200 мкг на дозу (приблизительно 10 мг/кг) кроме интерферона- α (вводимого в количестве 2 миллиона единиц на дозу). Массу тела и общее состояние здоровья проверяли дважды в неделю и конечным пунктом было выживание.

Результаты.

Результаты приведены на фиг. 48. Лечение системной множественной миеломы интерфероном- α (Intron A) увеличило среднее время выживания (MST) на 18 дней в сравнении с носителем (MST 74 против 56 соответственно.) Лечение одним анти-CD38 антителом (G005) только незначительно увеличило выживание (MST 62 дней). Ни одна из мышей в группе, получавших "нацеленное анти-CD38-аттенуированный IFN α " (G005-NC-L6-IFN α (A145G) IgG1) не показала признаков болезни в ходе всего исследования. Все (10/10) мышей оказались здоровы к моменту окончания.

Провели *in vivo* исследование на третьей модели рака на основе лимфосаркомы Беркитта клеточной линии Daudi (ATCC CCL-213, Klein, Cancer Res. 28: 1300-1310, 1968). Daudi клетки были CD38⁺.

Способы.

NOD-SCID мышам в возрасте 6-8 недель подкожно в бок вводили 1×10^7 клеток Daudi лимфомы Беркитта в 50% Matrigel через день после облучения 200 rad (^{60}Co). Когда средний размер опухоли достигал 169 мм³ (день 20), мышей группировали в 5 групп по 10 животных и начинали лечение. Все лечение вводили i.p. дважды в неделю в течение 4 недель. Все соединения вводили в количестве 200 мкг на дозу (приблизительно 10 мг/кг) кроме интерферона- α (вводимого в количестве 2 миллиона единиц на дозу). Объем опухоли измеряли дважды в неделю штангенциркулем. Конечной точкой был размер опухоли 2000 мм³.

Результаты.

Результаты приведены на фиг. 49. Лечение лимфомы Беркитта чистым анти-CD38 антителом (закрытые квадраты) не задержало в заметной степени рост опухоли у этих мышей в сравнении с носителем (закрытые кружки). IFN α лечение не вызвало заметной задержки роста опухоли в сравнении с носителем (5,5 дней) однако эта группа достигла конечной точки 2000 мм³ на 40 день. Гибридная белковая конструкция "нецелевой изотипный контроль" (Изотип-NC-L6-IFN α (A145G) IgG1; открытые обращенные треугольники) показала существенную активность в задержании роста опухоли, но эта группа достигла конечной точки 2000 мм³ на 57 день. Как наблюдалось в H929 модели (выше), эта нецелевая активность наиболее вероятно обусловлена увеличенным периодом полувывода интерферона, и соответствующим увеличенным действием цитокина на рак. Гибридная белковая конструкция «нацеленный анти-CD38-аттенуированный интерферон» (закрытые треугольники) привела к рассасыванию опухолей, так что ни у одной мыши к 30 дню опухоли не прощупывались. Однако у некоторых мышей из этой группы наблюдался повторный рост опухоли по окончании лечения. Дальнейший анализ этих данных представлен в табл. 36.

Таблица 36

Лечение	Средний размер опухоли (мм ³) ^a на 37 день	T/C ^b (%)	P значение ^c
Носитель	3034+/-340	--	--
Анти-CD38 (G005) IgG1	2443+/-196	81	0,575
G005-NC-L6-IFN α (145G) IgG1	0	0	<0,0001
Изотип-NC-L6-IFN α (145G) IgG1	15	0,5	<0,0001
IFN α	1440+/-154	47	0,007

a) среднее+/-SEM

b) отношение размера опухоли группы лечения деленный на размер опухоли у группы носителя на 37 день

c) в сравнении с носителем на 37 день

Этот ксенотрансплантатный эксперимент показал, что CD38-нацеленные аттенуированные IFN α гибридные белковые конструкции могут быть эффективны при лечении лимфом, и кроме того, множественных миелом.

Эффект различных доз гибридной белковой конструкции "анти-CD38-аттенуированный IFN α " сравнивали с не-CD38-нацеленной гибридной белковой конструкцией на миеломе. Для этого сравнения использовали модель NCI- H929 s.c. множественной миеломы.

Способы.

CB.17 SCID мышам в возрасте от 8 до 12 недель подкожно в бок вводили 1×10^7 NCI-H929 раковых клеток в 50% Matrigel. Когда средний размер опухоли достигал 120-150 мм³, мышей разделили на 9 групп по 10 животных и начали лечение (момент времени ноль). Все лечение вводили i.p. дважды в неделю в течение 5 недель. Два соединения, нацеленный анти-CD38-аттенуированный интерферон (закрытые серые символы) и нецелевой изотипный контроль-интерферон (открытые символы) сравнивали в этом исследовании в различных дозировках (см. описание для доз). Объем опухоли измеряли дважды в неделю штангенциркулем. Конечной точкой был объем опухоли 2000 мм³.

Результаты.

Результаты приведены на фиг. 50. Гибридная белковая конструкция "анти-CD38-нацеленный аттенуированный IFN α " (G005-HC-L6-IFN α (A145G) IgG1) продемонстрировала существенную эффективность при всех дозировках, даже при 0,01 мг/кг. Полное исчезновение рака наблюдалось у 10/10 мышей только при самой высокой дозировке (10 мг/кг). Для сравнения, "изотипный контроль-аттенуированный IFN" конструкция (изотип-HC-L6-IFN α (A145G) IgG1) показала существенную активность только при самой высокой дозе (10 мг/кг). 0,01 мг/кг дозы CD38 нацеленного, аттенуированного IFN показали схожую противораковую активность с гибридной белковой конструкцией "изотипный контроль - аттенуированный IFN" при в 1000 раз более высокой дозе (10 мг/кг), что подчеркивает важность CD38-нацеливания.

Следующий пример показывает, что антитела по данному изобретению также включают таковые IgG4 изотипа.

Способы.

CB.17 SCID мышам в возрасте от 8 до 12 недель подкожно в бок вводили 1×10^7 NCI-H929 раковых клеток в 50% Matrigel. Когда средний размер опухоли достигал 120-150 мм³, мышей делили на 5 групп по 10 мышей и начинали лечение (момент времени ноль). Все лечение вводили i.p. дважды в неделю в течение 5 недель. Все соединения вводили в количестве 70 мкг на дозу (приблизительно 3,5 мг/кг). Объем опухоли измеряли дважды в неделю штангенциркулем. Конечной точкой был объем опухоли 2000 мм³.

Результаты.

Результаты приведены на фиг. 51. В этом исследовании сравнивали активность нацеленной и ненацеленной гибридной белковой конструкции в двух различных изотипных форматах; IgG1 изотип (G005-HC-L6-IFN α (A145G) IgG1 (нацеленный, закрытые квадраты) и Изотип-HC-L6-IFN α (A145G) IgG1 (нецелевой, открытые квадраты)) и IgG4 изотип (G005-HC-L6-IFN α (A145G) IgG4, состоящий из SEQ ID NOS: 148 (тяжелая цепочка) и 134 (легкая цепочка) (нацеленный, закрытые ромбы) и изотип-HC-L6-IFN α (A145G) IgG4, состоящий из SEQ ID NOS: 350 (тяжелая цепочка) и 344 (легкая цепочка) (нецелевой, открытые ромбы)). Важно отметить, что мыши в этом исследовании получали меньшие дозы лекарства, чем в предыдущем исследовании, где наблюдалось 100% излечение рака. Объем опухолей неожиданно показал, что в этой модели IgG4 формат более эффективен, чем IgG1 формат. Т.к. человеческие IgG1 антитела обладают большей эффекторной функцией, чем IgG4 антитела (Hooper, Ann Clin Lab Sci.;8:201. 1978; Ward, Ther Immunol, 2:77, 1995.), ожидалось, что IgG1 формат будет, по меньшей мере, также эффективен, если не более, чем IgG4 формат. В конце исследования, 8/10 мышей в группе, получавшей CD38 нацеленный, аттенуированный IFN, IgG4 (закрытые ромбы) не имели признаков опухоли, по сравнению с только 3/10 в группе IgG1 формата (закрытые квадраты).

Следующий пример расширяет наблюдения *in vivo* эффективности конструкций "антитело-нацеленный IFN" на вторую мутировавшую форму IFN α в которой A145 мутирован в аспарагиновую кислоту (D). Кроме того, в эксперименте используется другое CD38 антитело, а именно основанное на переменных участках клона человеческого антитела X355/02; (SEQ ID NOS: 391 (VH) и 390 (VL)). Третьим отличием между этой конструкцией и другими, использовавшимися в предыдущих *in vivo* экспериментах, является то, что удален линкер (называемый "L0"), т.е. мутированный IFN α слит прямо с C концом тяжелой цепочки антитела.

Способы.

CB.17 SCID мышам в возрасте от 8 до 12 недель подкожно в бок вводили 1×10^7 NCI-H929 раковые клетки в 50% Matrigel. Когда средний размер опухоли достигал 120-150 мм³, мышей поделили на 3 группы по 10 мышей и начинали лечение (момент времени ноль). Все лечение вводили i.p. дважды в неделю в течение 5 недель. Все соединения вводили в количестве 60 мкг на дозу (приблизительно 3 мг/кг). Объем опухоли измеряли дважды в неделю штангенциркулем. Конечной точкой был объем опухоли 2000 мм³.

Результаты.

Результаты приведены на фиг. 52. Эта гибридная белковая конструкция "анти-CD38-аттенуированный IFN α " (X355/02-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4, состоящая из SEQ ID NOS: 232 (тяжелая цепочка) и 226 (легкая цепочка)) также была очень эффективна в удалении рака, демонстрируя, что способность гибридных белковых конструкций "анти-CD38-аттенуированный IFN α " эффективно лечить человеческую миелому в *in vivo* моделях не ограничивается одним переменным доменом, IFN α мутацией или линкером между антителом и IFN. Изотипная контрольная гибридная белковая конструкция

показала значительно меньшую анти-миеломную активность, что соответствует CD38-основанной нацеленности.

Следующий пример показывает, что гибридная белковая конструкция "анти-CD38 антитело-аттенуированный IFN α " более эффективна чем стандартные лекарства используемые для лечения множественной миеломы на той же трансплантантной модели, что описана выше.

Способы.

CB.17 SCID мышам в возрасте от 8 до 12 недель подкожно в бок вводили 1×10^7 NCI-H929 раковых клеток в 50% Matrigel. Когда средний размер опухоли достигал 120-150 мм³, мышей делили на группы по 10 мышей и начинали лечение (момент времени ноль). Лечение вводили с соблюдением дозировки, режимы описаны на чертежах. Объем опухоли измеряли дважды в неделю штангенциркулем. Конечной точкой был объем 2000 мм³.

Результаты.

Результаты приведены на фиг. 53. В этом исследовании активность анти-CD38 нацеленной гибридной белковой конструкции (G005-HC-L0-IFN α (A145D)IgG4, состоящей из SEQ ID NOS: 180 (тяжелая цепочка) и 134 (легкая цепочка)) сравнивали со стандартной терапией бортезомибом (велкаде), мелфаланом (алкеран), и дексаметазоном. Из группы анти-CD38 нацеленного, аттенуированного интерферона, 8/10 мышей излечились от рака к 60 дню (закрытые треугольники), тогда как все мыши в других группах достигли конечной точки к 50 дню.

Следующий пример показывает, что анти-CD38-аттенуированная IFN гибридная белковая конструкция может полностью излечить человеческую множественную миелому в мышинной модели, даже если гибридная белковая конструкция дается в виде одной дозы.

Способы.

CB.17 SCID мышам в возрасте от 8 до 12 недель подкожно в бок вводили 1×10^7 NCI-H929 раковых клеток в 50% Matrigel. Когда средний размер опухоли достигал 120-150 мм³, мышей делили на группы по 10 мышей и начинали лечение (момент времени ноль). Лечение гибридной белковой конструкцией "анти-CD38 антитело-аттенуированный интерферон" вводили по следующему режиму: одна доза в день 0 (закрытые треугольники), две дозы (в день 0 и день 3; закрытые квадраты), 4 дозы (в дни 0, 3, 8, и 11; закрытые ромбы) и 6 доз (в дни 0, 3, 8, 11, 15 и 18; закрытые черные кружки). Одна группа получили 6 доз гибридной белковой конструкции "изотипный контроль-аттенуированный интерферон" в дни 0, 3, 8, 11, 15 и 18 (открытые квадраты). Группа лечения носителем показана серыми заполненными кружками. Объем опухоли измеряли дважды в неделю штангенциркулем. Конечной точкой был объем 2000 мм³.

Результаты.

Результаты приведены на фиг. 54. Это исследование неожиданно показало, что единственная доза G005-HC-L6-IFN α (A145G) IgG4 гибридной белковой конструкции достаточна для успешного излечения рака у всех 10/10 мышей к 15 дню; более того, на 60 день ни у одной мыши из группы однократного введения рак не рецидивировал. Это подтвердилось для всех 4 режимов дозировки с нацеленным аттенуированным интерфероном. Группа изотипного контроля проверялась на 6 режимах дозировки и показала намного меньшую активность. То, что однократная доза соединения может эффективно излечить животных от миеломной раковой опухоли является беспрецедентным и невероятно неожиданным, т.к. противораковая терапия обычно вводится много раз с целью наблюдения за эффективностью.

Следующий пример демонстрирует, что даже очень большие опухоли могут бфть излечены лечением анти-CD38-аттенуированной IFN гибридной белковой конструкцией.

Способы.

Одну группы (n=9) из предыдущего эксперимента не лечили до достижения среднего объема опухоли 730 мм³. После этого эта группа получили 6 доз анти-CD38 нацеленного, аттенуированного интерферона в дни 12, 15, 19, 22, 26 и 29 (стрелки).

Результаты.

Результаты приведены на фиг. 55. 8/9 мышей в этой группе продемонстрировали полное излечение от опухоли на 30 день и ни у одной из этих мышей не наблюдалось повторного появления опухоли в течение всего эксперимента. У трех из этих мышей в начале лечения размер опухоли был >1000 мм³. Единственная мышь, умершая от миеломы, имела размер опухоли 1800 мм³ на момент начала лечения; она достигла конечной точки в 2000 мм³ на следующий день. Этот результат очень неожиданен, и никогда ранее в отношении какого-либо соединения не сообщалось об излечении миеломной опухоли такого размера на любой животной модели.

В *in vitro* экспериментах выше было показано (табл. 27) что G005-HC-L6-IFN α (A145G) IgG4 гибридная белковая конструкция обладает приблизительно в 25000 раз меньшей эффективностью, чем свободный, дикого типа IFN α 2b, в условиях, когда антитело не нацеливает аттенуированный IFN α на проверяемые клетки (нецелевой анализ). Следующие эксперименты призваны определить, показывает ли гибридная белковая конструкция также значительное аттенуирование IFN активности в *ex vivo* анализе IFN активности, релевантном токсичности IFN α . Этот эффект IFN α на гематопоез может быть измерен *ex vivo* путем определения эффекта IFN α на количество колониеобразующих единиц, происходящих от

первичных человеческих моноядерных клеток костного мозга. IFN α сравнивали с гибридными белковыми конструкциями "антитело-аттенуированный IFN α " в плане их воздействия на образование колоний.

Способы.

Замороженные моноядерные клетки нормального человеческого костного мозга (MNC) (AllCells, Inc., Emeryville, CA) от 3 доноров разморозили в RPMI-1640 среде +10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (полная среда) и два раза промыли этой же средой. После промывания клетки хранили в этой среде с концентрацией $1,75 \times 10^6$ клеток/мл. Клеточную суспензию разбавили MethoCult H4434 Classic средой (Stem Cell Technologies, Cat# 04434) до финальной концентрации $0,7 \times 10^5$ клеток/мл. Клетки после этого тщательно перемешали и 3 мл этой смеси распределили по пробиркам.

Intron A (Schering Corp. Merck, NJ) и гибридные белковые конструкции (G005-HC-L0-IFN α (145D) IgG4 и Изотип-HC-L0-IFN α (145D) IgG4) разбавили с получением десятикратных серийных разбавлений в полной среде и 150 мкл каждого разбавления добавили к пробиркам, содержащим 3 мл клеток костного мозга в Methocult H4434 среде. Смеси разместили по 1,1 мл на 35мм чашки с культурой (Stem Cell Technologies, cat#27115). После этого инкубировали во влажном инкубаторе при 37°C с 5% CO₂ в течение двух недель. Колонии подсчитали под микроскопом с помощью размеченной чашки для подсчета (Stem Cell Technologies, Cat#27500) и записали количество колоний на чашку. Процентное количество восстановленных колоний для определенной проверяемой субстанции рассчитывали как отношение количества колоний на чашку к количеству колоний на чашку без добавления проверяемой субстанции. В целом этим способом проверили три человеческих MNC костного мозга.

Результаты.

Результаты приведены на фиг. 56. Данные показывают, что обе, нацеленная (анти-CD38, G005) и ненацеленная (изотип; 2D12) аттенуированные интерфероновые гибридные белковые конструкции обладают сходной активностью, что означает что CD38 экспрессия наблюдаемая на нормальных клетках костного мозга скорее всего не происходит на колониеобразующих клетках т.к. очень незначительное ингибирование образования колоний наблюдалось с нацеленным лечением. Обе гибридные белковые конструкции показали приблизительно в 10000 раз меньшую активность при ингибировании образования колоний, чем дикий тип, свободный IFN α , тем самым подтверждая, что A145D мутация аттенуирует IFN активность гибридных белковых конструкций "антител-IFN α " и позволяя предположить, что такие гибридные белковые конструкции "аттенуированный IFN-антитело" будут иметь лучший профиль безопасности, чем сам IFN α .

Другой активностью IFN α , которую можно измерить *ex vivo*, является стимуляция секреции цитокина и хемокина. Нормальные человеческие PBMC стимулировали различными концентрациями IFN α в сравнении с гибридной белковой конструкцией "антитело-аттенуированный IFN α " изотип-HC-L6-IFN α (A145G) IgG1 (основанной на 2D12 антителе), и измеряли производство цитокина.

Способы.

Нормальные человеческие мононуклеары периферической крови (PBMC) от 4 нормальных доноров промыли Xvivo-15 средой (Lonza, Cat# 04-418Q) и повторно суспендировали в этой же среде с плотностью клеток 1×10^6 клетки/мл. После этого клетки инкубировали с человеческим IgG при 4 мг/мл и инкубировали при 37°C в течение 30 мин для блокировки любого неспецифического IgG связывания. После этого 250 мкл аликвоты клеток без промывания добавили в лунки 24-луночных планшетов. К этим лункам после этого добавили 250 мкл свободного IFN α или гибридной белковой конструкции "IgG-аттенуированный IFN α " (изотип-HC-L6-IFN α (A145G) IgG1; изотипное антитело 2D12) в различных концентрациях. После этого планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. На следующий день планшеты отцентрифугировали и 200 мкл надосадочной жидкости собрали из каждой лунки. Надосадочные жидкости хранили замороженными до исследования с помощью Luminex цитокинового анализа.

Luminex анализ. С помощью Premix 42-plex from Millipore (Cat#MPXHCYTO60KPMX42) оказалось возможным измерить уровень человеческих цитокинов, произведенных PBMC, стимулированными проверяемыми субстанциями. Надосадочные жидкости культур инкубировали с предварительно смешанными полистирольными микрогранулами, покрытыми анти-цитокиновыми антителами в соответствии с инструкциями производителя. После промывания биотинилированную смесь антител добавили к анализируемому веществу, связанному с гранулами. Потом реакционную смесь инкубировали с стрептавидин PE и измеряли интенсивность флуоресценции PE с помощью анализатора Luminex. Результаты интерполировали с помощью стандартной кривой, построенной на основании контроля, предоставленного в наборе.

Результаты.

Результаты приведены на фиг. 57. Производство четырех цитокинов (IP-10, MCP-1, MCP-3 и IL-1 α) было существенно увеличено в ответ на обработку IFN α . Гибридная белковая конструкция "антитело-аттенуированный IFN α " (изотип-HC-L6-IFN α (A145G) IgG1) продемонстрировала 1000-5000-кратно пониженную эффективность в сравнении со стимуляцией диким типом IFN α . Это подтверждает, что мутация приводит к существенному уменьшению биологической активности. Панель (а) показывает дозо-

зависимые кривые для IP-10 (приблизительно 1000-кратное аттенуирование) и MCP-1 (приблизительно 5000- кратное аттенуирование); панель (b) показывает дозо-зависимые кривые для MCP-3 (приблизительно 2500- кратное аттенуирование) и IL1 α (приблизительно 1300-кратное аттенуирование).

Таблицы последовательностей.

Таблица 37. Последовательности одинарных полипептидных цепочек

SEQ ID

NO:	Вид	Длина	Единица	Ген	Подтип	Разновидность
1	человеческий	166	aa	IFN	α 1b	неизменный
2	человеческий	165	aa	IFN	α 2a	неизменный
3	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	неизменный
4	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	L15A
5	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	A19W
6	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R22A
7	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R23A
8	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	S25A
9	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	L26A
10	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	F27A
11	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	L30A
12	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	L30V
13	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	K31A
14	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	D32A
15	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R33K
16	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R33A
17	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R33Q
18	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	H34A
19	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	Q40A

040832

20	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	D114R
21	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	L117A
22	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R120A
23	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R120E
24	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R125A
25	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R125E
26	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	K131A
27	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	E132A
28	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	K133A
29	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	K134A
30	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R144A
31	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R144D
32	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R144E
33	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R144G
34	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R144H
35	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R144I
36	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R144K
37	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R144L
38	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R144N
39	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R144Q
40	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R144S
41	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R144T
42	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R144V

040832

43	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R144Y
44	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	A145D
45	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	A145E
46	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	A145G
47	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	A145H
48	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	A145I
49	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	A145K
50	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	A145L
51	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	A145M
52	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	A145N
53	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	A145Q
54	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	A145R
55	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	A145S
56	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	A145T
57	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	A145V
58	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	A145Y
59	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	M148A
60	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R149A
61	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	S152A
62	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	L153A
63	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	N156A
64	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	L30A+YNS
65	человеческий	165	aa	IFN	α 2b	R33A+YNS

040832

66	человеческий	165	aa	IFN	$\alpha 2b$	M148A+YNS
67	человеческий	165	aa	IFN	$\alpha 2b$	L153A+YNS
68	человеческий	165	aa	IFN	$\alpha 2b$	R144A+YNS
69	человеческий	165	aa	IFN	$\alpha 2b$	N65A,L80A,Y85A,Y89A
70	человеческий	165	aa	IFN	$\alpha 2b$	N65A,L80A,Y85A,Y89A, D114A
71	человеческий	165	aa	IFN	$\alpha 2b$	N65A,L80A,Y85A,Y89A, L117A
72	человеческий	165	aa	IFN	$\alpha 2b$	N65A,L80A,Y85A,Y89A, R120A
73	человеческий	165	aa	IFN	$\alpha 2b$	Y85A,Y89A,R120A
74	человеческий	165	aa	IFN	$\alpha 2b$	D114A,R120A
75	человеческий	165	aa	IFN	$\alpha 2b$	L117A,R120A
76	человеческий	165	aa	IFN	$\alpha 2b$	L117A,R120A,K121A
77	человеческий	165	aa	IFN	$\alpha 2b$	R120A,K121A
78	человеческий	165	aa	IFN	$\alpha 2b$	R120E,K121E
79	человеческий	160	aa	IFN	$\alpha 2b$	Δ [L161-E165]
80	человеческий	166	aa	IFN	$\alpha 4b$	неизменный
81	человеческий	166	aa	IFN	$\alpha 5$	неизменный
82	человеческий	166	aa	IFN	$\alpha 6$	неизменный
83	человеческий	166	aa	IFN	$\alpha 7$	неизменный
84	человеческий	166	aa	IFN	$\alpha 8$	неизменный
85	человеческий	166	aa	IFN	$\alpha 10$	неизменный
86	человеческий	166	aa	IFN	$\alpha 1a/13$	неизменный
87	человеческий	166	aa	IFN	$\alpha 14$	неизменный

040832

88	человеческий	166	aa	IFN	$\alpha 16$	неизменный
89	человеческий	166	aa	IFN	$\alpha 17$	неизменный
90	человеческий	166	aa	IFN	$\alpha 21$	неизменный
91	человеческий	166	aa	IFN	$\beta 1(a)$	неизменный
92	человеческий	166	aa	IFN	$\beta 1(a)$	R27A
93	человеческий	166	aa	IFN	$\beta 1(a)$	R35T
94	человеческий	166	aa	IFN	$\beta 1(a)$	E42K
95	человеческий	166	aa	IFN	$\beta 1(a)$	D54N
96	человеческий	166	aa	IFN	$\beta 1(a)$	M62I
97	человеческий	166	aa	IFN	$\beta 1(a)$	G78S
98	человеческий	166	aa	IFN	$\beta 1(a)$	K123A
99	человеческий	166	aa	IFN	$\beta 1(a)$	C141Y
100	человеческий	166	aa	IFN	$\beta 1(a)$	A142T
101	человеческий	166	aa	IFN	$\beta 1(a)$	E149K
102	человеческий	166	aa	IFN	$\beta 1(a)$	R152H
103	человеческий	166	aa	IFN	$\beta 1(b)$	C17S
104	человеческий	166	aa	IFN	$\beta 1(b)$	C17S,R35A
105	человеческий	166	aa	IFN	$\beta 1(b)$	C17S,R147A
106	человеческий	143	aa	IFN	γ	неизменный
107	человеческий	143	aa	IFN	γ	S20I
108	человеческий	143	aa	IFN	γ	S20C
109	человеческий	143	aa	IFN	γ	D21K
110	человеческий	143	aa	IFN	γ	V22D

040832

111	человеческий	143	aa	IFN	γ	A23Q
112	человеческий	143	aa	IFN	γ	A23V
113	человеческий	143	aa	IFN	γ	D24A
114	человеческий	141	aa	IFN	γ	Δ[A23,D24]
115	человеческий	141	aa	IFN	γ	Δ[N25,G26]
116	человеческий	122	aa	IFN	γ	Δ[A123-Q143]
117	человеческий	129	aa	IFN	γ	Δ[K130-Q143]
118	человеческий	132	aa	IFN	γ	Δ[K130,R131,L135-Q143]
119	человеческий	129	aa	IL-4		неизменный
120	человеческий	129	aa	IL-4		E9K
121	человеческий	129	aa	IL-4		R88D
122	человеческий	129	aa	IL-4		R88Q
123	человеческий	184	aa	IL-6		неизменный
124	человеческий	184	aa	IL-6		F74E
125	человеческий	184	aa	IL-6		F78E
126	человеческий	184	aa	IL-6		R179E
127	человеческий	310	aa	CD38	человеческий	tagged, ECD
128	яванская макака	310	aa	CD38	яванская макака	tagged, ECD
129	человеческий	774	нуклеотид (кодирующая цепь)	CD38	человеческий	ECD, для генетической иммунизации (ДНК)
130	человеческий	258	aa	CD38	человеческий	ECD, для генетической иммунизации (translated)
131	человеческий	300	aa	CD38	человеческий	неизменный
132	синтетически й	6	aa	линке р		6-мер
133	синтетически й	16	aa	линке р		16-мер

Таблица 38. SEQ ID NO, относящиеся к белкам, содержащим 2 полипептидных цепочки

SEQ ID NO:	Название белка	Цепочка	Вид	Длина	Единица
134	G005 IgG1	LC aa	человеческий	214	aa
135		HC aa	человеческий	452	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
137		HC ДНК	человеческий	1356	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (R144A) IgG1	LC aa	человеческий	214	aa
138		HC aa	синтетический	617	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
139		HC ДНК	синтетический	1851	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L6-IFN α (R144A) IgG1	LC aa	человеческий	214	aa
140		HC aa	синтетический	623	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
141		HC ДНК	синтетический	1869	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (A145G) IgG1	LC aa	человеческий	214	aa
142		HC aa	синтетический	617	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
143		HC ДНК	синтетический	1851	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L6-IFN α (A145G) IgG1	LC aa	человеческий	214	aa
144		HC aa	синтетический	623	aa

136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
145		HC ДНК	синтетически й	1869	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L6-IFN α (R144A) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
146		HC aa	синтетически й	620	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
147		HC ДНК	синтетически й	1860	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L6-IFN α (A145G) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
148		HC aa	синтетически й	620	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
149		HC ДНК	синтетически й	1860	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
150		HC aa	синтетически й	614	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
151		HC ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (R144A) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
152		HC aa	синтетически й	614	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
153		HC ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (R144D)	LC aa	человеческий	214	aa

154	IgG4	НС аа	синтетически й	614	аа
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
155		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (R144E) IgG4	LC аа	человеческий	214	аа
156		НС аа	синтетически й	614	аа
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
157	G005-HC-L0-IFN α (R144G) IgG4	НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134		LC аа	человеческий	214	аа
158		НС аа	синтетически й	614	аа
136	G005-HC-L0-IFN α (R144H) IgG4	LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
159		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134		LC аа	человеческий	214	аа
160	G005-HC-L0-IFN α (R144I) IgG4	НС аа	синтетически й	614	аа
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
161		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (R144I) IgG4	LC аа	человеческий	214	аа
162		НС аа	синтетически й	614	аа
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
163	G005-HC-L0-IFN α (R144I) IgG4	НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)

134	G005-HC-L0-IFN α (R144K) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
164		HC aa	синтетический	614	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
165		HC ДНК	синтетический	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (R144L) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
166		HC aa	синтетический	614	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
167		HC ДНК	синтетический	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (R144N) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
168		HC aa	синтетический	614	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
169		HC ДНК	синтетический	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (R144Q) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
170		HC aa	синтетический	614	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
171		HC ДНК	синтетический	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (R144S) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
172		HC aa	синтетический	614	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)

173		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134		LC aa	человеческий	214	aa
174		НС aa	синтетически й	614	aa
136	G005-HC-L0-IFN α (R144T) IgG4	LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
175		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134		LC aa	человеческий	214	aa
176		НС aa	синтетически й	614	aa
136	G005-HC-L0-IFN α (R144V) IgG4	LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
177		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134		LC aa	человеческий	214	aa
178		НС aa	синтетически й	614	aa
136	G005-HC-L0-IFN α (R144Y) IgG4	LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
179		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
180		НС aa	синтетически й	614	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
181		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (A145E) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
182		НС aa	синтетически й	614	aa

136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
183		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (A145G) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
184		НС aa	синтетически й	614	aa
136	G005-HC-L0-IFN α (A145G) IgG4	LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
185		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (A145H) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
186		НС aa	синтетически й	614	aa
136	G005-HC-L0-IFN α (A145H) IgG4	LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
187		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (A145I) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
188		НС aa	синтетически й	614	aa
136	G005-HC-L0-IFN α (A145I) IgG4	LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
189		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (A145K) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
190		НС aa	синтетически й	614	aa
136	G005-HC-L0-IFN α (A145K) IgG4	LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
191		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (A145L)	LC aa	человеческий	214	aa

192	IgG4	НС аа	синтетически й	614	аа
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
193		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-НС-L0-IFN α (A145N) IgG4	LC аа	человеческий	214	аа
194		НС аа	синтетически й	614	аа
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
195		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-НС-L0-IFN α (A145Q) IgG4	LC аа	человеческий	214	аа
196		НС аа	синтетически й	614	аа
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
197		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-НС-L0-IFN α (A145R) IgG4	LC аа	человеческий	214	аа
198		НС аа	синтетически й	614	аа
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
199		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-НС-L0-IFN α (A145S) IgG4	LC аа	человеческий	214	аа
200		НС аа	синтетически й	614	аа
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
201		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)

134	G005-HC-L0-IFN α (A145T) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
202		HC aa	синтетический	614	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
203		HC ДНК	синтетический	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (A145V) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
204		HC aa	синтетический	614	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
205		HC ДНК	синтетический	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN α (A145Y) IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
206		HC aa	синтетический	614	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
207		HC ДНК	синтетический	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
208	G005-LC-L6-IFN α (A145G) IgG1	LC aa	синтетический	385	aa
135		HC aa	человеческий	452	aa
209		LC ДНК	синтетический	1155	нуклеотид (кодирующая цепь)
137		HC ДНК	человеческий	1356	нуклеотид (кодирующая цепь)
210	G005-LC-L0-IFN α (A145G) IgG1	LC aa	синтетический	379	aa
135		HC aa	человеческий	452	aa
211		LC ДНК	синтетический	1137	нуклеотид (кодирующая цепь)

137		НС ДНК	человеческий	1356	нуклеотид (кодирующая цепь)
134	G005-HC-L0-IFN β IgG4	LC aa	человеческий	214	aa
212		НС aa	синтетически й	615	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
213		НС ДНК	синтетически й	1845	нуклеотид (кодирующая цепь)
134		LC aa	человеческий	214	aa
214	G005-HC-L0-IFN β (R35A) IgG4	НС aa	синтетически й	615	aa
136		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
215		НС ДНК	синтетически й	1845	нуклеотид (кодирующая цепь)
134		LC aa	человеческий	214	aa
216		НС aa	синтетически й	615	aa
136	G005-HC-L0-IFN β (R147A) IgG4	LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
217		НС ДНК	синтетически й	1845	нуклеотид (кодирующая цепь)
218		LC aa	человеческий	212	aa
219		НС aa	человеческий	452	aa
220		LC ДНК	человеческий	636	нуклеотид (кодирующая цепь)
221	MORAB03080 IgG1	НС ДНК	человеческий	1356	нуклеотид (кодирующая цепь)
222		LC aa	синтетически й	214	aa
223		НС aa	синтетически й	450	aa

224		LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
225		HC ДНК	синтетически й	1350	нуклеотид (кодирующая цепь)
226	X355/02 IgG1	LC aa	человеческий	222	aa
227		HC aa	человеческий	451	aa
228		LC ДНК	человеческий	666	нуклеотид (кодирующая цепь)
229		HC ДНК	человеческий	1353	нуклеотид (кодирующая цепь)
226	X355/02-HC-L0-IFN α (R144A) IgG4	LC aa	человеческий	222	aa
230		HC aa	синтетически й	613	aa
228		LC ДНК	человеческий	666	нуклеотид (кодирующая цепь)
231		HC ДНК	синтетически й	1839	нуклеотид (кодирующая цепь)
226	X355/02-HC-L0- IFN α (A145D) IgG4	LC aa	человеческий	222	aa
232		HC aa	синтетически й	613	aa
228		LC ДНК	человеческий	666	нуклеотид (кодирующая цепь)
233		HC ДНК	синтетически й	1839	нуклеотид (кодирующая цепь)
234	X355/07 IgG	LC aa	человеческий	215	aa
235		HC aa	человеческий	448	aa
236		LC ДНК	человеческий	645	нуклеотид (кодирующая цепь)
237		HC ДНК	человеческий	1344	нуклеотид (кодирующая цепь)
234	X355/07-HC-L0-IFN α (R144A) IgG4	LC aa	человеческий	215	aa
238		HC aa	синтетически й	610	aa

236		LC ДНК	человеческий	645	нуклеотид (кодирующая цепь)
239		HC ДНК	синтетический	1830	нуклеотид (кодирующая цепь)
234	X355/07-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	LC aa	человеческий	215	aa
240		HC aa	синтетический	610	aa
236		LC ДНК	человеческий	645	нуклеотид (кодирующая цепь)
241		HC ДНК	синтетический	1830	нуклеотид (кодирующая цепь)
242	X910/12 IgG1	LC aa	человеческий	222	aa
243		HC aa	человеческий	452	aa
244		LC ДНК	человеческий	666	нуклеотид (кодирующая цепь)
245		HC ДНК	человеческий	1356	нуклеотид (кодирующая цепь)
242	X910/12-HC-L0-IFN α (R144A) IgG4	LC aa	человеческий	222	aa
246		HC aa	синтетический	614	aa
244		LC ДНК	человеческий	666	нуклеотид (кодирующая цепь)
247		HC ДНК	синтетический	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
242	X910/12-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	LC aa	человеческий	222	aa
248		HC aa	синтетический	614	aa
244		LC ДНК	человеческий	666	нуклеотид (кодирующая цепь)
249		HC ДНК	синтетический	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
250	X913/15 IgG1	LC aa	человеческий	222	aa
251		HC aa	человеческий	450	aa

252		LC ДНК	человеческий	666	нуклеотид (кодирующая цепь)
253		HC ДНК	человеческий	1350	нуклеотид (кодирующая цепь)
250	X913/15-HC-L0-IFN α (R144A) IgG4	LC aa	человеческий	222	aa
254		HC aa	синтетически й	612	aa
252		LC ДНК	человеческий	666	нуклеотид (кодирующая цепь)
255		HC ДНК	синтетически й	1836	нуклеотид (кодирующая цепь)
250	X913/15-HC-L0- IFN α (A145D) IgG4	LC aa	человеческий	222	aa
256		HC aa	синтетически й	612	aa
252		LC ДНК	человеческий	666	нуклеотид (кодирующая цепь)
257		HC ДНК	синтетически й	1836	нуклеотид (кодирующая цепь)
258	R5D1 IgG1	LC aa	синтетически й	214	aa
259		HC aa	синтетически й	450	aa
260		LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
261		HC ДНК	синтетически й	1350	нуклеотид (кодирующая цепь)
258	R5D1-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	LC aa	синтетически й	214	aa
262		HC aa	синтетически й	612	aa
260		LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
263		HC ДНК	синтетически й	1836	нуклеотид (кодирующая цепь)

264	R5E8 IgG1	LC aa	синтетически й	219	aa
265		HC aa	синтетически й	453	aa
266		LC ДНК	синтетически й	657	нуклеотид (кодирующая цепь)
267		HC ДНК	синтетически й	1359	нуклеотид (кодирующая цепь)
264	R5E8-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	LC aa	синтетически й	219	aa
268		HC aa	синтетически й	615	aa
266		LC ДНК	синтетически й	657	нуклеотид (кодирующая цепь)
269		HC ДНК	синтетически й	1845	нуклеотид (кодирующая цепь)
270	R10A2 IgG1	LC aa	синтетически й	214	aa
271		HC aa	синтетически й	450	aa
272		LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
273		HC ДНК	синтетически й	1350	нуклеотид (кодирующая цепь)
270	R10A2-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	LC aa	синтетически й	214	aa
274		HC aa	синтетически й	612	aa
272		LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
275		HC ДНК	синтетически й	1836	нуклеотид (кодирующая цепь)
276	Ритуксимаб	LC aa	синтетически й	213	aa
277		HC aa	синтетически й	451	aa

278		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
279		НС ДНК	синтетически й	1353	нуклеотид (кодирующая цепь)
276	Ритуксимаб-НС-L6-IFN α IgG1	LC aa	синтетически й	213	aa
280		НС aa	синтетически й	622	aa
278		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
281		НС ДНК	синтетически й	1866	нуклеотид (кодирующая цепь)
276	Ритуксимаб-НС-L6- IFN α (R144A) IgG1	LC aa	синтетически й	213	aa
282		НС aa	синтетически й	622	aa
278		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
283		НС ДНК	синтетически й	1866	нуклеотид (кодирующая цепь)
276	Ритуксимаб-НС-L6- IFN α (A145G) IgG1	LC aa	синтетически й	213	aa
284		НС aa	синтетически й	622	aa
278		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
285		НС ДНК	синтетически й	1866	нуклеотид (кодирующая цепь)
276	Ритуксимаб-НС-L6- IFN α (R33A+YNS) IgG1	LC aa	синтетически й	213	aa
286		НС aa	синтетически й	622	aa
278		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)

287		НС ДНК	синтетически й	1866	нуклеотид (кодирующая цепь)
276	Ритуксимаб-НС-L6- IFN α (R144A+YNS) IgG1	LC aa	синтетически й	213	aa
288		НС aa	синтетически й	622	aa
278		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
289		НС ДНК	синтетически й	1866	нуклеотид (кодирующая цепь)
290		LC aa	синтетически й	213	aa
291	Паливизумаб	НС aa	синтетически й	450	aa
292		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
293		НС ДНК	синтетически й	1350	нуклеотид (кодирующая цепь)
290		LC aa	синтетически й	213	aa
294	Паливизумаб-НС-L6-IFN α IgG1	НС aa	синтетически й	621	aa
292		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
295		НС ДНК	синтетически й	1863	нуклеотид (кодирующая цепь)
290		LC aa	синтетически й	213	aa
296	Паливизумаб-НС-L6-IFN α Fab	НС aa	синтетически й	394	aa
292		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
297		НС ДНК	синтетически й	1182	нуклеотид (кодирующая цепь)

290	Паливизумаб-НС-L6-IFN α (A145D) Fab	LC aa	синтетически й	213	aa
298		НС aa	синтетически й	394	aa
292		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
299		НС ДНК	синтетически й	1182	нуклеотид (кодирующая цепь)
300	J110 IgG1	LC aa	синтетически й	214	aa
301		НС aa	синтетически й	449	aa
302		LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
303		НС ДНК	синтетически й	1347	нуклеотид (кодирующая цепь)
300	J110-НС-L6-IL-4 IgG1	LC aa	синтетически й	214	aa
304		НС aa	синтетически й	584	aa
302		LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
305		НС ДНК	синтетически й	1752	нуклеотид (кодирующая цепь)
300	J110-НС-L6-IL-4(R88Q) IgG1	LC aa	синтетически й	214	aa
306		НС aa	синтетически й	584	aa
302		LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
307		НС ДНК	синтетически й	1752	нуклеотид (кодирующая цепь)
300	J110-НС-L16-IL-6 IgG1	LC aa	синтетически й	214	aa
308		НС aa	синтетически й	649	aa

302		LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
309		HC ДНК	синтетически й	1947	нуклеотид (кодирующая цепь)
300	J110-HC-L16-IL-6(R179E)	LC aa	синтетически й	214	aa
310		HC aa	синтетически й	649	aa
302		LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
311		HC ДНК	синтетически й	1947	нуклеотид (кодирующая цепь)
312	HB95 IgG1	LC aa	синтетически й	215	aa
313		HC aa	синтетически й	450	aa
314		LC ДНК	синтетически й	645	нуклеотид (кодирующая цепь)
315		HC ДНК	синтетически й	1350	нуклеотид (кодирующая цепь)
312	HB95-HC-L0-IFN α (A145D)	LC aa	синтетически й	215	aa
316		HC aa	синтетически й	612	aa
314		LC ДНК	синтетически й	645	нуклеотид (кодирующая цепь)
317		HC ДНК	синтетически й	1836	нуклеотид (кодирующая цепь)
312	HB95-HC-L6-IFN α Fab	LC aa	синтетически й	215	aa
318		HC aa	синтетически й	394	aa
314		LC ДНК	синтетически й	645	нуклеотид (кодирующая цепь)

319		НС ДНК	синтетически й	1182	нуклеотид (кодирующая цепь)
312	HB95-НС-L6-IFN α (A145D) Fab	LC aa	синтетически й	215	aa
320		НС aa	синтетически й	394	aa
314		LC ДНК	синтетически й	645	нуклеотид (кодирующая цепь)
321		НС ДНК	синтетически й	1182	нуклеотид (кодирующая цепь)
312		LC aa	синтетически й	215	aa
322	HB95-НС-L16-IL-6 IgG1	НС aa	синтетически й	650	aa
314		LC ДНК	синтетически й	645	нуклеотид (кодирующая цепь)
323		НС ДНК	синтетически й	1950	нуклеотид (кодирующая цепь)
312		LC aa	синтетически й	215	aa
324	HB95-НС-L16-IL-6(R179E) IgG1	НС aa	синтетически й	650	aa
314		LC ДНК	синтетически й	645	нуклеотид (кодирующая цепь)
325		НС ДНК	синтетически й	1950	нуклеотид (кодирующая цепь)
326		LC aa	синтетически й	214	aa
327	nBT062 IgG1	НС aa	синтетически й	452	aa
328		LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
329		НС ДНК	синтетически й	1356	нуклеотид (кодирующая цепь)

326	nBT062-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	LC aa	синтетически й	214	aa
330		HC aa	синтетически й	614	aa
328		LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
331		HC ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
332	C21 IgG1	LC aa	синтетически й	214	aa
333		HC aa	синтетически й	448	aa
334		LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
335		HC ДНК	синтетически й	1344	нуклеотид (кодирующая цепь)
332	C21-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	LC aa	синтетически й	214	aa
336		HC aa	синтетически й	610	aa
334		LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
337		HC ДНК	синтетически й	1830	нуклеотид (кодирующая цепь)
338	7.1 IgG1	LC aa	синтетически й	214	aa
339		HC aa	синтетически й	449	aa
340		LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
341		HC ДНК	синтетически й	1347	нуклеотид (кодирующая цепь)
338	7.1-HC-L0-IFN α (A145D)	LC aa	синтетически й	214	aa
342		HC aa	синтетически й	611	aa

340	IgG4	LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
343		HC ДНК	синтетически й	1833	нуклеотид (кодирующая цепь)
344	2D12 IgG1	LC aa	синтетически й	213	aa
345		HC aa	синтетически й	452	aa
346		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
347		HC ДНК	синтетически й	1356	нуклеотид (кодирующая цепь)
344	2D12-HC-L6-IFN α (A145G) IgG1	LC aa	синтетически й	213	aa
348		HC aa	синтетически й	623	aa
346		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
349		HC ДНК	синтетически й	1869	нуклеотид (кодирующая цепь)
344	2D12-HC-L6-IFN α (A145G) IgG4	LC aa	синтетически й	213	aa
350		HC aa	синтетически й	620	aa
346		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
351		HC ДНК	синтетически й	1860	нуклеотид (кодирующая цепь)
344	2D12-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4	LC aa	синтетически й	213	aa
352		HC aa	синтетически й	614	aa
346		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)

353		НС ДНК	синтетически й	1842	нуклеотид (кодирующая цепь)
344	2D12-НС-L6-IFN α Fab	LC aa	синтетически й	213	aa
354		НС aa	синтетически й	396	aa
346		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
355		НС ДНК	синтетически й	1188	нуклеотид (кодирующая цепь)
344	2D12-НС-L6-IFN α (A145D) Fab	LC aa	синтетически й	213	aa
356		НС aa	синтетически й	396	aa
346		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
357		НС ДНК	синтетически й	1188	нуклеотид (кодирующая цепь)
344	2D12-НС-L6-IL-4(R88Q) IgG1	LC aa	синтетически й	213	aa
358		НС aa	синтетически й	587	aa
346		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
359		НС ДНК	синтетически й	1761	нуклеотид (кодирующая цепь)
344	2D12-НС-L16-IL-6 IgG1	LC aa	синтетически й	213	aa
360		НС aa	синтетически й	652	aa
346		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
361		НС ДНК	синтетически й	1956	нуклеотид (кодирующая цепь)

344	2D12-HC-L16-IL-6(R179E) IgG1	LC aa	синтетически й	213	aa
362		HC aa	синтетически й	652	aa
346		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
363		HC ДНК	синтетически й	1956	нуклеотид (кодирующая цепь)
364	X355/01 IgG1	LC aa	человеческий	214	aa
365		HC aa	человеческий	455	aa
366		LC ДНК	человеческий	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
367		HC ДНК	человеческий	1365	нуклеотид (кодирующая цепь)
368	X355/04 IgG1	LC aa	человеческий	219	aa
369		HC aa	человеческий	453	aa
370		LC ДНК	человеческий	657	нуклеотид (кодирующая цепь)
371		HC ДНК	человеческий	1359	нуклеотид (кодирующая цепь)
372	R10B10 IgG1	LC aa	синтетически й	220	aa
373		HC aa	синтетически й	449	aa
374	R7H11 IgG1	LC aa	синтетически й	220	aa
375		HC aa	синтетически й	449	aa
376	R7F11 IgG1	LC aa	синтетически й	214	aa
377		HC aa	синтетически й	452	aa
276	Ритуксимаб-HC-L7- IFN γ (Δ [A23,D24]) IgG1	LC aa	синтетически й	213	aa
378		HC aa	синтетически й	599	aa

278		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
379		HC ДНК	синтетически й	1797	нуклеотид (кодирующая цепь)
226	X355/02-HC-L7-IFN γ (S20I) IgG1	LC aa	человеческий	222	aa
380		HC aa	синтетически й	601	aa
228		LC ДНК	человеческий	666	нуклеотид (кодирующая цепь)
381		HC ДНК	синтетически й	1803	нуклеотид (кодирующая цепь)
270		LC aa	синтетически й	214	aa
382	R10A2-HC-L7-IFN γ (D21K) IgG1	HC aa	синтетически й	600	aa
272		LC ДНК	синтетически й	642	нуклеотид (кодирующая цепь)
383		HC ДНК	синтетически й	1800	нуклеотид (кодирующая цепь)
276		LC aa	синтетически й	213	aa
436	Ритуксимаб-HC-L6- IFN α (R33A) IgG1	HC aa	синтетически й	622	aa
278		LC ДНК	синтетически й	639	нуклеотид (кодирующая цепь)
437		HC ДНК	синтетически й	1866	нуклеотид (кодирующая цепь)

Таблица 39. Вариабельные домены

SEQ ID NO:	Клон	Антиген	Цепочка	Вид	Длина (aa)
384	G005	CD38	Vκ	человеческий	107
385	G005	CD38	VH	человеческий	122
386	MORAB03080	CD38	Vλ	человеческий	106
387	MORAB03080	CD38	VH	человеческий	122
388	hu38SB19 (SAR650984)	CD38	Vκ	синтетический	107
389	hu38SB19 (SAR650984)	CD38	VH	синтетический	120
390	X355/02	CD38	Vλ	человеческий	116
391	X355/02	CD38	VH	человеческий	121
392	X355/07	CD38	Vκ	человеческий	108
393	X355/07	CD38	VH	человеческий	118
394	X910/12	CD38	Vλ	человеческий	116
395	X910/12	CD38	VH	человеческий	122
396	X913/15	CD38	Vλ	человеческий	116
397	X913/15	CD38	VH	человеческий	120
398	R5D1	CD38	Vκ	крысиный	107
399	R5D1	CD38	VH	крысиный	120
400	R5E8	CD38	Vκ	крысиный	112
401	R5E8	CD38	VH	крысиный	123
402	R10A2	CD38	Vκ	крысиный	107
403	R10A2	CD38	VH	крысиный	120
404	Ритуксимаб	CD20	Vκ	мышинный	106

405	Ритуксимаб	CD20	VH	мышинный	121
406	Паливизумаб	респираторно-синцитиальный вирус (RSV)	Vκ	синтетический	106
407	Паливизумаб	RSV	VH	синтетический	120
408	J110	PD-1	Vκ	мышинный	107
409	J110	PD-1	VH	мышинный	119
410	HB95	HLA	Vκ	мышинный	108
411	HB95	HLA	VH	мышинный	120
412	nBT062	CD138	Vκ	мышинный	107
413	nBT062	CD138	VH	мышинный	122
414	C21	Высокомолекулярная меланома-ассоциированный антиген (HMW-MAA)	Vλ	синтетический	108
415	C21	HMW-MAA	VH	синтетический	118
416	7.1	HMW-MAA	Vκ	мышинный	107
417	7.1	HMW-MAA	VH	мышинный	119
418	2D12	вирус жёлтой лихорадки (YFV)	Vκ	мышинный	106
419	2D12	YFV	VH	мышинный	122
420	X355/01	CD38	Vκ	человеческий	107
421	X355/01	CD38	VH	человеческий	125
422	X355/04	CD38	Vκ	человеческий	112
423	X355/04	CD38	VH	человеческий	123
424	R10B10	CD38	Vλ	крысиный	114
425	R10B10	CD38	VH	крысиный	119
426	R7H11	CD38	Vλ	крысиный	114
427	R7H11	CD38	VH	крысиный	119
428	R7F11	CD38	Vκ	крысиный	107
429	R7F11	CD38	VH	крысиный	122

Таблица 40. Другие последовательности с одной полипептидной цепочкой

SEQ ID NO:	Вид	Длина	Ген
430	человеческий	297	CD20
431	человеческий	288	PD-1
432	человеческий	310	CD138
433	человеческий	2322	Высокомолекулярная меланома-ассоциированный антиген (HMW-MAA)
434	человеческий	165	IFN α 2c
435	человеческий	166	IFN α 4a

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептидная конструкция для лечения рака, включающая сигнальный лиганд, связанный с антителом или его антигенсвязывающей частью, которая связывается с антигеном, ассоциированным с клеточной поверхностью, в которой сигнальный лиганд является аттенуированным IL-4, включающим мутации, выбранные из группы, состоящей из I5R, T6D, E9Q, R81E, K84D, R88Q, R88A, N89R и W91D, относительно SEQ ID NO: 119, в которой сигнальный лиганд способен активировать или ингибировать IL-4 сигнальный путь в клетке, экспрессирующей антиген, и в которой рак экспрессирует антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью.

2. Полипептидная конструкция для лечения рака, включающая сигнальный лиганд, связанный с антителом или его антигенсвязывающей частью, которая связывается с антигеном, ассоциированным с клеточной поверхностью, в которой сигнальный лиганд является аттенуированным IL-6, включающим мутации, выбранные из группы, состоящей из I5R, T6D, E9Q, R81E, K84D, R88Q, R88A, N89R и W91D, относительно SEQ ID NO: 119, в которой сигнальный лиганд способен активировать или ингибировать IL-6 сигнальный путь в клетке, экспрессирующей антиген, и в которой рак экспрессирует антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью.

3. Полипептидная конструкция по любому из пп.1 или 2, в которой сигнальный лиганд связан с антителом или его антиген-связывающей частью посредством пептидной связи.

4. Полипептидная конструкция по любому из пп.1-3, в которой сигнальный лиганд связан с антителом или его антигенсвязывающей частью напрямую или посредством линкера длиной 1-20 аминокислот.

5. Полипептидная конструкция по любому из пп.1-4, в которой сигнальный лиганд связан с С-концом легкой цепочки или константным участком тяжелой цепочки антитела или его антигенсвязывающей частью.

6. Полипептидная конструкция по любому из пп.1-5, в которой антитело или его антигенсвязывающая часть связывает антиген, при этом ее внеклеточный домен имеет молекулярную массу менее 240 кД.

7. Полипептидная конструкция по любому из пп.1-6, в которой антитело или его антигенсвязывающая часть связывает антиген, при этом антиген присутствует на клетке с плотностью более чем 12600 копий на клетку или более чем 15000 копий на клетку.

8. Полипептидная конструкция по любому из пп.1-7, в которой антитело или его антигенсвязывающая часть связывает антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью с аффинностью от 50 нмоль/л, от 25 нмоль/л, от 10 нмоль/л или от 5 нмоль/л до 1 пмоль/л.

9. Полипептидная конструкция по любому из пп.1-8, в которой антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью, выбран из группы, состоящей из CD38, HM1.24, CD56, CS1, CD20, CD74, IL-6R, Blys (BAFF), BCMA, HLA-SR, кининогена, бета2 микроглобулина, FGFR3, ICAM-1, матриптазы, CD52, EGFR, GM2, альфа4-интегрина, IFG-1R, KIR, CD3, CD4, CD8, CD24, CD44, CD69, CD71, CD83, CD86, CD96, HLA-DR, PD-1, ICOS, CD33, CD115, CD11c, CD14, CD52, CD14, FSP1, FAP, PDGFR альфа, PDGFR бета, ASGR1, ASGR2, FSP1, RTI140/Тiальфа, HTI56, VEGF рецептора, CD241 продукта гена RCHE, CD117 (c-kit), CD71 (рецептор трансферрина), CD36 (рецептор тромбоспондина), CD34, CD45RO, CD45RA, CD115, CD168, CD235, CD236, CD237, CD238, CD239 и CD240.

10. Полипептидная конструкция по п.9, в которой антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью, выбран из группы, состоящей из CD3, CD4, CD24, CD38, CD44, CD69, CD71, CD96, PD-1, ICOS, CD52 и PD-1.

11. Полипептидная конструкция по п.9 или 10, в которой антиген, ассоциированный с клеточной поверхностью, является CD38.

12. Полипептидная конструкция по любому из пп.1-11, в которой антитело или его антиген-

связывающая часть является антителом или Fab фрагментом.

13. Полипептидная конструкция по любому из пп.1-12, обладающая индексом антиген-специфичности более чем 50.

14. Полипептидная конструкция по п.13, обладающая индексом антигенспецифичности более чем 100.

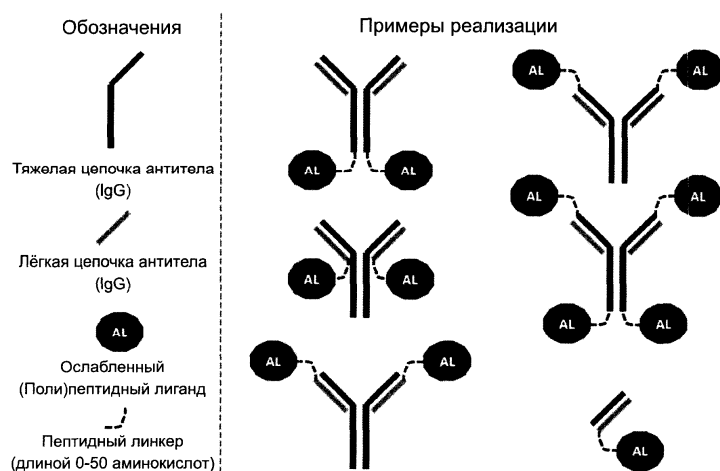
15. Полипептидная конструкция по п.14, обладающая индексом антигенспецифичности более чем 1000.

16. Композиция для лечения рака, включающая полипептидную конструкцию по любому из пп.1-15 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

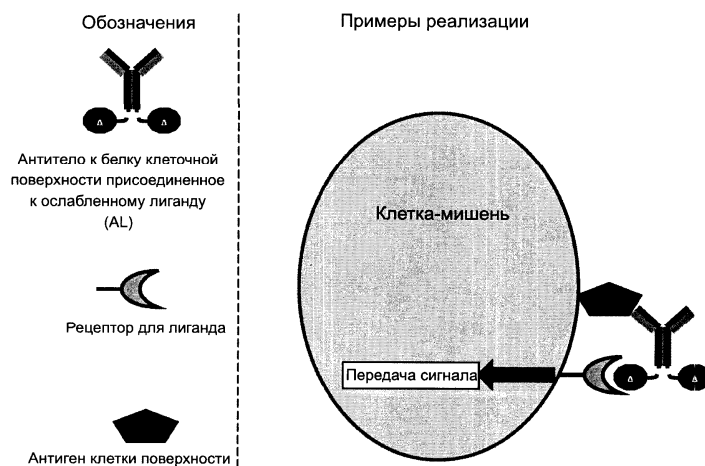
17. Способ лечения ракового заболевания у субъекта, включающий введение субъекту полипептидной конструкции по любому из пп.1-15 или композиции по п.16, при этом раковое заболевание выбирают из множественной миеломы и неходжкинской лимфомы.

18. Применение полипептидной конструкции по любому из пп.1-15 в получении медикамента для лечения ракового заболевания.

19. Применение полипептидной конструкции по п.18, в котором раковое заболевание является множественной миеломой или неходжкинской лимфомой.



Фиг. 1



Фиг. 2

Человеческий **CD38** (**seq ID no:131**):

```

1  MANCEFSEVSGDKPCCRLSRRACLGLVSLVLVLVVLAVVPRWRQQNSGEGTKRFP 60
61  ETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCCSVWDAFKGAFISKHECNITEEDYQPLMKLGTQTVPCN 120
121  KILLWSRIKDLAQFTQVQREMETLEDTLGLYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDC 180
181  SNNPVSVEWKTVSRFAEAACDVVHMLNGRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLQA 240
241  WVIHGGRDSDRLCQDPPTIKELESII SKRNIQFSCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI 300
  
```

подчеркнуто: внеклеточный домен
курсив: трансмембранный домен

Фиг. 3

Последовательность IFN α 2b (SEQ ID NO:3)

человеческий IFN α 2b 1 CDLPQTHSLG SRRTLMMLAQ MREISLFSCL KDRHDFGFPQ EEPGNQFQKA ETIPVLHEMI QQIFNLFSSTK DSSAAWDETLL 80
(SEQ ID NO:3) 81 LDKFYTELQV QINDLEACVI QGVGVTTETPL MKEDSILAVR KYFQRITLYL HKKYYSPCAW EVVRADIMRS FSLSTNLQES 160
161 LRSKE 165

Последовательность IFN β 1 (SEQ ID NO:91)

человеческий IFN β 1 1 MSYNLLGFLQ RSSNFQSQKL LMQNGRLEY CLKDPMNFDI PEEKQLQOF QKEDAALTIY EMLQNIFAIF QDSSSTGWN 80
(SEQ ID NO:91) 81 ETIVENLLAN VYHQINHLKT VLEEKLEKED FTRGKIMSSL HMKRYVGRIL HYLKAEYSH CWTIVRVEI LRNFYFINKL 160
161 TGYLRN 166

Последовательность IFN β 1b (SEQ ID NO:103)

человеческий IFN β 1b 1 MSYNLLGFLQ RSSNFQSQKL LMQNGRLEY CLKDPMNFDI PEEKQLQOF QKEDAALTIY EMLQNIFAIF QDSSSTGWN 80
(SEQ ID NO:103) 81 ETIVENLLAN VYHQINHLKT VLEEKLEKED FTRGKIMSSL HMKRYVGRIL HYLKAEYSH CWTIVRVEI LRNFYFINKL 160
161 TGYLRN 166

Последовательность IFN γ (SEQ ID NO:106)

человеческий IFN γ 1 QDPYVKEAEN LKRYENAGHS EVADNGTLFL GILKNWKEES DRKIMQSQIV SFYFKLFKMF KDDQSISQSV ETINEDMNVK 80
(SEQ ID NO:106) 81 FFNSNKKKRD DFEKLTNYSV TDINVCQKAI HELIQVMARL SPAAKTGKPK RSQMLFRGR ASQ 143

Фиг. 4A

Последовательность IL-4 (SEQ ID NO:119)

Человеческий IL-4 1 HKCDITLQEI LKTLNSLTQK KTLCTELTVT DIFAASKNTI EKETFCRAAT VLRQFYSHNE KDTICLGATA QQFHEHQLI 80
(SEQ ID NO:119) 81 RFLKRLDRNL WGLAGLNSCP VKENQSTLE NFLERLKTIM REKYSKCSS 129

Последовательность IL-6 (SEQ ID NO:123)

человеческий IL-6 1 FVPPGEDSKD VAAPHQPIET SSERIDKQIR YILGIGIALR FETCHESNMC ESSKEALAEN NINLFKMAEK DQFCGSGNE 80
(SEQ ID NO:123) 81 BTCLVKIITG LLEFEVYLEY LQNFESSEE QARAVQMSK VLIQFLQKKA KNDAITTED PTTNASLLTK LQAQKWLQD 160
161 MTHLILRSF KEFLQSSLRQ LQCM 184

Фиг. 4B

Тяжелая цепочка (SEQ ID NO:180):

1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTTY 60
61 ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEPVFDYWGQGTLVTV 120
121 SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTSVWNSGALTSGVHTFPAVLQ 180
181 SSGLYSLSSVTVFSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGP 240
241 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN 300
301 TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM 360
361 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ 420
421 EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSISLSLGKCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK 480
481 DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQ 540
541 QNDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRDEIMRSF 600
601 SLSTNLQESLRSKE 614

Легкая цепочка (SEQ ID NO:134):

1 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA 60
61 RFGSGSGGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTEFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP 120
121 SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT 180
181 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC 214

двойное подчеркивание: тяжелая и легкая цепочки антитела

одинарное подчеркивание: цитокин

одинарное подчеркивание и жирный шрифт: ослабляющая мутация

G005-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4

Фиг. 5A

Тяжелая цепочка (SEQ ID NO: 330) :

```

1  QVQLQQSGSELMMPGASVKISCKATGYTFSNYWIEWVKQRPBGHGLEWIGEILPGTGRTIY 60
61  NEKFKGKATFTADISSNTVQMQLSSLTSEDSAVYYCARRDYGNFYAMDYWGQGTSTVTV 120
121  SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ 180
181  SSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP 240
241  SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS 300
301  TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPOVYTLPPSQEEM 360
361  TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ 420
421  EGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKCKDLPTHTSLGSRRTLMMLAQMRRI SLFSLCK 480
481  DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLSTTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQ 540
541  LNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRDEIMRSF 600
601  SLSTNLQESLRSKE 614

```

Легкая цепочка (SEQ ID NO: 326) :

```

1  DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCSASQGINNYLNWYQOKPDGTVELLIYYTSTLQSGVPS 60
61  RFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIGTYICQQYSKLPRTFGGKTLEIKRTVAAPSVFIFPP 120
121  SDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLT 180
181  LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC 214

```

двойное подчеркивание: тяжелая и легкая цепочки антитела

одинарное подчеркивание: цитокин

одинарное подчеркивание и жирный шрифт: ослабляющая мутация

nBT062-HC-L0-IFN α (A145D) IgG4

Фиг. 5B

Тяжелая цепочка (SEQ ID NO: 214) :

```

1  EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTTY 60
61  ADSVKGRETISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYFCAKDILWFGEPVFDYWGQGTSLVTV 120
121  SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ 180
181  SSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP 240
241  SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS 300
301  TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPOVYTLPPSQEEM 360
361  TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ 420
421  EGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKMSYNLLGFLQSSNFQSOKLLWQLNGRLEYC 480
481  LKDAAMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANV 540
541  YHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEIL 600
601  RNIFYFINRLTGYLRN 615

```

Легкая цепочка (SEQ ID NO: 134) :

```

1  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA 60
61  RFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP 120
121  SDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLT 180
181  LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC 214

```

двойное подчеркивание: тяжелая и легкая цепочки антитела

одинарное подчеркивание: цитокин

одинарное подчеркивание и жирный шрифт: ослабляющая мутация

G005-HC-L0-IFN β (R35A) IgG4

Фиг. 5C

Тяжелая цепочка (SEQ ID NO: 324) :

```

1  QVQLKQSGPGLVQPSQSLSLTCTVSGFSLTSYGVHWRQPPGKGLEWLGVIWSSGSTDYN 60
61  AAFISRLSIRKDNSKSOVFFKMNSLOADDTAIYYCARTFTTSTSAWFAYWGQGLVTVSA 120
121 ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 180
181 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG 240
241 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN 300
301 STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE 360
361 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW 420
421 QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGSGGGGSGGGGSPVPPGEDSKDVAAP 480
481 HRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGEF 540
541 QSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLD 600
601 AITTPDPTTNASLLTKLQAQNQLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLEALRQM 650

```

Легкая цепочка (SEQ ID NO: 312) :

```

1  SIVMTQTPKFLVSAGDRVTTITCASQSVSNDVAWYQOKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPD 60
61  RFTGSGYGTDFTTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPPWTFGGGKLEIRRTVAAPSVFIFP 120
121 PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTL 180
181 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 215

```

двойное подчеркивание: тяжелая и легкая цепочки антитела

одинарное подчеркивание: цитокин

одинарное подчеркивание и жирный шрифт: ослабляющая мутация

курсив: линкерная последовательность

HB95-HC-LI6-IL-6(R179E) IgG1

Фиг. 5D

Тяжелая цепочка (SEQ ID NO: 306) :

```

1  DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGHSITSDYAWNWRQFPGDKLEWMGYISYSGYTYY 60
61  NPSLKSRSVITRDTSKNQOFFLQNSVTTEDTATYFCARDLDYGPWFAYWGQGLVTVSAA 120
121 STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG 180
181 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP 240
241 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS 300
301 TYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL 360
361 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ 420
421 QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGSHKCDITLQEI IKTLSLSTEQKTLCT 480
481 ELTVTDIFAASKNTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKR 540
541 LDQNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS 584

```

Легкая цепочка (SEQ ID NO: 300) :

```

1  DIQMTQSPASLSASVGETVTLTCRASENIHNYLAWYQOKQKSPQLLVYNVKTLDGVPS 60
61  RFGSGSGGTQYSLKINSLOPEDFGSYQCQHFWSPPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPP 120
121 SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLT 180
181 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 214

```

двойное подчеркивание: тяжелая и легкая цепочки антитела

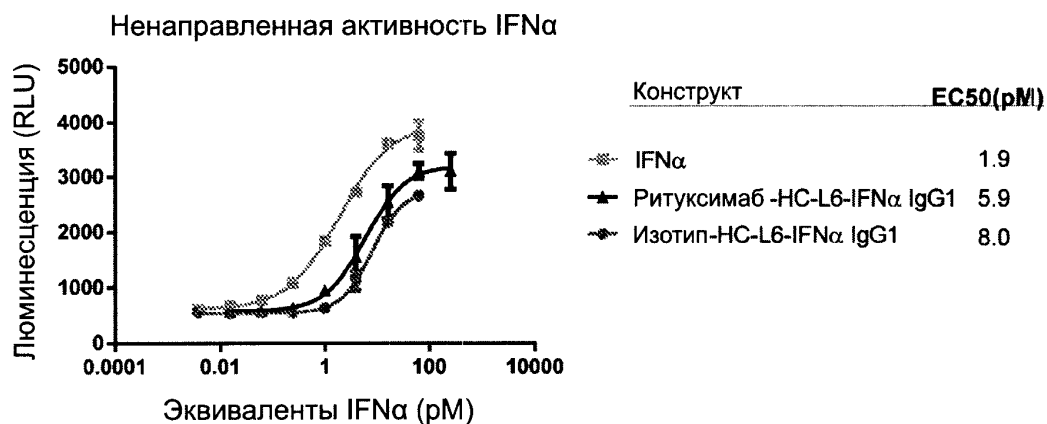
одинарное подчеркивание: цитокин

одинарное подчеркивание и жирный шрифт: ослабляющая мутация

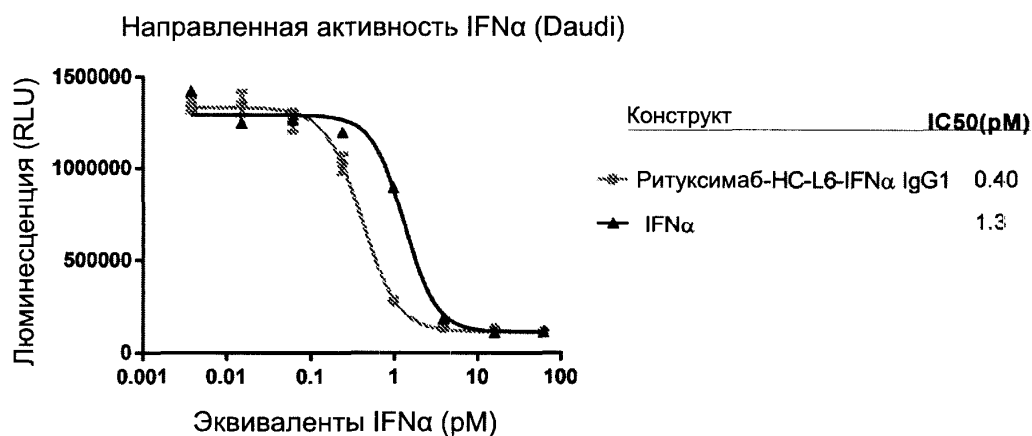
курсив: линкерная последовательность

JI I0-HC-L6-IL-4(R88Q) IgG1

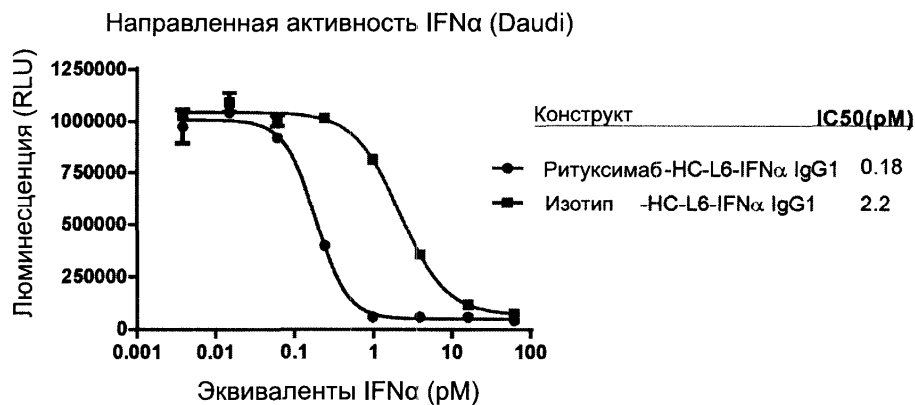
Фиг. 5E



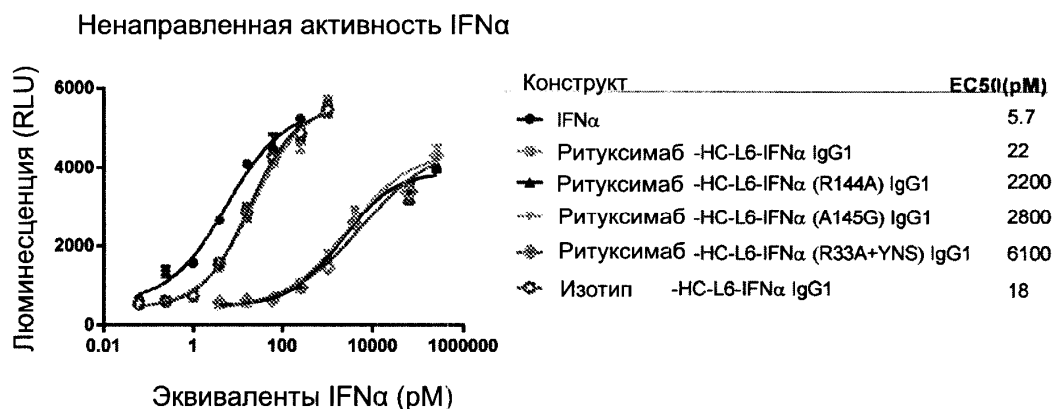
Фиг. 6



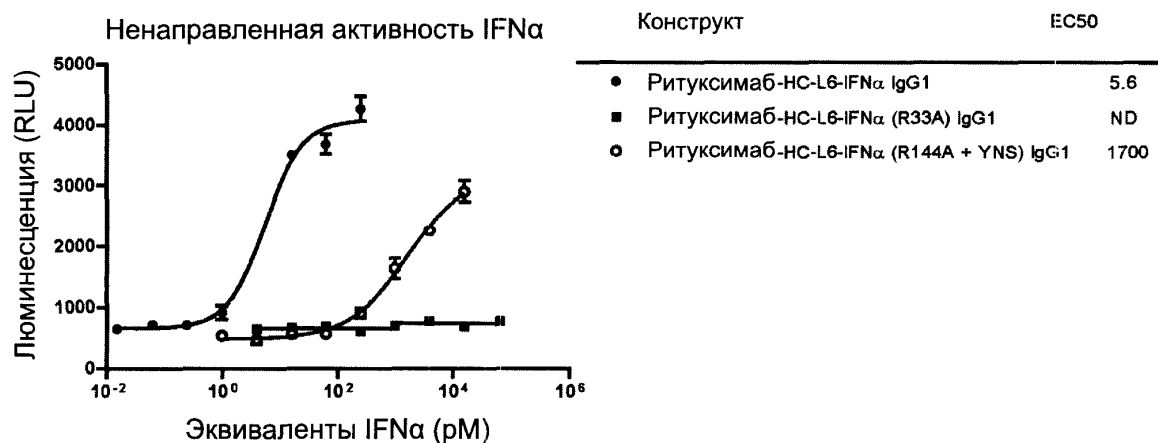
Фиг. 7



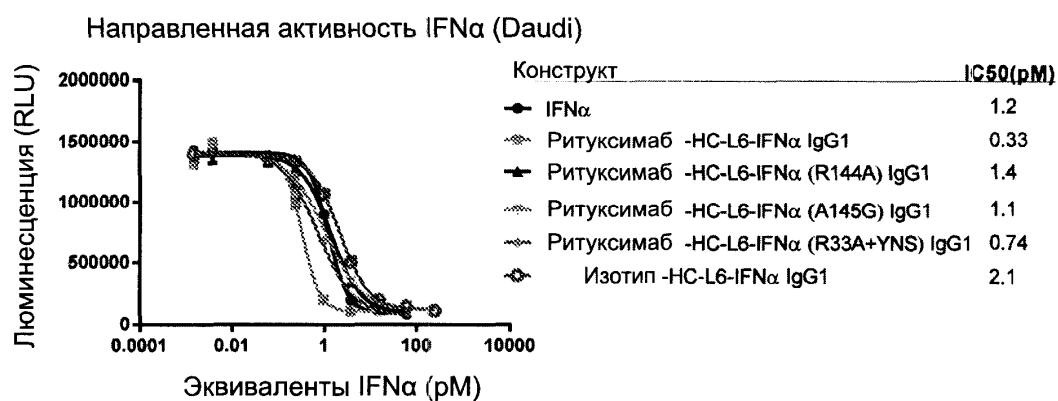
Фиг. 8



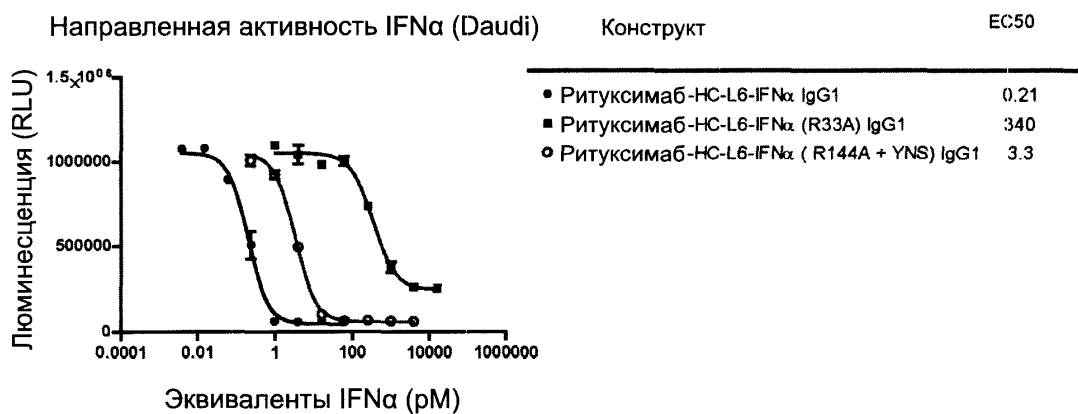
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

X355/02 VH (SEQ ID NO:391):

1 QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTN 60
 61 YNPSLKSRVTISVDTLKNQISLRLTSVTAADTAVYYCARVGGAGGWPMQVWGQGTITVTVS 120
 121 S 121

X355/02 Vλ (SEQ ID NO:390):

1 QAVLTQPASLSASPGEARLTCTLPSPDINVRYYNIYWYQQKPGSPPRYLLYYSDSHKQ 60
 61 GSGVPSRFSGSKDVSTNSGILLISGLQSEDEADYYCMTWSSNGSGVFGGGTQLTVL 116

X355/07 VH (SEQ ID NO:393):

1 QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGSIYHSGSTYYN 60
 61 PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDLYYYGMDVWGQGTITVTVSS 118

X355/07 Vκ (SEQ ID NO:392):

1 AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS 60
 61 RFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQSYFTPLYTFGQGTKLEIK 108

X910/12 VH (SEQ ID NO:395):

1 EVQLVQSGAEVKKSGASVKVSCKASGYTFTDYYIHVVRQAPGQGLEWMGWINPNNGGVTF 60
 61 AQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMDLSSLRSDDTAVYFCARDIRMSGWLAPFDYWGQGTILTV 120
 121 SS 122

X910/12 Vλ (SEQ ID NO:394):

1 QAVLTQPASLSASPGEARLTCTLPSPDINVRYYNIYWYQQKPGSPPRYLLYYSDSHKDQ 60
 61 GSGVPSRFSGSKDTSANTGILLISGLQSEDEADYYCMTWASNGSGVLGGGTQLTVL 116

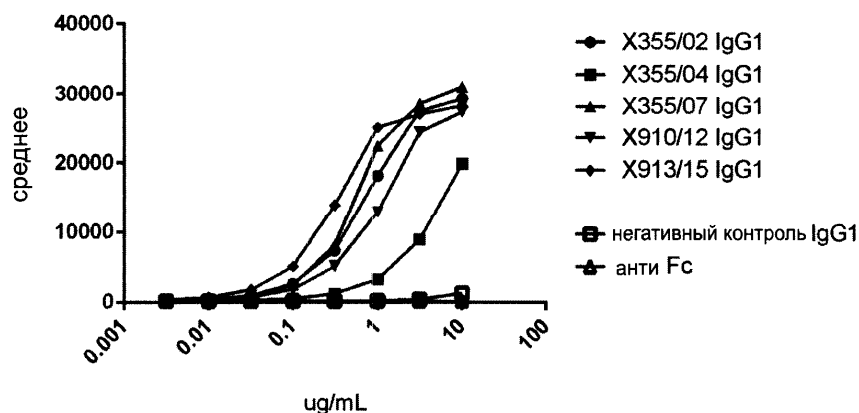
X913/15 VH (SEQ ID NO:397):

1 QVQLVESGGGVVQGGGSLRLSCAASGFTVRSNYMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGDSTYY 60
 61 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVAVTTGWYFDLWGRGTLTVVSS 120

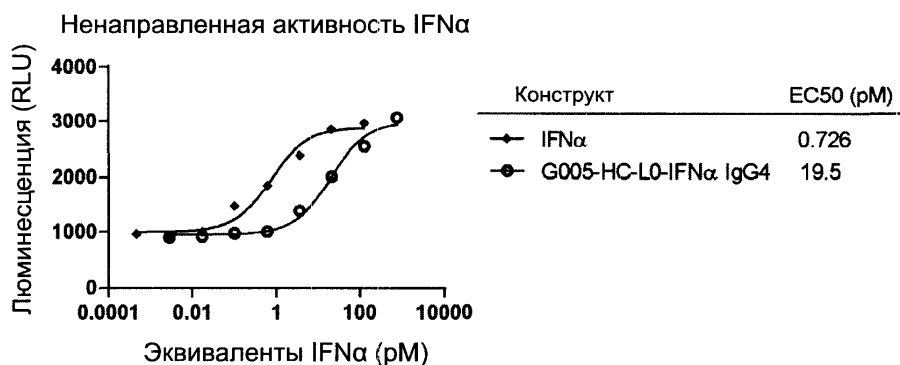
X913/15 Vλ (SEQ ID NO:396):

1 QAVLTQPASLSASPGEARLTCTLPSPDINVRYYNIYWYQEKPGSPPRYLLYYSDSSKGQ 60
 61 GSGVPSRFSGSKDVSTNTGILVISGLQSEDEAEYYCMTWSSNGSGVFGGGTQLTVL 116

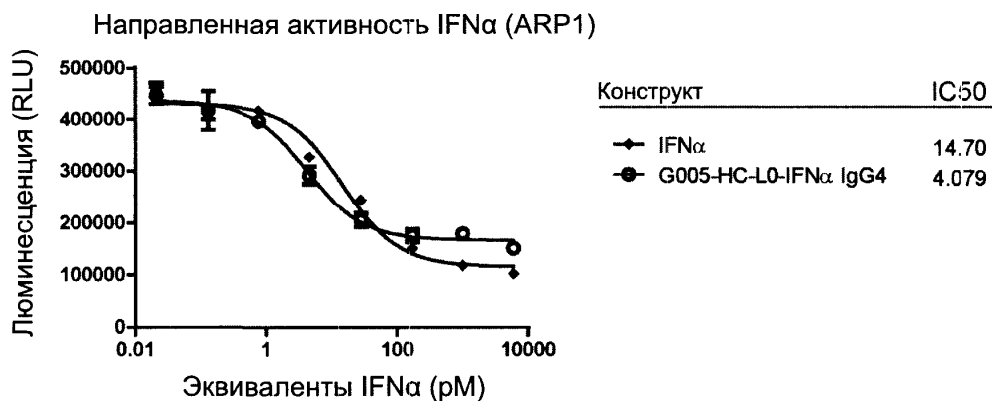
Фиг. 13



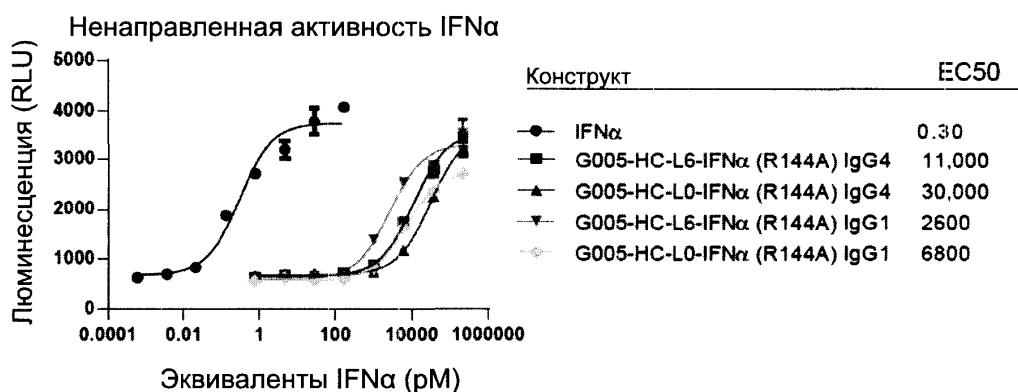
Фиг. 14



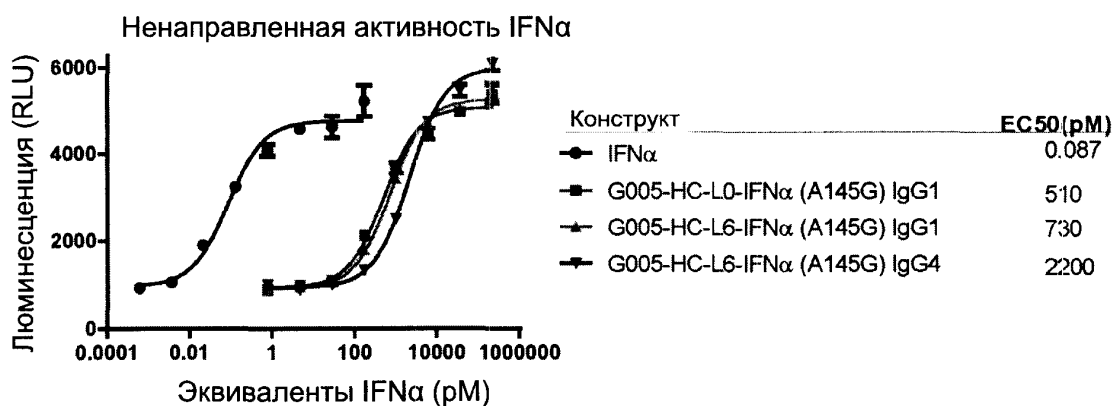
Фиг. 15



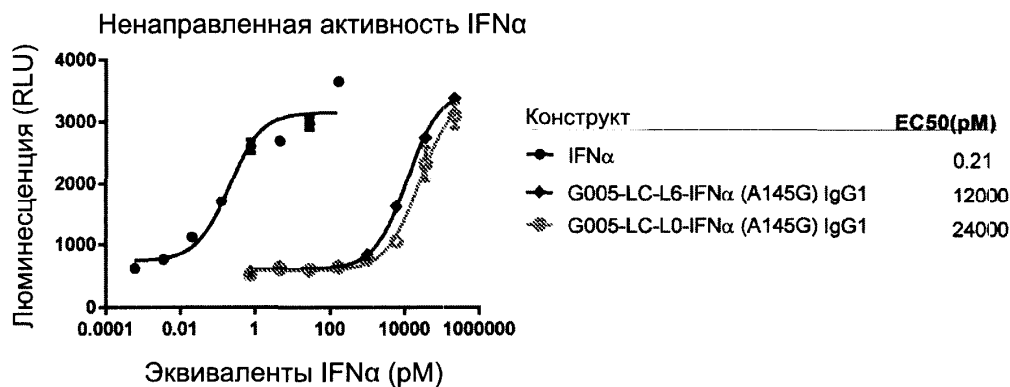
Фиг. 16



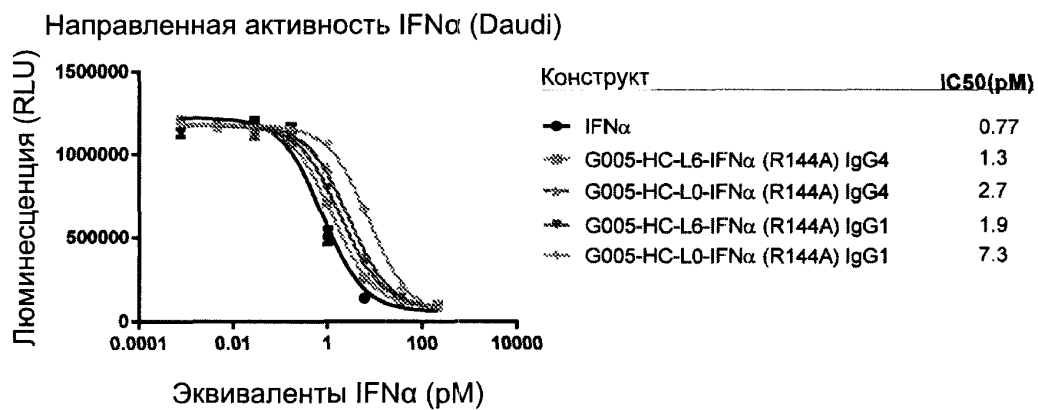
Фиг. 17



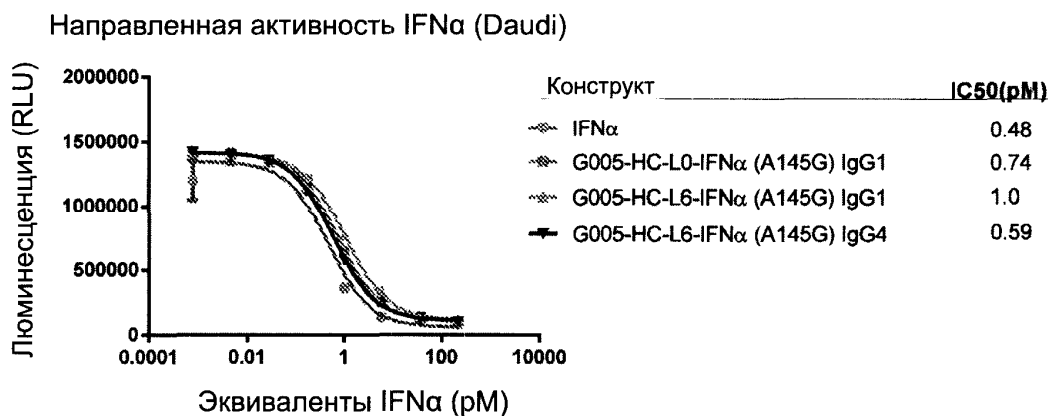
Фиг. 18



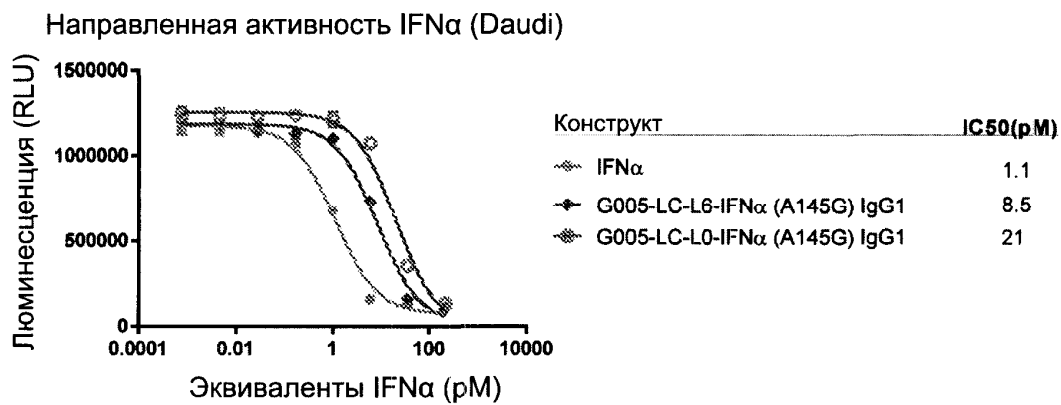
Фиг. 19



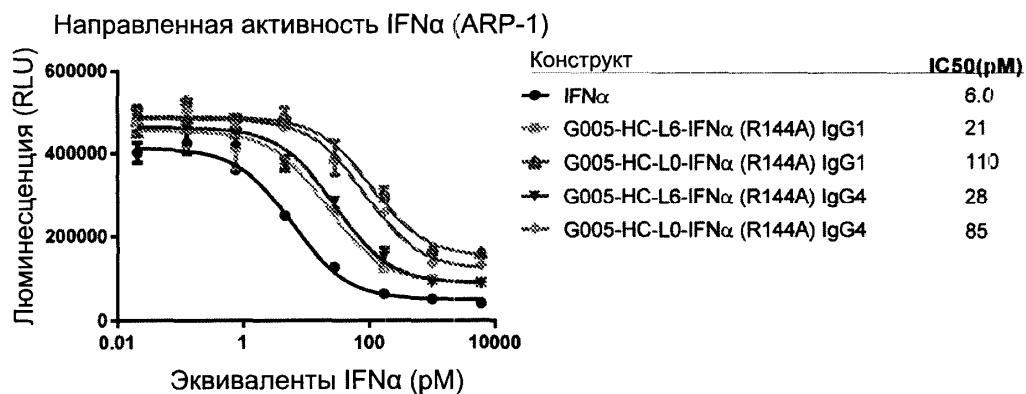
Фиг. 20



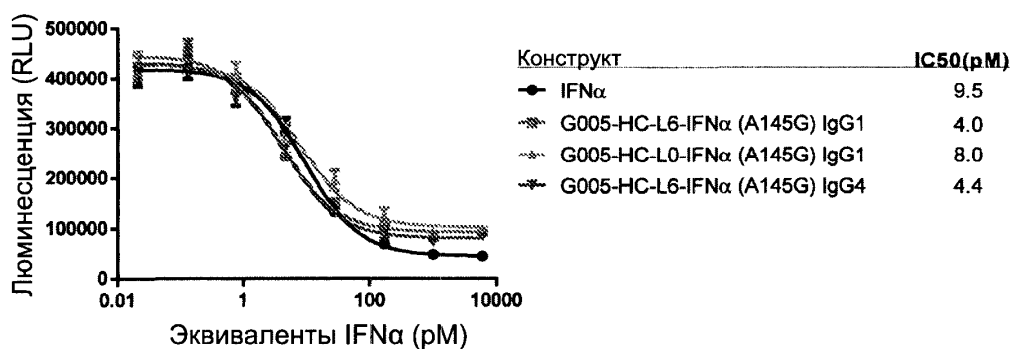
Фиг. 21



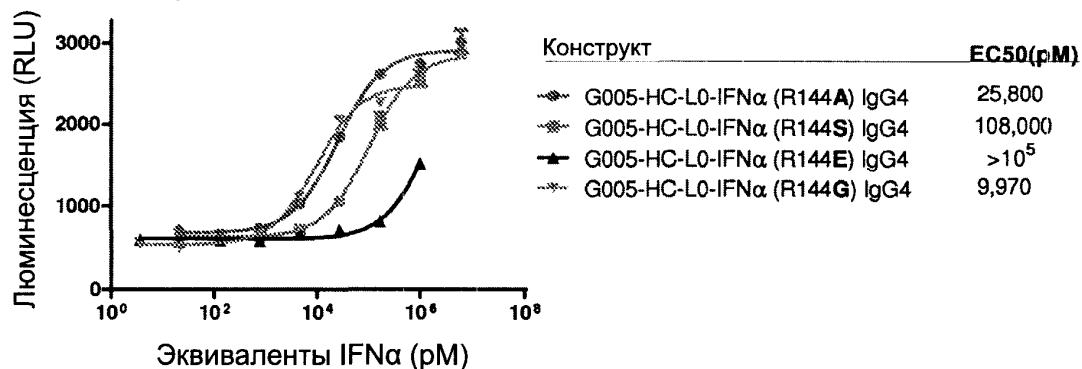
Фиг. 22



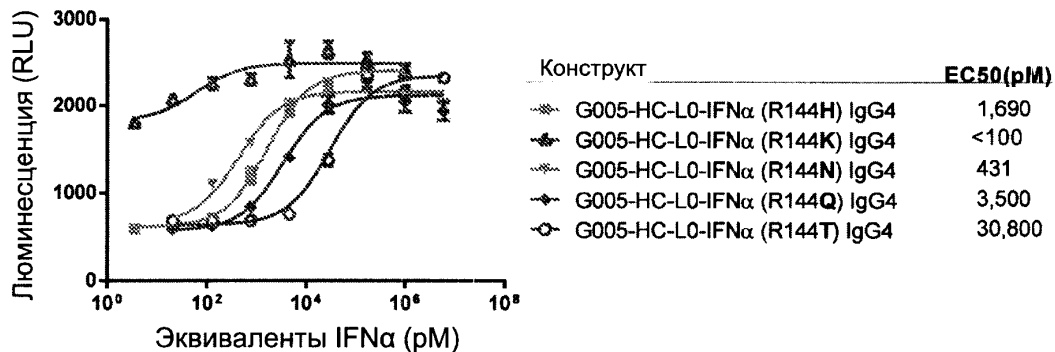
Фиг. 23

Направленная активность IFN α (ARP-1)

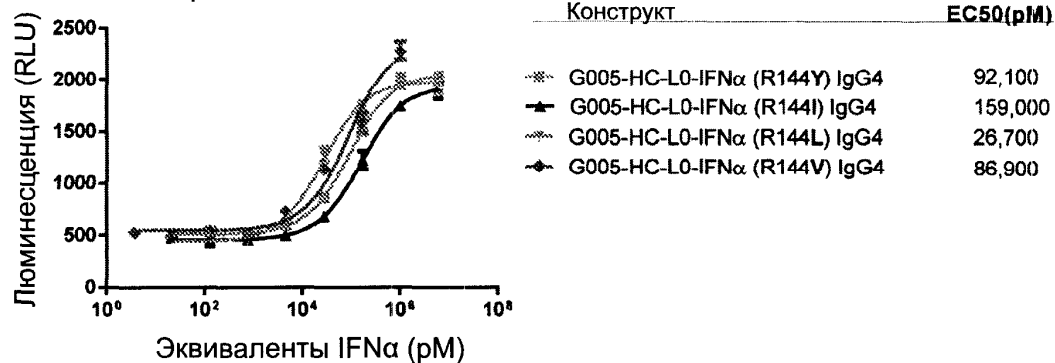
Фиг. 24

Ненаправленная активность IFN α 

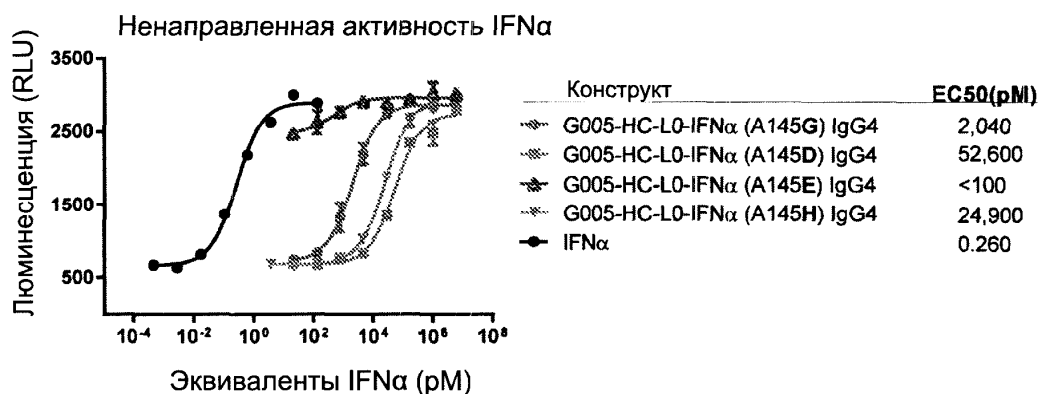
Фиг. 25

Ненаправленная активность IFN α 

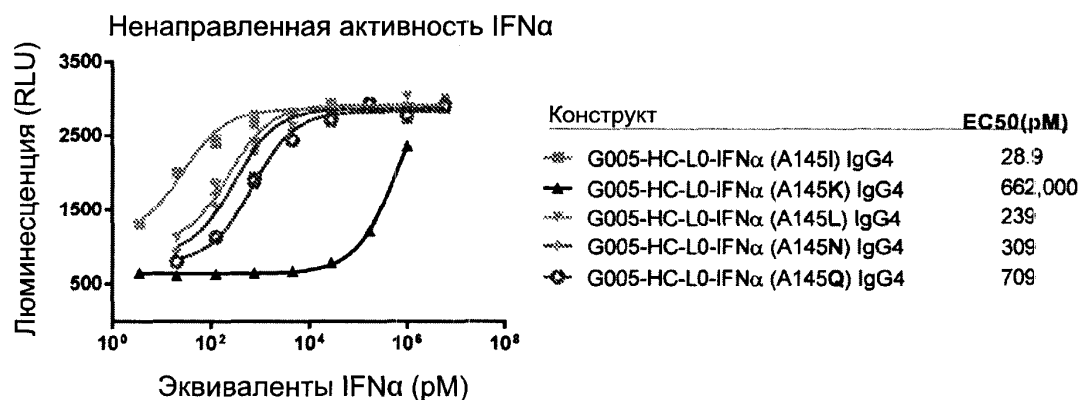
Фиг. 26

Ненаправленная активность IFN α 

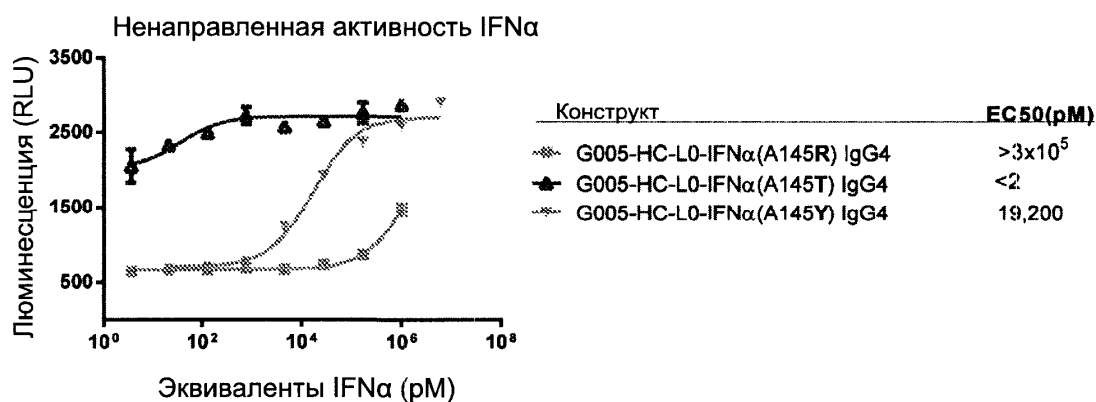
Фиг. 27



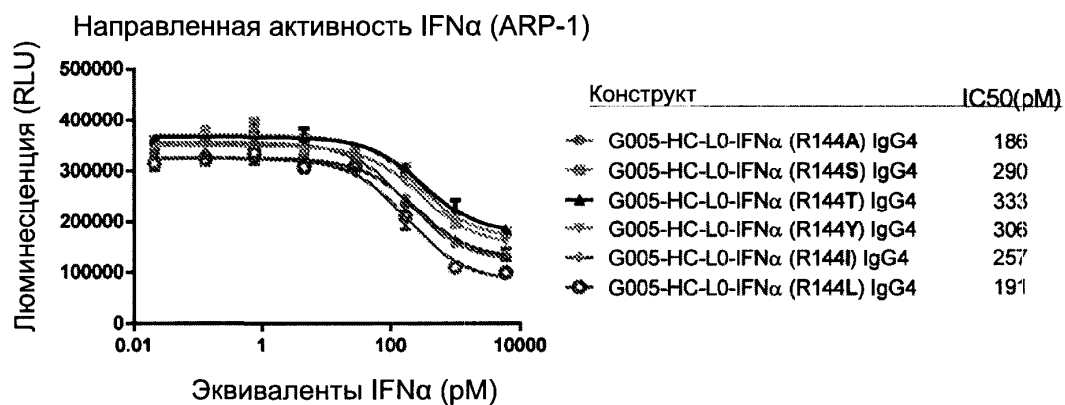
Фиг. 28



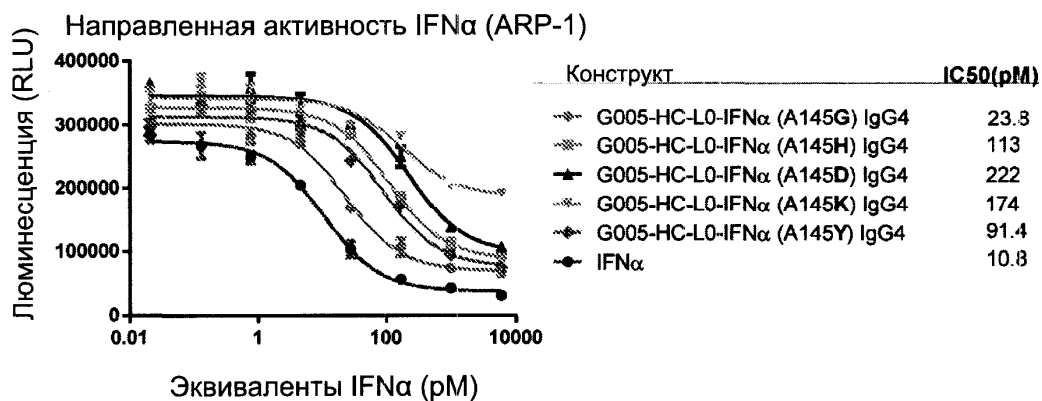
Фиг. 29



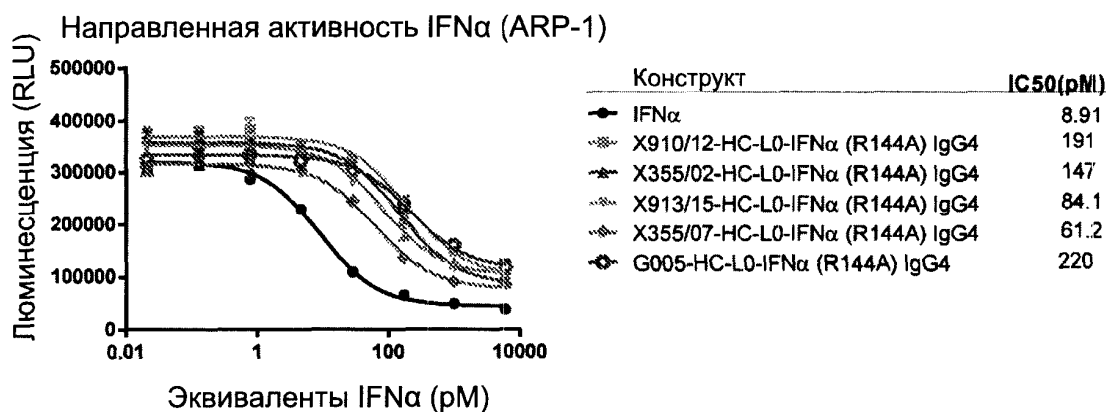
Фиг. 30



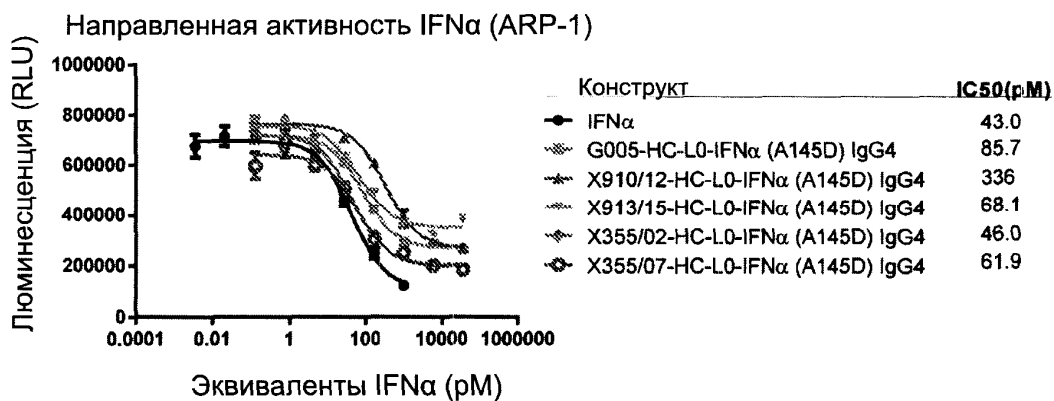
Фиг. 31



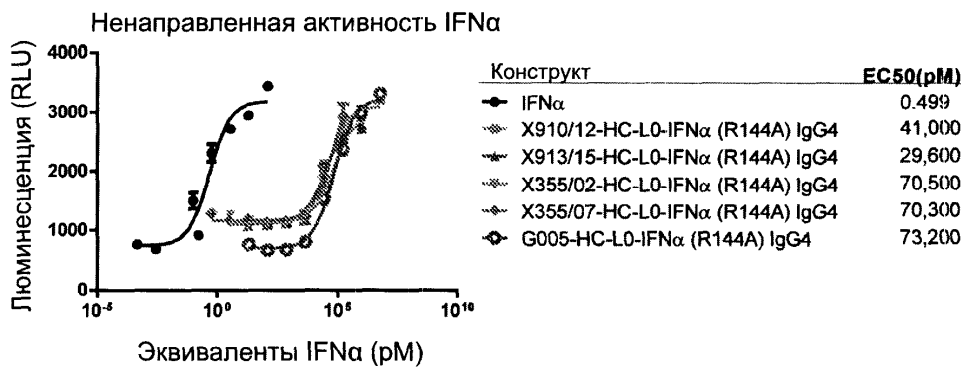
Фиг. 32



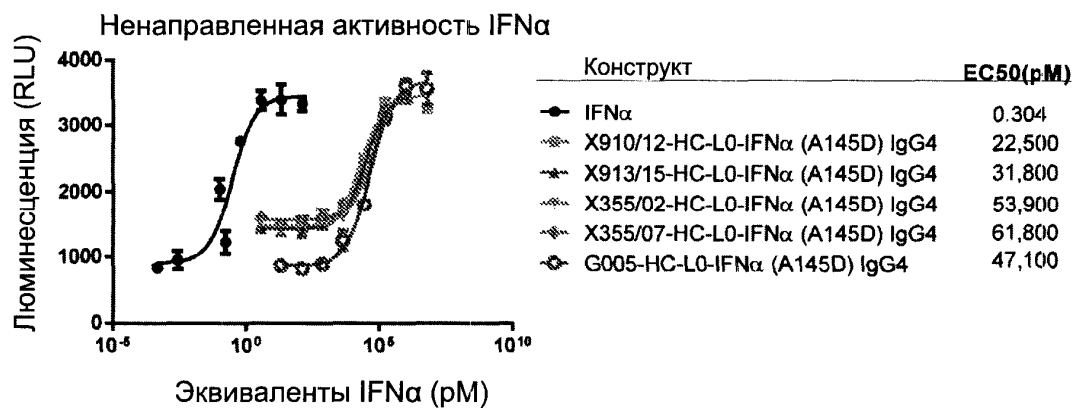
Фиг. 33



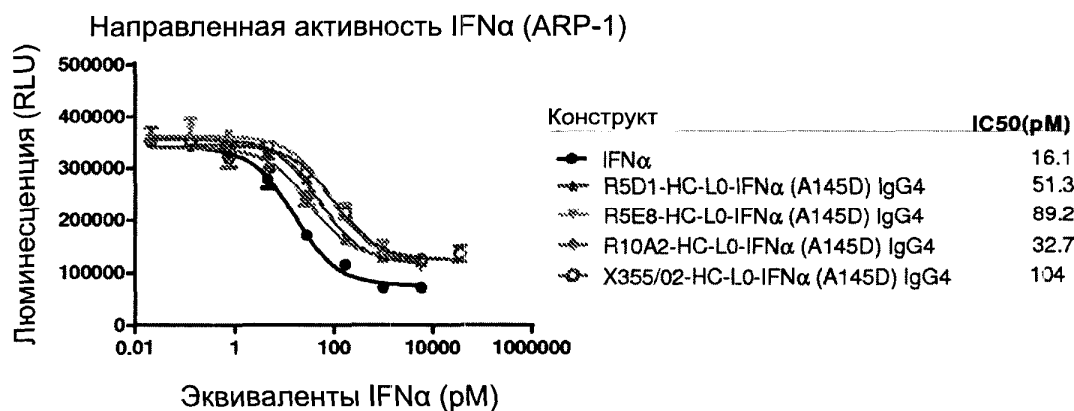
Фиг. 34



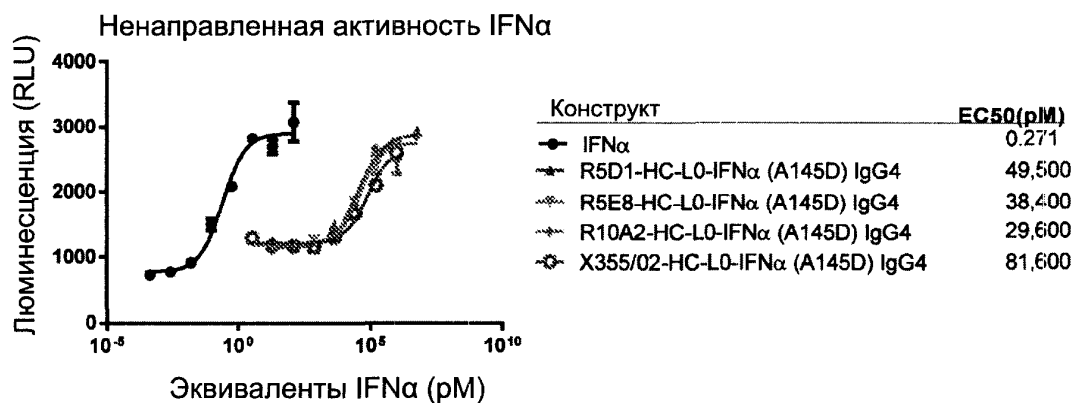
Фиг. 35



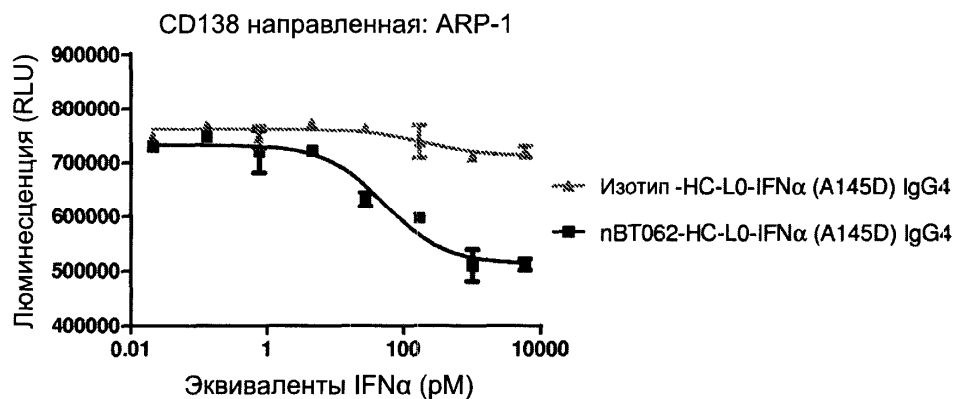
Фиг. 36



Фиг. 37

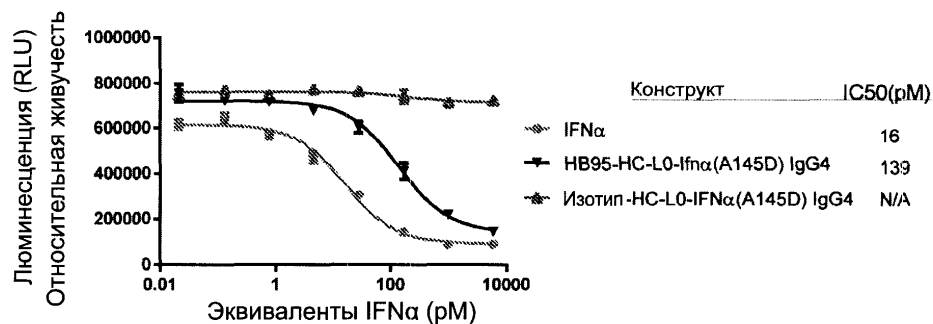


Фиг. 38

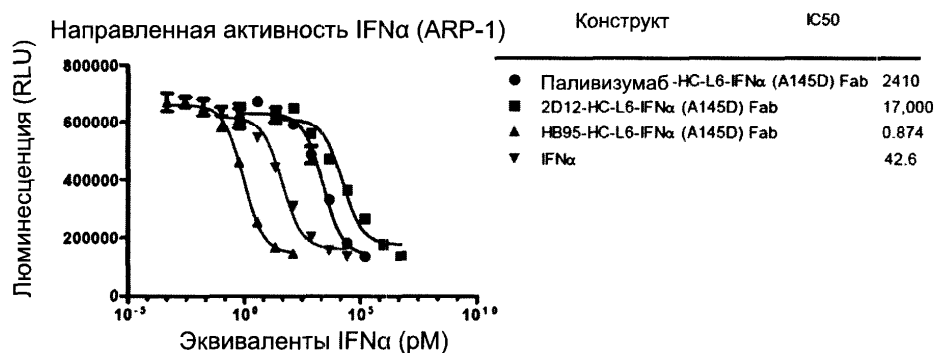


Фиг. 39

(a)

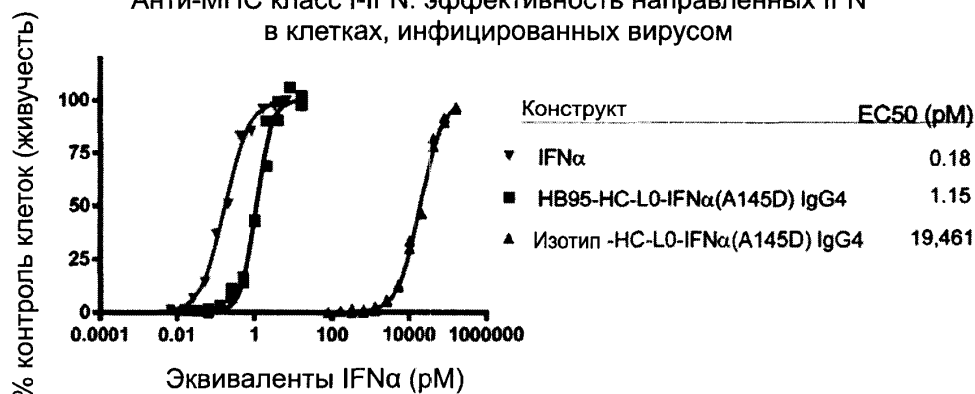
Нацеленные на МНС класс I ослабленные IFN α : ARP-1 клетки

(b)

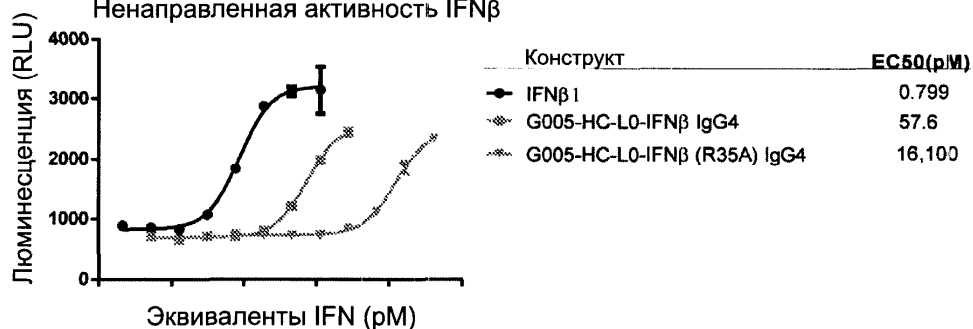


Фиг. 40

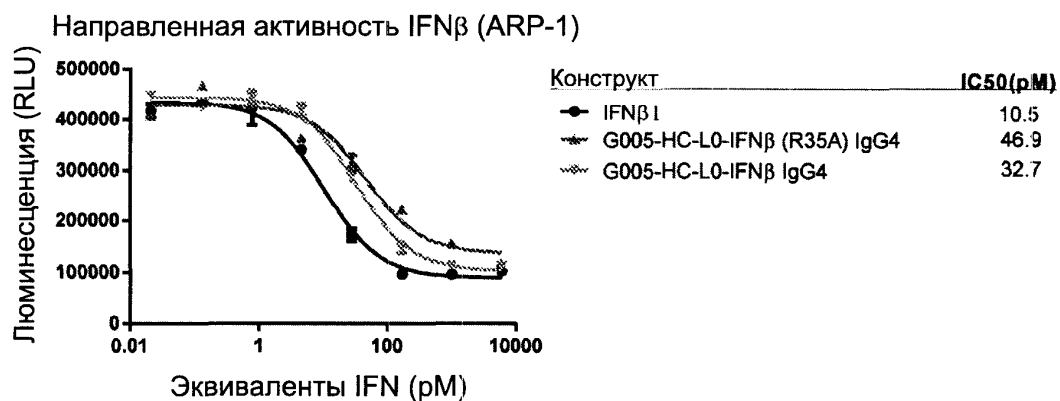
Анти-МНС класс I-IFN: эффективность направленных IFN в клетках, инфицированных вирусом



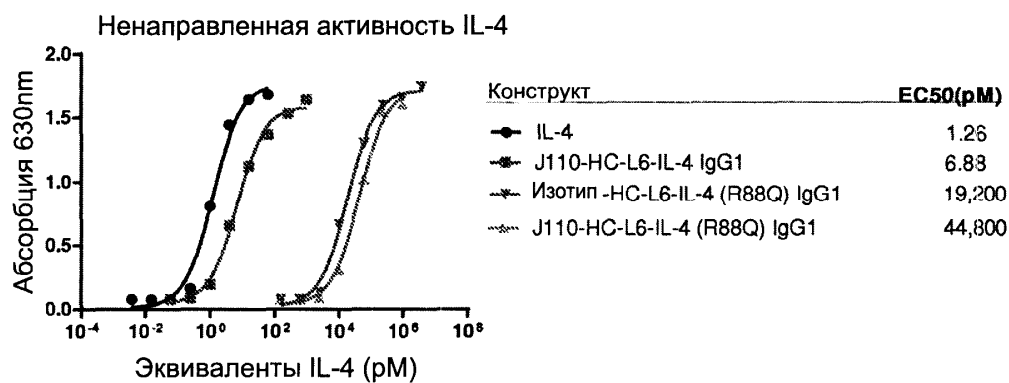
Фиг. 41

Ненаправленная активность IFN β 

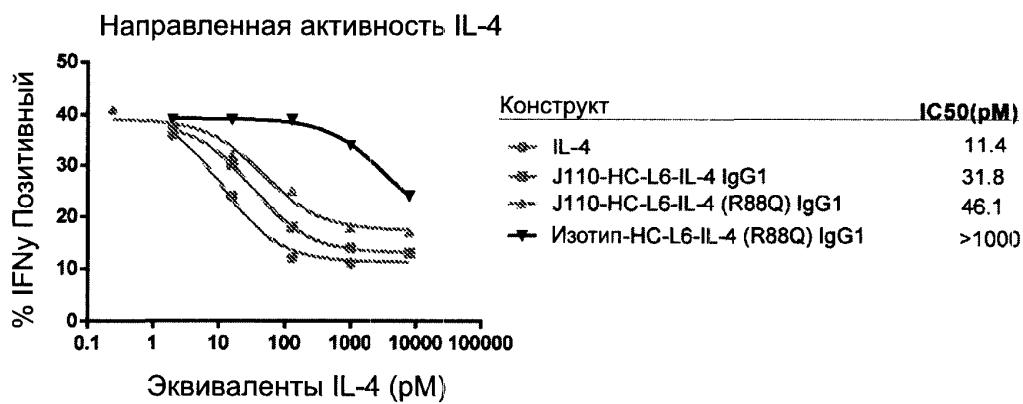
Фиг. 42



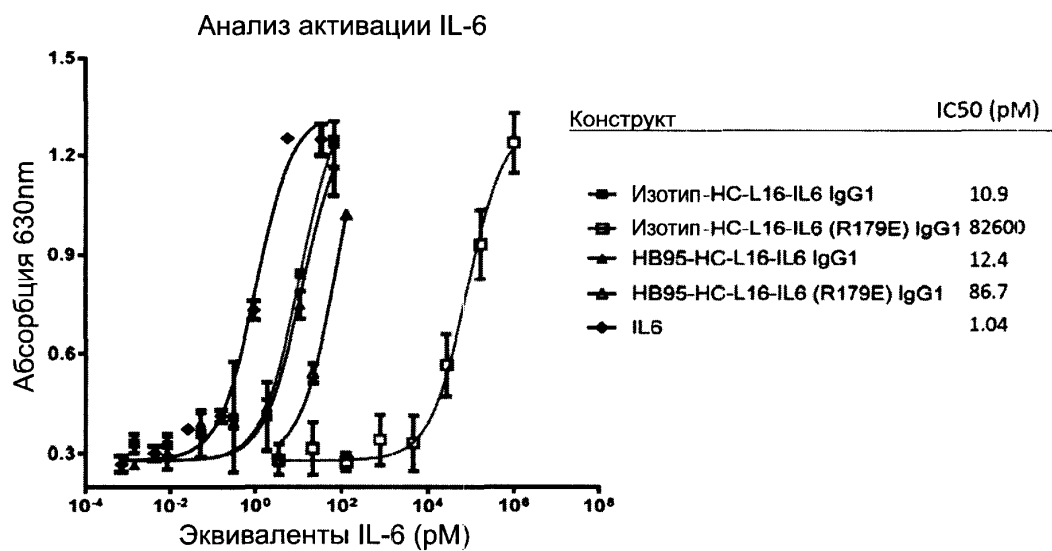
Фиг. 43



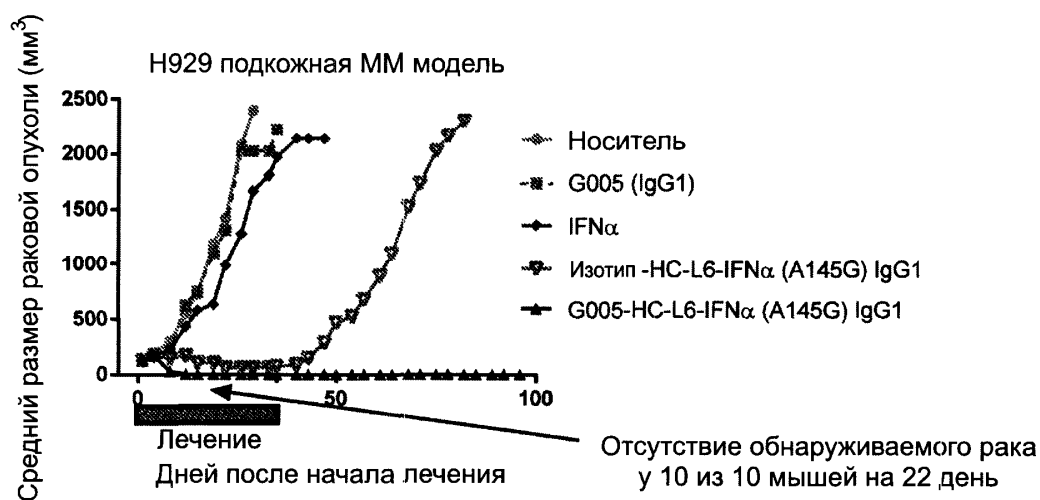
Фиг. 44



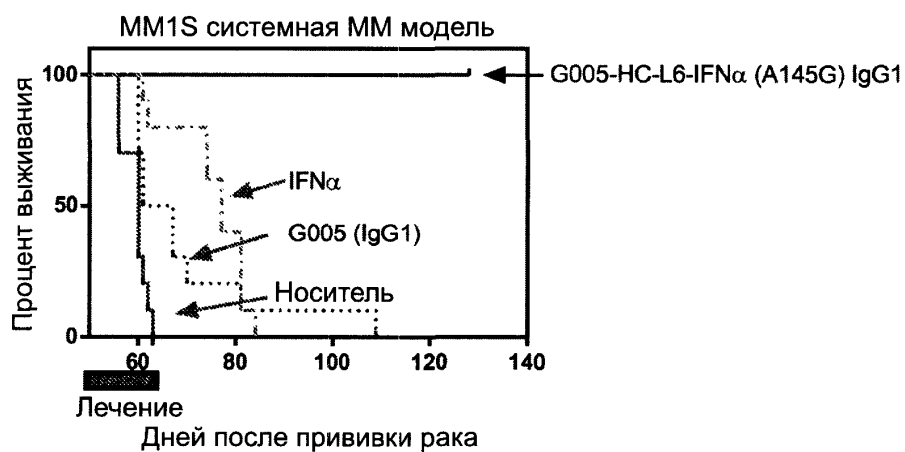
Фиг. 45



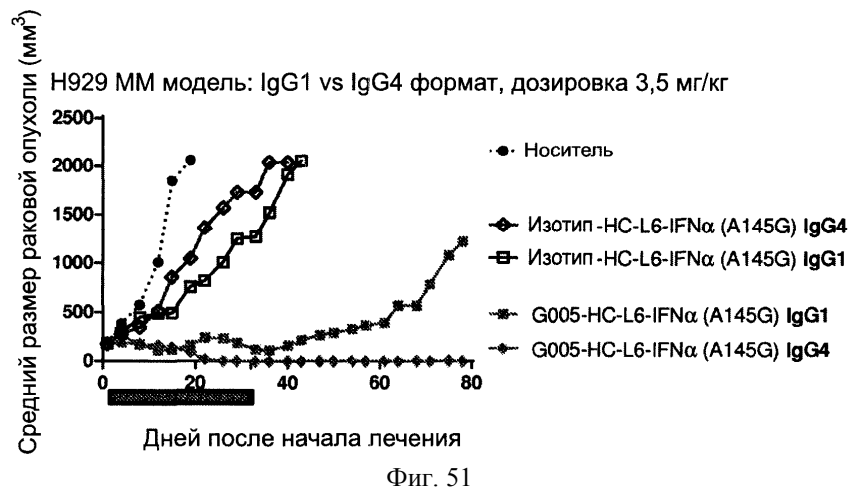
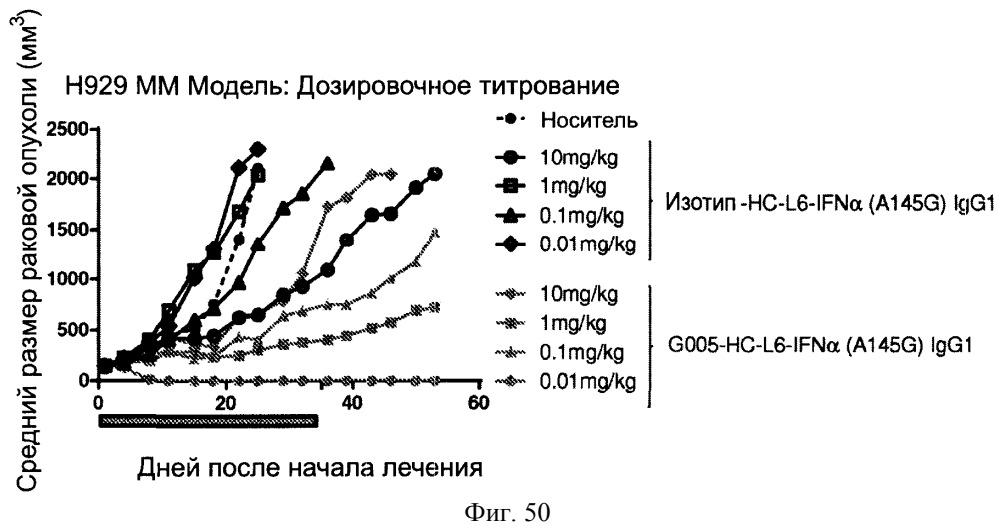
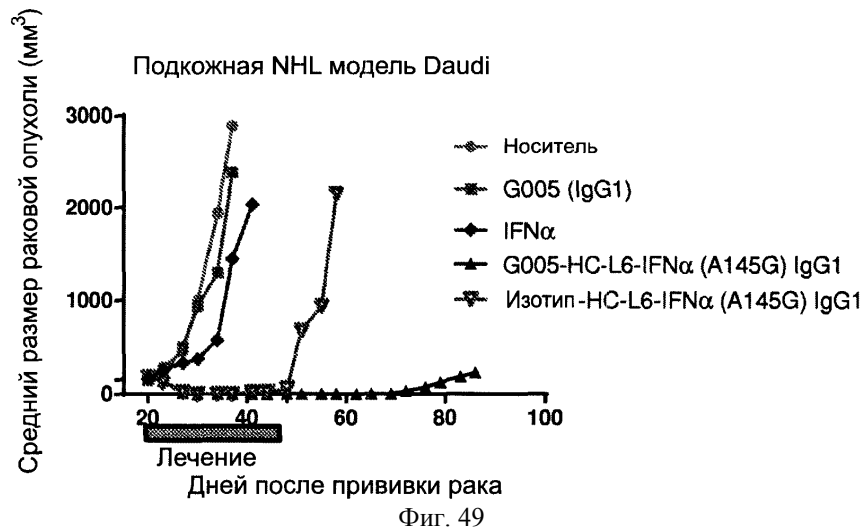
Фиг. 46

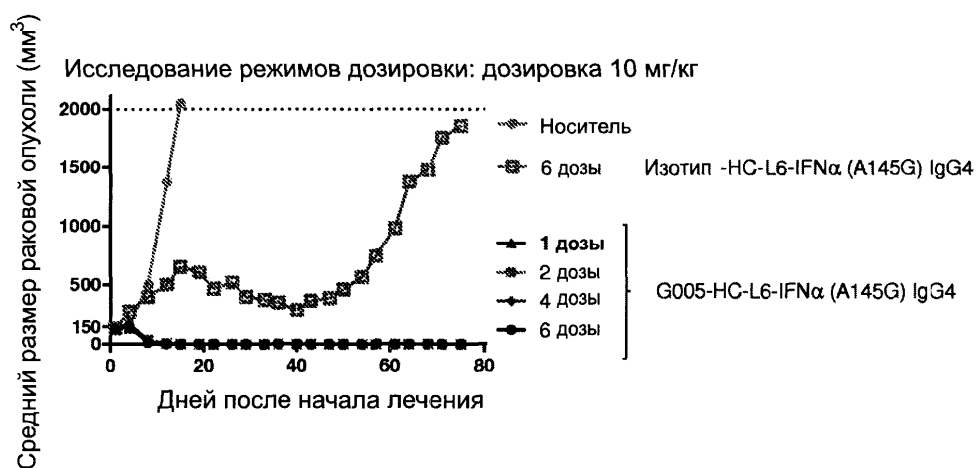
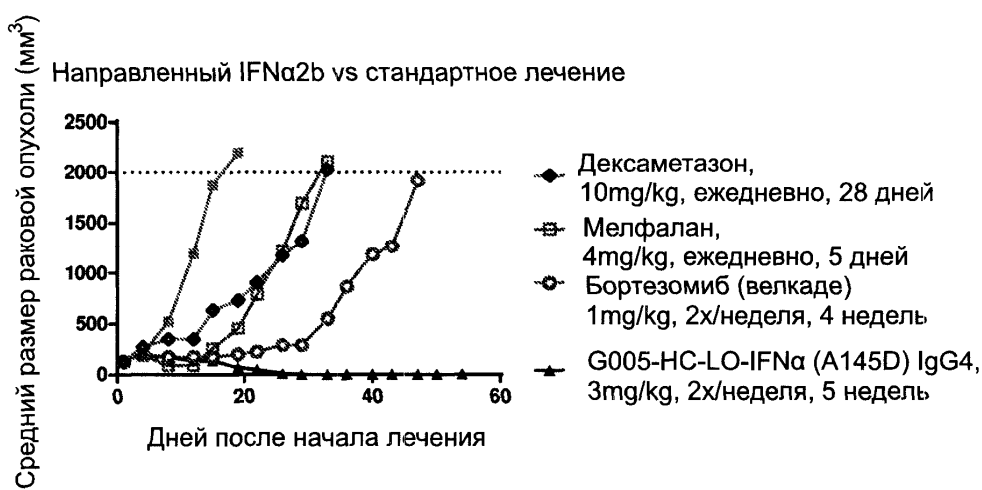
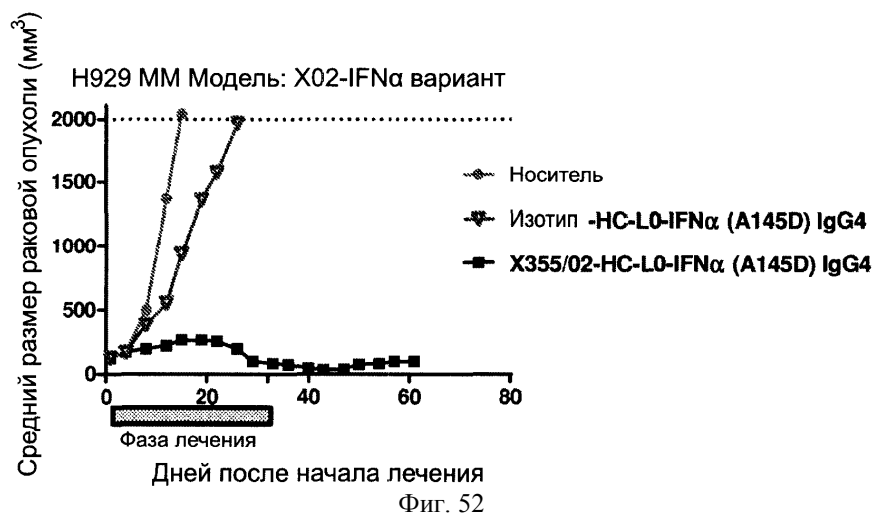


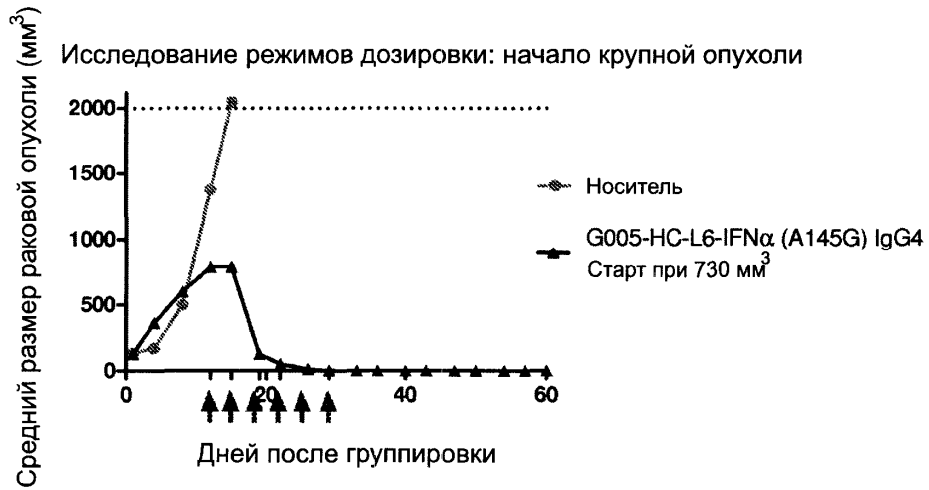
Фиг. 47



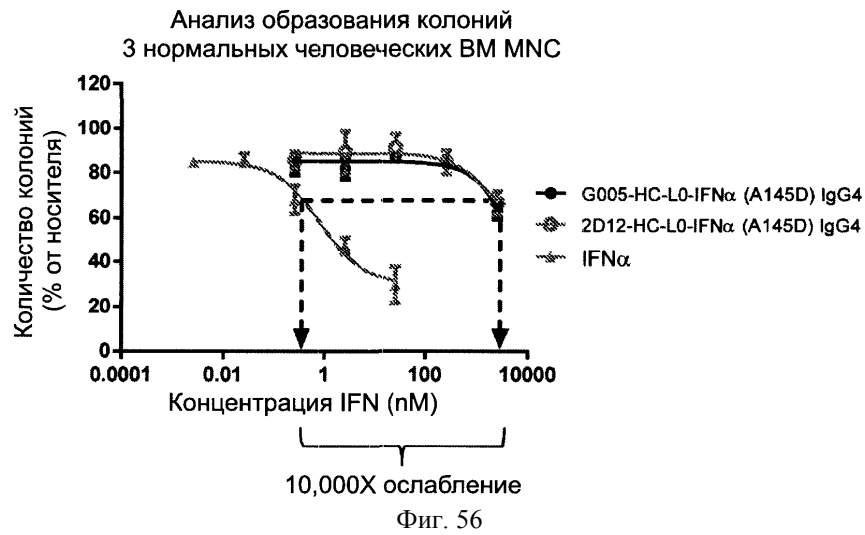
Фиг. 48





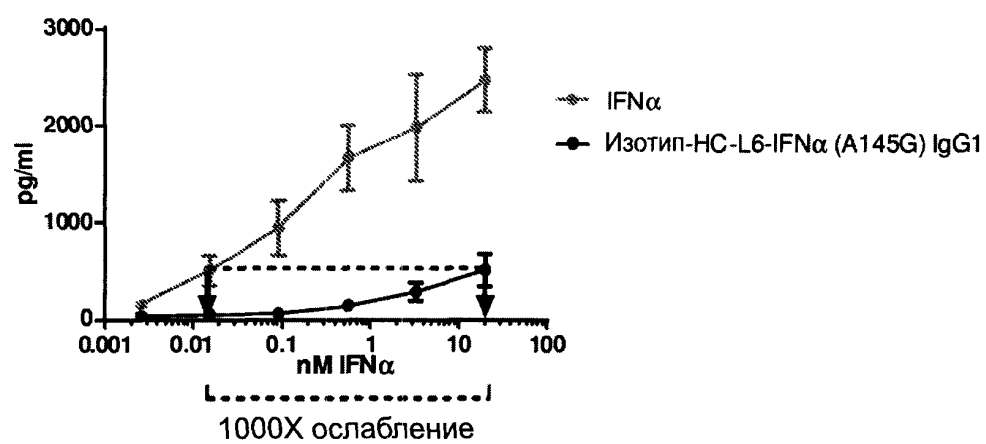


Фиг. 55

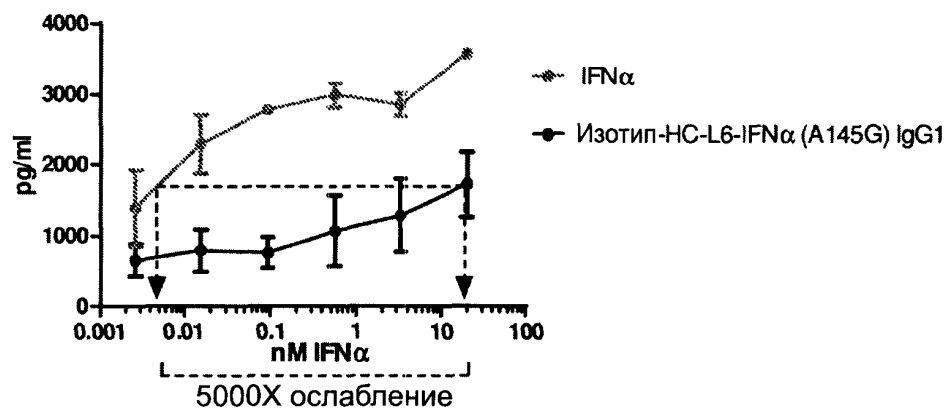


Фиг. 56

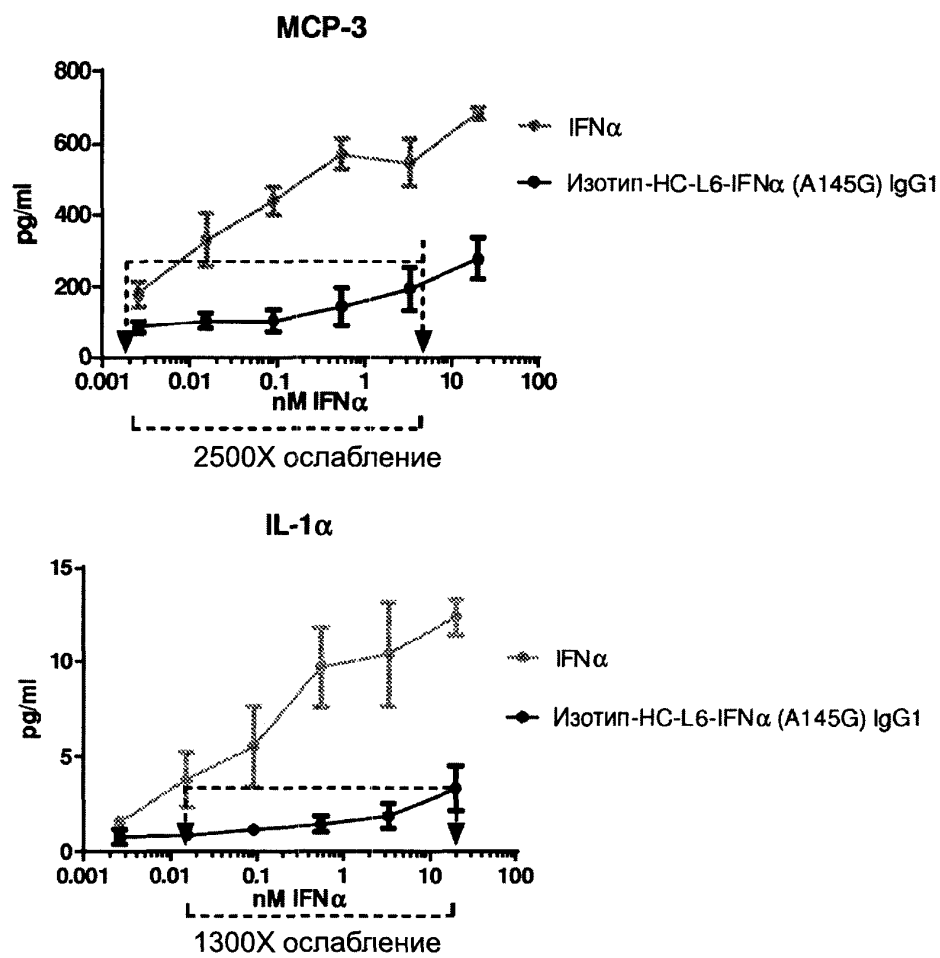
IP-10



MCP-1



Фиг. 57А



Фиг. 57В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2