

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292099 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.23

(51) Int. Cl. C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.02.11

(54) GM-CSF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) PCT/CN2020/074834

(32) 2020.02.12

(33) CN

(86) PCT/US2021/017684

(87) WO 2021/163346 2021.08.19

(88) 2021.09.23

(71) Заявитель:
ДЗЕ СКРИППС РИСЕРЧ
ИНСТИТЪЮТ (US)

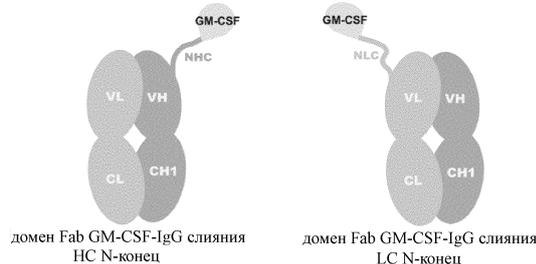
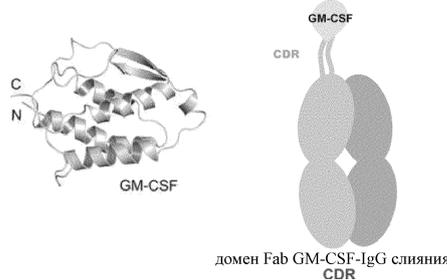
(72) Изобретатель:

Джозеф Шон, Лэй Лэй, Шэнь
Вэйцзюнь, Ван Фэн, Шульц Питер
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении раскрыты пептиды гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и композиции, содержащие пептиды GM-CSF. Эти молекулы полезны для лечения неврологических заболеваний или состояний.



A1

202292099

202292099

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576048EA/032

GM-CSF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

Ссылка на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с международной заявкой PCT/CN2020/074834, поданной 12 февраля 2020 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Болезнь Паркинсона (PD) представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, связанное со значительной заболеваемостью, повышенной смертностью и особенно высокими экономическими затратами.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Прогрессирование болезни Паркинсона (PD) и других нейродегенеративных состояний связано с воспалением. На доклинической стадии терапия на основе GM-CSF модулирует врожденный микроглиальный иммунитет и повышает регуляторные T-клетки (T_{reg}), которые мигрируют из периферии в головной мозг, что приводит к противовоспалительным и нейропротективным ответами. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к молекулам GM-CSF для лечения нейродегенеративных состояний и/или состояний, связанных с воспалением. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулу GM-CSF согласно настоящему изобретению применяют для лечения одного или нескольких из болезни Паркинсона (PD), латерального амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера (AD), острого лучевого синдрома, травматического повреждения мозга, рака и болезни Крона (CD).

GM-CSF демонстрирует ограниченную биодоступность и короткий период полувыведения, так что терапевтические пептиды GM-CSF требуют высоких доз и ежедневного введения. При ежедневном лечении GM-CSF наблюдались побочные эффекты легкой и средней степени тяжести, включая реакции в месте инъекции, повышение количества лейкоцитов и боль в костях. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к молекулам GM-CSF длительного действия, содержащим GM-CSF, соединенный с каркасом для увеличения периода полувыведения GM-CSF. Иллюстративные каркасы содержат вариабельный домен антитела. Кроме того, различные молекулы GM-CSF длительного действия согласно настоящему изобретению обладают повышенной биодоступностью GM-CSF по сравнению с пептидом GM-CSF отдельно. Различные молекулы GM-CSF длительного действия согласно настоящему изобретению можно вводить с частотой от приблизительно один раз каждые 7 дней до приблизительно один раз в месяц, например, с частотой приблизительно один раз каждые две недели.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей первый полипептид, содержащий гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), и второй полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере 98% идентичную последовательности согласно

SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 77. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF содержит человеческий GM-CSF или мышинный GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит модифицированную легкую цепь вариабельной области антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированная легкая цепь вариабельного домена антитела содержит GM-CSF, расположенный между первой аминокислотной последовательностью вариабельной области антитела и второй аминокислотной последовательностью вариабельной области антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления первая аминокислотная последовательность содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 14. Согласно некоторым вариантам осуществления первая аминокислотная последовательность содержит SEQ ID NO: 14. Согласно некоторым вариантам осуществления вторая аминокислотная последовательность содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 15. Согласно некоторым вариантам осуществления вторая аминокислотная последовательность содержит SEQ ID NO: 15. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF расположен в определяющей комплементарности области (CDR) модифицированной легкой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF расположен в CDR1, CDR2 или CDR3 легкой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF расположен в CDR3 легкой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированная легкая цепь модифицирована на основе вариабельной легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид дополнительно содержит первый линкерный пептид. Согласно некоторым вариантам осуществления первый линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 10. Согласно некоторым вариантам осуществления первый линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 8. Согласно некоторым вариантам осуществления первый линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 11. Согласно некоторым вариантам осуществления первый линкерный пептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 12. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид дополнительно содержит второй линкерный пептид. Согласно некоторым вариантам осуществления второй линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 10. Согласно некоторым вариантам осуществления второй

линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 9. Согласно некоторым вариантам осуществления второй линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 11. Согласно некоторым вариантам осуществления второй линкерный пептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 13. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 18. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 6. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит тяжелую цепь вариабельной области антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид и второй полипептид соединены через одну или несколько дисульфидных связей. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид и второй полипептид образуют вариабельный домен антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления вариабельный домен антитела не связывается с антигеном с равновесной константой диссоциации (KD) ниже приблизительно 10⁻² М, 10⁻³ М или 10⁻⁴ М. Согласно некоторым вариантам осуществления вариабельный домен антитела содержит модифицированный вариабельный домен паливизумаба. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный вариабельный домен паливизумаба содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 19. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный вариабельный домен паливизумаба содержит CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный вариабельный домен паливизумаба содержит CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный вариабельный домен

паливизумаба содержит CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 22. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный переменный домен паливизумаба содержит CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный переменный домен паливизумаба содержит CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 24, 77 или 16. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный переменный домен паливизумаба не связывается с респираторно-синцитиальным вирусом (RSV) с KD ниже приблизительно 10⁻² M, 10⁻³ M или 10⁻⁴ M. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция дополнительно содержит область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или первый полипептид содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей переменный домен антитела, содержащий последовательность легкой цепи, содержащую первый полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 6, и последовательность тяжелой цепи, содержащую второй полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 6. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция содержит GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF представляет собой человеческий GM-CSF или мышинный GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 77. Согласно некоторым вариантам осуществления легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым вариантам осуществления легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция дополнительно содержит область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или тяжелая цепь содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей вариабельный домен антитела, содержащий последовательность легкой цепи, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 26 (DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVP SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCFQGS[X1]PFTFGGGTKLEIKR), где последовательность легкой цепи содержит X1, и X1 содержит GM-CSF, и последовательность тяжелой цепи, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF представляет собой человеческий GM-CSF или мышиный GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16. Согласно некоторым вариантам

осуществления GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 77. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность легкой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 26. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность легкой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 27 (DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLAGSVP SRFGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCFQGSQGGSGAKLAALKAKLAALKGGGGG[X2] GGGGSELALEAELAAGGSGPFTFGGGTKLEIKR), где последовательность легкой цепи содержит X2, и X2 содержит GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность тяжелой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым вариантам осуществления легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция дополнительно содержит область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или тяжелая цепь содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 18. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности согласно SEQ ID NO: 18. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность соединена с доменом антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления домен антитела представляет собой переменный домен антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность расположена в домене антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность расположена в CDR переменного домена антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность расположена в CDR модифицированного переменного домена антитела трастузумаб. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность расположена в CDR модифицированного переменного домена антитела паливизумаб. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция содержит область, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 42, где область содержит X5, и X5 содержит последовательность. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция дополнительно содержит область, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция содержит область, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 43, где область содержит X6, и X6 содержит последовательность. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция дополнительно содержит область, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция дополнительно содержит область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Согласно некоторым вариантам осуществления область Fc содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или область Fc содержит IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей первый полипептид, содержащий SEQ ID NO: 22, 23 и 16, и второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 19-21. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей первый полипептид, содержащий SEQ ID NO: 22, 23 и 77, и второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 19-21. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид представляет собой легкую цепь переменного домена антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид представляет собой тяжелую цепь переменного домена антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит SEQ ID NO: 24. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция дополнительно содержит область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или второй полипептид содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей первый полипептид, содержащий SEQ ID NO: 37-39, и второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 34, 35, 16. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей первый полипептид, содержащий SEQ ID NO: 37-39, и второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 34, 35, 77. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид представляет собой легкую цепь переменного домена антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид представляет собой тяжелую цепь переменного домена антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит SEQ ID NO: 36. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция дополнительно содержит область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3,

и/или второй полипептид содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей первый полипептид, содержащий SEQ ID NO: 31, и второй полипептид, содержащий гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 77. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF содержит человеческий GM-CSF или мышинный GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит модифицированную тяжелую цепь переменной области антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированная тяжелая цепь переменной домена антитела содержит GM-CSF, расположенный между первой аминокислотной последовательностью переменной области антитела и второй аминокислотной последовательностью переменной области антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления первая аминокислотная последовательность содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 32. Согласно некоторым вариантам осуществления первая аминокислотная последовательность содержит SEQ ID NO: 32. Согласно некоторым вариантам осуществления вторая аминокислотная последовательность содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 33. Согласно некоторым вариантам осуществления вторая аминокислотная последовательность содержит SEQ ID NO: 33. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF расположен в определяющей комплементарности области (CDR) модифицированной тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF расположен в CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF расположен в CDR3 тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированная тяжелая цепь модифицирована на основе переменной тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 44. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид дополнительно содержит первый линкерный пептид. Согласно некоторым вариантам осуществления первый линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 10. Согласно некоторым вариантам осуществления первый линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 8. Согласно некоторым вариантам осуществления первый линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 11. Согласно некоторым вариантам осуществления первый линкерный пептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 12. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид дополнительно содержит второй линкерный пептид. Согласно некоторым вариантам осуществления второй линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 10. Согласно некоторым вариантам осуществления второй линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 9. Согласно некоторым вариантам осуществления второй линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 11. Согласно некоторым вариантам осуществления второй линкерный пептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 13. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 18. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит легкую цепь варибельной области антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит SEQ ID NO: 31. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид и второй полипептид соединены через одну или несколько дисульфидных связей. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид и второй полипептид образуют варибельный домен антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления варибельный домен антитела не связывается с антигеном с равновесной константой диссоциации (KD) ниже приблизительно 10^{-2} М, 10^{-3} М или 10^{-4} М. Согласно некоторым вариантам осуществления варибельный домен антитела содержит модифицированный варибельный домен трастузумаба. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный варибельный домен трастузумаба содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 34. Согласно некоторым вариантам осуществления

модифицированный переменный домен тростумаба содержит CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 35. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный переменный домен тростумаба содержит CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 36, 77 или 16. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный переменный домен тростумаба содержит CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 37. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный переменный домен тростумаба содержит CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный переменный домен тростумаба содержит CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный переменный домен тростумаба не связывается с человеческим рецептором эпидермального фактора роста 2 (Her2) с KD ниже приблизительно 10-2 М, 10-3 М или 10-4 М. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция дополнительно содержит область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или второй полипептид содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей переменный домен антитела, содержащий последовательность легкой цепи, содержащую первый полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31, и последовательность тяжелой цепи, содержащую второй полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция содержит GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF представляет собой человеческий GM-CSF или мышинный GM-

CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 77. Согласно некоторым вариантам осуществления легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым вариантам осуществления легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция дополнительно содержит область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или тяжелая цепь содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей переменный домен антитела, содержащий последовательность тяжелой цепи, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 42 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR[[X5]]WGQGLTVTVSS), где последовательность тяжелой цепи содержит X6, и X6 содержит GM-CSF, и последовательность легкой цепи, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31. Согласно

некоторым вариантам осуществления GM-CSF представляет собой человеческий GM-CSF или мышиный GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16. Согласно некоторым вариантам осуществления GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 77. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность тяжелой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 42. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность тяжелой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 43 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGSGAKLAALKAKLAAL KGGGGS[[X6]]GGGGSELALEAELAALAEAGGSGDYWGQGLTVTVSS), где последовательность тяжелой цепи содержит X6, и X6 содержит GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность тяжелой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 43. Согласно некоторым вариантам осуществления легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция дополнительно содержит область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Согласно некоторым вариантам осуществления пониженная эффекторная функция содержит пониженную

комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или тяжелая цепь содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способам применения, в которых любую из композиций согласно настоящему изобретению применяют для лечения неврологического заболевания или состояния. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения неврологического заболевания или состояния, предусматривающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, любой из композиций, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления неврологическое заболевание или состояние содержит болезнь Паркинсона. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения болезни Альцгеймера, предусматривающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, любой из композиций, описанных в настоящем документе. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения травматического повреждения мозга, предусматривающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, любой из композиций, описанных в настоящем документе. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения латерального амиотрофического склероза (ALS), предусматривающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, любой из композиций, описанных в настоящем документе. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения острого лучевого синдрома, предусматривающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, любой из композиций, описанных в настоящем документе. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения рака, предусматривающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, любой из композиций, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят один раз каждые приблизительно 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 дней в ходе периода лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят один раз каждые приблизительно 14 дней в ходе периода лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят один раз каждые приблизительно 2 недели в ходе периода лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят один раз каждые приблизительно 3 недели в ходе периода лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят один раз каждые приблизительно 4 недели в ходе периода лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят приблизительно один раз в месяц в ходе периода лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления период лечения составляет от приблизительно 8 недель до приблизительно 2 лет.

Краткое описание чертежей

Предшествующее краткое раскрытие, а также последующее подробное раскрытие настоящего изобретения будут лучше понятны при изучении вместе с приложенными чертежами. Однако раскрытие не ограничивается показанными точными примерами, и в соответствии с общепринятой практикой различные элементы чертежей не представлены в масштабе. В некоторых случаях размеры различных элементов произвольно увеличены или уменьшены для ясности. Чертежи включают следующее.

Фиг. 1A-L: обработка Нег-mGMCSF CDR влияет на популяции Т-клеток в периферической крови и селезенке. Количественное определение уровней CD8⁺ (**фиг. 1A**), уровней CD4⁺ (**фиг. 1B**) и уровней CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регуляторных Т-клеток (T_{reg}) (**фиг. 1C**) в периферической крови мышей, обработанных возрастающими дозами Нег-mGMCSF CDR. Определяли различия в средних значениях (\pm SEM, n=5), когда $p < 0,05$, по сравнению с обработкой (a) 0 мг/кг, (b) 0,3 мг/кг, (c) 1,0 мг/кг, (d) 3,0 мг/кг или (e) 10,0 мг/кг. Количественное определение уровней CD8⁺ (**фиг. 1D**), уровней CD4⁺ (**фиг. 1E**) и уровней CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T_{reg} (**фиг. 1F**) в периферической крови мышей, обработанных возрастающими дозами rGM-CSF. Количественное определение уровней CD8⁺ (**фиг. 1G**), уровней CD4⁺ (**фиг. 1H**) и уровней CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T_{reg} (**фиг. 1I**) в селезенке, выделенной у мышей, обработанных возрастающими дозами Нег-mGMCSF CDR. Определяли различия в средних значениях (\pm SEM, n=5), когда $p < 0,05$, по сравнению с обработкой (a) 0 мг/кг, (b) 0,3 мг/кг, (c) 1,0 мг/кг и (d) 3,0 мг/кг. Количественное определение уровней CD8⁺ (**фиг. 1J**), уровней CD4⁺ (**фиг. 1K**) и уровней CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T_{reg} (**фиг. 1L**) в селезенке, выделенной у мышей, обработанных возрастающими дозами rGM-CSF. Определяли различия в средних значениях (\pm SEM, n=5), когда $p < 0,05$, по сравнению с обработкой (a) 0 мг/кг, (b) 0,01 мг/кг, (c) 0,03 мг/кг, или (d) 0,10 мг/кг rGM-CSF. Обработка как Нег-mGMCSF CDR, так и rGM-CSF привела к значительному зависимому от дозы увеличению уровней T_{reg} в селезенке. Результаты линейного регрессионного анализа представлены на графиках (**фиг. 1I**) и (**фиг. 1L**).

Фиг. 2: Обработка Нег-mGMCSF CDR снижает нейровоспалительную реакцию, наблюдаемую после интоксикации МРТР. Количественная оценка реактивных микроглий в черной субстанции через два дня после интоксикации МРТР. Различия в средних значениях (\pm SEM, n=5) определяли, когда $p < 0,05$, по сравнению с (a) PBS или (b) обработкой МРТР.

Фиг. 3: Обработка Нег-mGMCSF CDR сохраняет дофаминергические нейроны после интоксикации МРТР. Стереологический количественный анализ общего числа выживших дофаминергических (TH⁺/Nissl⁺) и недофаминергических (TH⁻/Nissl⁺) нейронов в черной субстанции после интоксикации МРТР. Различия в средних значениях (\pm SEM, n=7) определяли, когда $p < 0,05$, по сравнению с группами, получавшими (a) PBS или (b) МРТР. Средний процент оставшегося общего числа нейронов указан на каждой полосе обработки.

Фиг. 4: Обработка Нег-mGMCSF CDR ослабляет потерю окончаний полосатого тела. Денситометрический анализ окончаний TH⁺ в полосатом теле после интоксикации

МРТР. Группы лечения нормализованы по контрольной плотности PBS. Различия в средних значениях (\pm SEM, n=7) определяли, когда $p < 0,05$, по сравнению с группами, получавшими (a) PBS или (b) МРТР.

Фиг. 5А-В: Обработка Her-mGMCSF CDR показывает противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства длительного действия. **Фиг. 5А:** Количественное определение реактивных микроглий (mac-1+) в черной субстанции через два дня после интоксикации МРТР. Различия в средних значениях (\pm SEM, n=5) определяли, когда $p < 0,05$, по сравнению с обработкой (a) PBS или (b) МРТР. **Фиг. 5В:** Стереологический количественный анализ общего числа выживших дофаминергических (TH+/Nissl+) и недофаминергических (TH-/Nissl+) нейронов в черной субстанции через семь дней после интоксикации МРТР. Определяли различия в средних значениях (\pm SEM, n=5), когда $p < 0,05$, по сравнению с группами, получавшими (a) PBS, (b) МРТР, (c) День -15 Her-mGMCSF CDR+МРТР и (d) День -10 Her-mGMCSF CDR+МРТР.

Фиг. 6А-В: Эффективность молекул GM-CSF длительного действия Syn hGMCSF CDRL3, NhGM Syn HC и NhGM Syn LC (**фиг. 6А**) и Her hGMCSF CDR (**фиг. 6В**), в анализах пролиферации TF-1.

Фиг. 7: Схема Fab-доменов различных молекул GM-CSF длительного действия, где GM-CSF расположен при amino-конце или CDR каркаса IgG.

[001] **Фиг. 8А-В:** молекулы GM-CSF Syn-hGMCSF CDR, Her-hGMCSF CDR, Syn-mGMCSF CDR и Syn-mGMCSF NT (HC слияние) демонстрируют увеличенный период полувыведения по сравнению с рекомбинантным GM-CSF в плазме крыс и мышей, соответственно. **Фиг. 8А** показывает концентрации Syn-hGMCSF CDR и Her-hGMCSF CDR в плазме крыс со временем. **Фиг. 8В** показывает концентрации Syn-mGMCSF CDR и Syn-mGMCSF NT (N-концевого HC слияния) в плазме мышей со временем.

[002] **Фиг. 9:** Субхроническое лечение посредством Syn mGMCSF CDR значительно повышает увеличение T_{reg} у мышей.

[003] **Фиг. 10:** GM-CSF длительного действия, Her-hGMCSF CDR, повышал увеличение T_{reg} в течение до 14 дней.

[004] **Фиг. 11:** Фармакокинетические и фармакодинамические исследования на яванских макаках. CDR Her-hGMCSF повышает циркулирующие T_{reg} зависимым от дозы образом.

Фиг. 12: GM-CSF длительного действия активно транспортируется в головной мозг мышей.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

В настоящем документе описаны молекулы GM-CSF и композиции, содержащие молекулы GM-CSF. Иллюстративные молекулы содержат пептид GM-CSF, соединенный с каркасом, который увеличивает период полувыведения пептида GM-CSF до значения, превышающего период полувыведения GM-CSF отдельно. Такие молекулы могут быть указаны как молекулы GM-CSF длительного действия. Иллюстративные каркасы для увеличения периода полувыведения GM-CSF включают переменные домены антител,

где GM-CSF соединен необязательно через один или несколько линкеров с переменным доменом антитела. В некоторых случаях переменный домен антитела обладает пониженным или не обладает связыванием антигена. Уменьшение связывания антигена может быть вызвано модификацией определяющей комплементарности области (CDR) переменного домена антитела. Модификация может включать вставку пептида GM-CSF и/или мутацию, добавление или делецию одной или нескольких аминокислот CDRD. Каркасы антител могут также содержать фрагмент кристаллизуемой области (Fc), который проявляет пониженную эффекторную функцию, такую как пониженная антителозависимая цитотоксичность (ADCC) и/или пониженная комплементзависимую цитотоксичность (CDC) по сравнению с каркасом антител, содержащим Fc-область IgG1 дикого типа.

Различные молекулы GM-CSF, описанные в настоящем документе, увеличивают число и/или функцию T_{reg} , что может быть полезным при болезни Паркинсона (PD) и/или других нейродегенеративных и нейровоспалительных заболеваниях. Например, как показано в примерах в настоящем документе, лечение GM-CSF длительного действия приводило к зависимому от дозы увеличению числа T_{reg} после однократной инъекции, что приводило к увеличению клеточной функции в периферической крови и селезенке выше значений, наблюдаемых при применении рекомбинантного GM-CSF (rGM-CSF) отдельно. Кроме того, T_{reg} , выделенные у мышей, обработанных с GM-CSF длительного действия, проявляли повышенный антипролиферативный эффект и были способны подавлять пролиферацию T_{resp} в большей степени, чем T_{reg} , выделенные у мышей, обработанных rGM-CSF. Клинически модификация больных популяций T_{reg} была протестирована как при ALS, так и при PD. У пациентов с ALS наблюдается дисфункция T_{reg} , которая коррелирует с тяжестью заболевания и выживаемостью. Однако, если больные T_{reg} выделяют и стимулируют *ex vivo*, супрессорная функция восстанавливается, что указывает на потенциальную терапевтическую мишень. Различные молекулы GM-CSF, описанные в настоящем документе, также проявляют нейропротекторные свойства. Как показано в примерах, однократная доза GM-CSF длительного действия оказывала нейропротекторное действие на мышечной модели MPTP.

При описании способов и композиций согласно настоящему изобретению следует понимать, что настоящее раскрытие не ограничивается конкретным описанным способом или композицией. Используемая терминология предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего раскрытия ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Примеры приводятся для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники раскрытие и описание путей получения и применения композиций и способов согласно настоящему изобретению, и они не предназначены для ограничения объема изобретения авторов, и не являются единственными проведенными экспериментами. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные

ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой средневесовую молекулярную массу, температура выражается в градусах Цельсия, а давление равно атмосферному или близко к нему.

Если указан диапазон значений, подразумевается, если из контекста явно не следует иное, что также конкретно раскрывается каждое промежуточное значение с точностью до десятой доли единицы нижнего предела между верхним и нижним пределами этого диапазона. Каждый меньший диапазон между любым установленным значением или промежуточным значением в указанном диапазоне и любым другим установленным или промежуточным значением в указанном диапазоне охватывается настоящим изобретением. Верхние и нижние пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в диапазон или исключены из него, и каждый диапазон, в котором любой из этих пределов, ни один из них или оба предела включены в меньшие диапазоны, также охватывается настоящим изобретением с учетом любого специально исключенного предела в заявленный диапазон. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включены в настоящее изобретение.

Используемые в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Например, ссылка на «клетка» включает образец таких клеток, а ссылка на «пептид» включает ссылку на один или несколько пептидов и их эквиваленты, например, полипептиды, известные специалистам в данной области, и так далее.

Термины «определяющая комплементарность область» и «CDR», которые являются синонимами «гипервариабельной области» или «HVR», известны в данной области техники и относятся к несмежным последовательностям аминокислот в вариабельных областях антител, которые придают антигенную специфичность и/или аффинность связывания. Обычно присутствуют три CDR в каждой вариабельной области тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2, CDRH3) и три CDR в каждой вариабельной области легкой цепи (CDRL1, CDRL2, CDRL3). Согласно некоторым вариантам осуществления каркас антитела в молекуле GM-CSF, раскрытой в настоящем документе, содержит одну или несколько аминокислотных мутаций, добавлений и/или делеций в одной или нескольких CDR, так что CDR обладают пониженным или не обладают связыванием антигена. Такие модифицированные каркасы антител могут по-прежнему считаться содержащими шесть CDR (CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, CDRL3) без требования связывания антигена, где CDR расположены между каркасными областями антитела (например, тяжелая цепь содержит FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4, и легкая цепь содержит FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4). Согласно некоторым вариантам осуществления CDR содержит GM-CSF, где GM-CSF заменил одну или несколько аминокислот CDR. «Каркасные области» и «FR», как известно в данной

области техники, относятся к не-CDR частям переменных областей тяжелой и легкой цепей. В общем, присутствуют четыре FR в каждой полноразмерной переменной области тяжелой цепи (FRH1, FRH2, FRH3 и FRH4) и четыре FR в каждой полноразмерной переменной области легкой цепи (FRL1, FRL2, FRL3 и FRL4). Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR или FR можно легко определить с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая схемы, описанные Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest,» 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации «Kabat»), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (схема нумерации «Chothia»), MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), «Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography,» J. Mol. Biol. 262, 732-745.» (схема нумерации «Contact»), Lefranc MP et al., «IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,» Dev Comp Immunol, 2003 Jan,27(1):55-77 (схема нумерации «IMGT»), Honegger A and Plückthun A, «Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool,» J Mol Biol, 2001 Jun 8,309(3):657-70, (схема нумерации «Aho»), и Whitelegg NR and Rees AR, «WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB,» Protein Eng. 2000 Dec,13(12):819-24 (схема нумерации «AbM»). Согласно определенным вариантам осуществления CDR антител, описанные в настоящем документе, могут быть определены способом, выбранным из Kabat, Chothia, IMGT, Aho, AbM или их комбинации.

Процент (%) идентичности последовательности по отношению к последовательности эталонного полипептида представляет собой процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной последовательности полипептида, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности и отсутствия учета каких-либо консервативных замен как части последовательности идентичности. Выравнивание для целей определения процентной идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными известными способами, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Можно определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине последовательностей, подлежащих сравнению. Однако для целей настоящего изобретения значения % идентичности аминокислотной последовательности получают с использованием компьютерной программы сравнения последовательностей BLAST от NCBI.

Пептиды GM-CSF

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к молекулам GM-CSF, содержащим пептиды GM-CSF, как например, человеческий, бычий, крысиный и/или

мышинный GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления пептид GM-CSF содержит аминокислотную последовательность, идентичную или на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16. Молекулы GM-CSF длительного действия согласно настоящему изобретению могут содержать пептид GM-CSF, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную или на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16. Молекулы GM-CSF длительного действия согласно настоящему изобретению могут содержать вариант пептида GM-CSF, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных добавлений, делеций или замен по сравнению с GM-CSF, содержащим SEQ ID NO: 16. Согласно некоторым вариантам осуществления пептид GM-CSF содержит аминокислотную последовательность, идентичную или на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 77. Молекулы GM-CSF длительного действия согласно настоящему изобретению могут содержать пептид GM-CSF, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную или на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 77. Молекулы GM-CSF длительного действия согласно настоящему изобретению могут содержать вариант пептида GM-CSF, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных добавлений, делеций или замен по сравнению с GM-CSF, содержащим SEQ ID NO: 77. Такие варианты пептида GM-CSF включают варианты, имеющие одну или несколько консервативных аминокислотных замен. Консервативная замена может включать замену, обнаруживаемую в одной из следующих групп консервативных замен: группа 1: аланин (Ala, A), глицин (Gly, G), серин (Ser, S), треонин (Thr, T), группа 2: аспарагиновая кислота (Asp, D), глутаминовая кислота (Glu, E), группа 3: аспарагин (Asn, N), глутамин (Gln, Q), группа 4: аргинин (Arg, R), лизин (Lys, K), гистидин (His, H), группа 5: изолейцин (Ile, I), лейцин (Leu, L), метионин (Met, M), валин (Val, V) и группа 6: фенилаланин (Phe, F), тирозин (Tyr, Y), триптофан (Trp, W). Кроме того, аминокислоты могут быть сгруппированы в группы консервативных замен по сходной функции, химической структуре или составу. Например, алифатическая группа может включать в целях замены Gly, Ala, Val, Leu и Ile. Другие группы, включающие аминокислоты, которые рассматриваются как консервативные замены друг друга, могут включать: серосодержащие Met и Cys, кислотные Asp, Glu и Asn, малые алифатические, неполярные или слабополярные остатки Ala, Ser, Thr, Pro, и Gly, полярные отрицательно заряженные остатки и их амиды: Asp, Asn и Glu, полярные положительно заряженные остатки His, Arg и Lys, большие

алифатические, неполярные остатки Met, Leu, Ile, Val и Cys, и большие ароматические остатки Phe, Tyr и Trp.

Молекулы GM-CSF длительного действия

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к молекулам GM-CSF, соединенным с каркасом для повышения периода полувыведения пептида GM-CSF, иногда упоминаемым как молекулы GM-CSF длительного действия. Неограничивающий пример каркаса включает переменный домен антитела. Каркас может содержать переменные области тяжелой (VH) и/или легкой цепи (VL), и/или одну или несколько константных областей полноразмерного антитела. Таким образом, в контексте настоящего изобретения каркас, содержащий переменный домен антитела, включает Fab, полноразмерное антитело и любые другие антитела, содержащие переменный домен антитела. Пептид GM-CSF не обязательно должен быть связан непосредственно с антителом и может быть связан через одну или несколько линкерных молекул. В некоторых случаях GM-CSF располагается на конце тяжелой или легкой цепи антитела. В некоторых случаях GM-CSF располагается внутри и/или заменяет одну или несколько аминокислот CDR переменного домена антитела. В некоторых случаях GM-CSF расположен между двумя аминокислотами CDR, GM-CSF расположен между антителом и первой аминокислотой CDR, GM-CSF расположен между антителом и последней аминокислотой CDR, и/или GM-CSF заменяет часть или всю CDR и, таким образом, располагается там, где ранее существовала CDR. В некоторых случаях молекула GM-CSF содержит первую часть антитела, пептид GM-CSF и вторую часть антитела. Например, первая часть антитела содержит одну или несколько каркасных областей и, если применимо, любые другие CDR, N-концевые по отношению к CDR, где расположен GM-CSF, а вторая часть антитела содержит одну или несколько каркасных областей и/или области Fc, и, если применимо, любые другие CDR, C-концевые по отношению к CDR, где расположен GM-CSF. Каждая из первой и второй частей антитела может независимо иметь длину, выбранную из: по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 25, по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 35, по меньшей мере приблизительно 40, по меньшей мере приблизительно 45 или по меньшей мере приблизительно 50 аминокислот. Для каркаса паливизумаба первая часть антитела может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 14. Для каркаса паливизумаба вторая часть антитела может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 15. Для каркаса трастузумаба первая часть антитела может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 32. Для каркаса трастузумаба вторая часть антитела может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95%,

96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 33. В некоторых случаях расположение внутри CDR указывает на то, что никакие аминокислоты CDR не удалены. В некоторых случаях расположение внутри CDR указывает на то, что по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или вся CDR заменена пептидом GM-CSF. В некоторых случаях CDR антитела содержит последовательность пептида GM-CSF. Например, CDR3 тяжелой или легкой цепи содержит последовательность пептида GM-CSF.

В различных молекулах GM-CSF пептид GM-CSF соединен с каркасом одним или несколькими линкерами. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит последовательность, сконфигурированную для образования альфа-спирали. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит последовательность, сконфигурированную таким образом, что она не имеет регулярной вторичной структуры (например, отсутствие альфа-спирали, спираль 3-10, бета-цепь, бета-виток). Неограничивающие иллюстративные линкеры могут содержать одну или несколько SEQ ID NO: 8-13.

Обсуждаемые в настоящем документе соединения могут включать пептидные связи, и как таковые молекулы GM-CSF могут быть получены из генетической конструкции, содержащей ДНК, кодирующую слитые молекулы GM-CSF. В контексте настоящего изобретения «расположен внутри» и «вставлен» могут указывать на расположение пептида GM-CSF в полипептиде, содержащем как пептид GM-CSF, так и каркас, и, как таковые, могут не указывать на способ, в котором получают молекулу GM-CSF. Например, «вставлен» не обязательно ограничивает молекулы молекулами, полученными путем модификации ДНК, кодирующей каркас, путем вставки ДНК, кодирующей пептид GM-CSF, но может также или альтернативно указывать, что ДНК, кодирующая каркас и пептид GM-CSF, является синтезированной *de novo*.

В различных молекулах GM-CSF пептид GM-CSF соединен с каркасом, содержащим переменный домен антитела. Переменный домен антитела может содержать первый полипептид и второй полипептид, где первый или второй полипептид содержит или иным образом соединен с GM-CSF. В некоторых случаях первый полипептид содержит легкую цепь переменного домена антитела и второй полипептид содержит переменный домен тяжелой цепи. В некоторых случаях первый полипептид содержит тяжелую цепь переменного домена антитела и второй полипептид содержит переменный домен легкой цепи. Неограничивающие иллюстративные переменные домены антитела включают переменный домен трастузумаба или паливизумаба, который может быть модифицирован с соединением с пептидом GM-CSF. Переменный домен трастузумаба или паливизумаба может иметь модификацию, которая снижает связывание антигена по сравнению с немодифицированным трастузумабом или паливизумабом (например, немодифицированные антитела Herceptin, Synagis, соответственно). В некоторых случаях пептид GM-CSF соединен с аминоконцом легкой цепи или тяжелой цепи. В некоторых случаях пептид GM-CSF находится в легкой цепи

или тяжелой цепи. Например, пептид GM-CSF расположен в CDR легкой цепи или тяжелой цепи. В качестве еще одного неограничивающего примера пептид GM-CSF расположен в CDR3 легкой цепи или тяжелой цепи.

Согласно некоторым вариантам осуществления каркас содержит область Fc антитела, имеющую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека (SEQ ID NO: 25). Пониженная эффекторная функция может содержать пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). В некоторых случаях каркас содержит последовательность Fc, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3. В некоторых случаях каркас содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 6. В некоторых случаях первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к молекуле GM-CSF, содержащей вариabельный домен антитела, содержащий последовательность легкой цепи, содержащую первый полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 6, и последовательность тяжелой цепи, содержащую второй полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2.

Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 30. В некоторых случаях первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29. В некоторых случаях второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 28. В некоторых случаях второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к молекуле GM-CSF, содержащей вариабельный домен антитела, содержащий последовательность легкой цепи, содержащую первый полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31, и последовательность тяжелой цепи, содержащую второй полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29.

В различных молекулах GM-CSF пептид GM-CSF соединен с каркасом, содержащим вариабельный домен антитела, содержащий последовательность легкой цепи, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 26 (DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVP SRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCFQGS[X1]PFTFGGGTKLEIKR), где последовательность легкой цепи содержит X1, и X1 содержит GM-CSF, и последовательность тяжелой цепи, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2. GM-CSF может быть человеческим, бычьим или мышинным GM-CSF. GM-CSF может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16. GM-CSF может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 77. GM-CSF может включать вариант или

гомолог GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность легкой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 26. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность легкой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 27 (DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKSLASGVP SRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCFQSGSGGSAKLAALKAKLAALKGGGGGS[X2] GGGGSELALEAELAAGGSGPFTFGGGTKLEIKR), где последовательность легкой цепи содержит X2, и X2 содержит GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность тяжелой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым вариантам осуществления легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула GM-CSF дополнительно содержит область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека (SEQ ID NO: 25). Пониженная эффекторная функция может содержать пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Область Fc может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3. В некоторых случаях область Fc содержит IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

В различных молекулах GM-CSF пептид GM-CSF соединен с каркасом, содержащим вариабельный домен антитела, содержащий последовательность тяжелой цепи, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 42 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT

RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR[[X5]]WGQGLTVTVSS), где последовательность тяжелой цепи содержит X6, и X6 содержит пептид GM-CSF, и последовательность легкой цепи, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31. GM-CSF может быть человеческим, бычьим или мышинным GM-CSF. GM-CSF может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16. GM-CSF может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 77. GM-CSF может включать вариант или гомолог GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность тяжелой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 42. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность тяжелой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 43 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGSGAKLAALKAKLAAL KGGGGS[[X6]]GGGGSELALEAELAAGGSGDYWGQGLTVTVSS), где последовательность тяжелой цепи содержит X6, и X6 содержит GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность тяжелой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 43. Согласно некоторым вариантам осуществления легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула GM-CSF дополнительно содержит область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека (SEQ ID

NO: 25). Пониженная эффекторная функция может содержать пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Область Fc может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3. В некоторых случаях область Fc содержит IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к молекулам GM-CSF, содержащим первый линкер, пептид GM-CSF и второй линкер. В неограничивающих примерах пептид GM-CSF может быть человеческим, бычьим, крысиным или мышинным. Например, GM-CSF может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16. GM-CSF может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 77. В некоторых случаях пептид GM-CSF содержит гомолог или вариант GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления первый линкер содержит первый пептид, сконфигурированный для образования альфа-спирали. Образование альфа-спирали можно предсказать на основе анализа первичной структуры с использованием доступных биоинформационных инструментов, легко доступных в данной области техники. Согласно некоторым вариантам осуществления второй линкер содержит второй пептид, сконфигурированный для образования альфа-спирали. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула GM-CSF содержит первый и второй пептиды, которые сконфигурированы так, чтобы образовывать суперспираль. Суперспираль может быть встречно-параллельной суперспиралью. Первый пептид может содержать последовательность, не имеющую или имеющую менее приблизительно 2, 3 или 4 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 8. Второй пептид может содержать последовательность, не имеющую или имеющую менее приблизительно 2, 3 или 4 аминокислотных замены или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 9. Согласно некоторым вариантам осуществления первый линкер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот (и до приблизительно 30 аминокислот), где аминокислотная последовательность не содержит регулярную вторичную структуру (например, альфа-спираль, бета-цепь, спираль 310, бета-виток) и/или представляет собой гибкий линкер. Согласно некоторым вариантам осуществления второй линкер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот (и до приблизительно 30 аминокислот), где аминокислотная последовательность не содержит регулярную вторичную структуру (например, альфа-спираль, бета-цепь, спираль 310, бета-виток) и/или представляет собой гибкий линкер. Первый линкер может содержать последовательность, не имеющую или имеющую 1 или 2

аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 10. Первый линкер может содержать последовательность, не имеющую или имеющую 1 или 2 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 11. Второй линкер может содержать последовательность, не имеющую или имеющую 1 или 2 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 10. Второй линкер может содержать последовательность, не имеющую или имеющую 1 или 2 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 11. Первый линкер может содержать последовательность, не имеющую или имеющую 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 12. Второй линкер может содержать последовательность, не имеющую или имеющую 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 13. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 18.

Согласно некоторым вариантам осуществления молекулы GM-CSF, содержащие первый линкер, пептид GM-CSF и второй линкер (в некоторых случаях упоминается как вставка GM-CSF) соединены с переменным доменом антитела. Вставка GM-CSF может быть расположена между первой последовательностью переменного домена антитела (например, каркас 1 тяжелой или легкой цепи) и второй последовательностью переменного домена антитела (например, каркас 4 тяжелой или легкой цепи, соответственно). Первая последовательность переменного домена антитела может содержать последовательность, не имеющую или имеющую 1, 2 или 3 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 14. Вторая последовательность переменного домена антитела может содержать последовательность, не имеющую или имеющую 1, 2 или 3 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 15. Первая последовательность переменного домена антитела может содержать последовательность, не имеющую или имеющую 1, 2 или 3 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 32. Вторая последовательность переменного домена антитела может содержать последовательность, не имеющую или имеющую 1, 2 или 3 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 33.

Согласно некоторым вариантам осуществления молекулы GM-CSF содержат область, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 42, где область содержит X5, и X5 содержит вставку GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулы GM-CSF дополнительно содержат область, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31.

Согласно некоторым вариантам осуществления молекулы GM-CSF содержат область, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 26, где область содержит X1, и X1 содержит вставку GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулы GM-CSF дополнительно содержат область, на по меньшей мере

кислотой, содержащей последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 73, и второй нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 74. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к молекуле GM-CSF, кодируемой первой нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 75, и второй нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 76.

Согласно некоторым вариантам осуществления молекула GM-CSF содержит одну или несколько последовательностей из SEQ ID NO: 1-76. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула GM-CSF содержит последовательность из таблицы 4. Аббревиатуры антител в таблице 4 включают: «HC» для тяжелой цепи, «VH» для переменной области тяжелой цепи, «Fc» для фрагмента кристаллизуемой области, «LC» для легкой цепи, «VL» для переменной области легкой цепи, «CDR3L» для определяющей комплементарности области 3 легкой цепи, «CDR3H» для определяющей комплементарности области 3 тяжелой цепи и «FR» для каркаса.

Каркасы

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к молекулам GM-CSF, содержащим пептид GM-CSF, соединенный с каркасом. Каркас может повышать период полувыведения пептида GM-CSF. Измерение периода полувыведения может быть измерено с использованием экспериментов, подробно описанных в приведенных в настоящем документе примерах, или с помощью способов, легко доступных в данной области техники. Период полувыведения может быть увеличен на по меньшей мере приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 100% по сравнению с GM-CSF без слияния, например, с рекомбинантным GM-CSF, таким как сарграмостим. Соответственно, настоящее изобретение относится к молекулам GM-CSF длительного действия, имеющим увеличенный период полувыведения по сравнению с пептидом GM-CSF отдельно.

Согласно некоторым вариантам осуществления каркас содержит одну или несколько частей антитела. Часть антитела может содержать полную молекулу антитела или любой полипептид, содержащий фрагмент антитела, включая без ограничения, тяжелую цепь, легкую цепь, переменный домен, переменную область легкой цепи (VL), переменную область тяжелой цепи (VH), константный домен (например, CH1, CH2, CH3 и/или CL), определяющую комплементарность область (CDR, например, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и/или CDRL3), каркасную область (например, FRH1, FRH2, FRH3, FRH4, FRL1, FRL2, FRL3 и/или FRL4), антигенсвязывающий

фрагмент, однодоменное антитело, антигенсвязывающую область фрагмента (Fab), Fab', F(ab')₂, F(ab')₃, Fab', фрагмент кристаллизуемой области (Fc), одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), dis-scFv, однодоменное антитело, трифункциональное антитело, химически связанный F(ab')₂ и любую их комбинация. Часть антитела может содержать тяжелую цепь и легкую цепь, соединенные линкером или дисульфидной связью. В некоторых случаях часть антитела содержит переменный домен, модифицированный или иным образом сконструированный для снижения или устранения связывания антигена. Связывание антигена может быть уменьшено или устранено путем мутации, например, путем мутации в CDR3 легкой и/или тяжелой цепи. Антитело может быть получено из любого типа, известного специалисту в данной области техники, включая без ограничения IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, IgY и IgW.

В контексте настоящего изобретения переменный домен антитела не ограничен фрагментом антитела, способным связывать антиген, но также включает фрагменты антител, полученные из фрагмента антитела, способного связывать антиген, где дериватизация снижает или устраняет связывание антигена. В некоторых таких случаях длина аминокислот антигенсвязывающего фрагмента, который был дериватизирован для снижения или устранения связывания антигена, может быть такой же или в пределах приблизительно 10-120% от длины аминокислот антигенсвязывающего фрагмента, из которого он был получен (т.е. антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с антигеном). В некоторых случаях переменный домен антитела представляет собой область антитела, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела, где одна или несколько CDR были мутированы или иным образом изменены в отношении идентичности аминокислотной последовательности для уменьшения или устранения связывания антигена по сравнению с немутированным или измененным антителом. Для молекул GM-CSF, в которых пептид GM-CSF расположен в CDR, переменный домен антитела может содержать область антитела, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела, где один или несколько CDR были мутированы или иным образом изменены в отношении идентичности аминокислотной последовательности для снижения или устранения связывания антигена. В некоторых случаях модификация пептида GM-CSF располагается в CDR, например, путем замены 1, 2, 3, 4, 5 или всех аминокислот CDR в пептиде GM-CSF.

Часть антитела может быть модифицирована на основании антитела трастузумаба, содержащего переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 44, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 31. Часть антитела может быть модифицирована на основе антитела паливизумаба, содержащего переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 65, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17. Часть антитела можно модифицировать путем вставки пептида GM-CSF в последовательность тяжелой или легкой цепи. Пептид GM-CSF может заменять одной или нескольких аминокислот последовательности тяжелой или легкой

цепи. GM-CSF может быть расположен в последовательности CDR последовательности тяжелой или легкой цепи. CDR может представлять собой CDR3. Часть антитела может быть соединена с пептидом GM-CSF на amino- или карбокси-конце последовательности тяжелой или легкой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления часть антитела модифицирована для уменьшения связывания антигена. Например, CDR3 тяжелой цепи паливизумаба может быть модифицирована путем замены NWY на FGG.

Согласно некоторым вариантам осуществления часть антитела содержит SEQ ID NO: 14. Согласно некоторым вариантам осуществления часть антитела содержит SEQ ID NO: 15. Часть антитела может содержать SEQ ID NO: 14 и 15. Пептид GM-CSF может быть расположен между SEQ ID NO: 14 и 15. Согласно некоторым вариантам осуществления часть антитела содержит SEQ ID NO: 32. Согласно некоторым вариантам осуществления часть антитела содержит SEQ ID NO: 33. Часть антитела может содержать SEQ ID NO: 32 и 33. Пептид GM-CSF может быть расположен между SEQ ID NO: 32 и 33.

В некоторых случаях каркас содержит «по меньшей мере часть» антитела или фрагмента антитела. Согласно определенным вариантам осуществления «по меньшей мере часть» указывает, что по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% длины антитела или фрагмента антитела присутствуют в композиции при идентичности последовательности по меньшей мере приблизительно 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. Согласно некоторым вариантам осуществления каркас, содержащий по меньшей мере часть тяжелой цепи, имеющей SEQ ID NO: 44 (120 аминокислот), содержит по меньшей мере приблизительно 96 аминокислот (80%), 102 аминокислот (85%), 108 аминокислот (90%) или 114 аминокислот (95%) последовательности согласно SEQ ID NO: 44 с по меньшей мере приблизительно 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей. «По меньшей мере часть» может представлять собой непрерывную аминокислотную последовательность или сумму двух непрерывных аминокислотных последовательностей, которые разделены пептидом GM-CSF. Например, молекула GM-CSF, содержащая по меньшей мере часть переменного домена антитела может содержать первую непрерывную аминокислотную последовательность переменного домена антитела, пептид GM-CSF и вторую непрерывную аминокислотную последовательность переменного домена антитела, где первую и вторую непрерывные аминокислотные последовательности переменного домена антитела добавляют до по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% длины последовательности переменного домена антитела. В некоторых случаях молекула GM-CSF содержит по меньшей мере часть антитела или фрагмента антитела, выбранного из: переменного домена антитела и/или антигенсвязывающего домена (например, фрагмент, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела и/или легкой цепи антитела), где молекула содержит первого антитела или область фрагмента антитела, пептид GM-CSF и второго антитела или область фрагмента антитела, и где «по меньшей мере часть» указывает, что сумма длины первого антитела или области

фрагмента антитела и длины второго антитела или области фрагмента антитела составляет по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от длины варибельного домена антитела и/или антигенсвязывающий домен.

Часть антитела может содержать последовательность антитела из антитела трастузумаб. Часть антитела может содержать аминокислотную последовательность, идентичную или на по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную по меньшей мере части антитела трастузумаб. Например, часть антитела содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, выбранной из одной или нескольких из SEQ ID NO: 30-35, 37-39 и 44. В качестве другого примера часть антитела содержит по меньшей мере приблизительно 10 непрерывных аминокислот последовательности, выбранной из одной или нескольких из SEQ ID NO: 30-35, 37-39 и 44.

Часть антитела может содержать последовательность антитела из анти-Her2 антитела. Часть антитела может содержать по меньшей мере часть анти-Her2 антитела. Часть антитела может содержать аминокислотную последовательность, идентичную или на по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95% или 97% или более идентичную по меньшей мере части анти-Her2 антитела.

В некоторых случаях часть антитела содержит последовательность антитела паливизумаб. Часть антитела может содержать аминокислотную последовательность, идентичную или на по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную по меньшей мере части антитела паливизумаб. Например, часть антитела содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, выбранной из одной или нескольких из SEQ ID NO: 14, 15, 17, 65 и 19-23. В качестве другого примера часть антитела содержит по меньшей мере приблизительно 10 непрерывных аминокислот последовательности, выбранной из одной или нескольких из SEQ ID NO: 14, 15, 17, 65 и 19-23.

Согласно некоторым вариантам осуществления каркас антитела, раскрытый в настоящем документе, не является специфическим для антигена или имеет пониженное связывание с антигеном. Например, каркас антитела, раскрытый в настоящем документе, может не связываться с антигеном или может связываться с антигеном с аффинностью менее приблизительно 10 M^{-2} , 10 M^{-3} или 10 M^{-5} , например, как определено анализом, описанным в примере в настоящем документе. Иллюстративное антитело содержит шесть CDR, где одна или несколько CDR представляют собой модифицированную CDR, содержащую одну или несколько добавлений, замен или делеций аминокислот, которые снижают или устраняют связывание антигена. В некоторых случаях CDR модифицируют

вставкой терапевтического пептида, такого как GM-CSF. В иллюстративных вариантах осуществления GM-CSF вставлен в CDR3 тяжелой или легкой цепи. Иллюстративные молекулы GM-CSF, раскрытые в настоящем документе, содержат пептид GM-CSF, расположенный в CDR3 тяжелой цепи переменного домена антитела, где антитело не имеет или имеет пониженное связывание с антигеном по сравнению с антителом без слияния GM-CSF. GM-CSF может заменить одну, две, три, четыре, пять или все аминокислоты CDR. Антитело может содержать каркас переменного домена антитела трастузумаб, модифицированный путем вставки GM-CSF в CDR. В некоторых случаях вставка GM-CSF в CDR3 трастузумаба снижает связывание антигена. Антитело, содержащее вставку, может дополнительно содержать одну или несколько аминокислотных делеций, например, если вставка заменяет одну или несколько аминокислот в CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность CDR мутирована для снижения связывания антигена. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR3 тяжелой цепи паливизумаба содержит SMITX(i)X(ii)X(iii)FDV (SEQ ID NO: 66), где X(i) выбран из F, A, G и P, X(ii) выбран из G, A, S, T и P, и X(iii) выбран из G, A, V, L и P. Согласно некоторым вариантам осуществления X(i) представляет собой F. Согласно некоторым вариантам осуществления X(ii) представляет собой G. Согласно некоторым вариантам осуществления X(ii) представляет собой A. Согласно некоторым вариантам осуществления X(iii) представляет собой G. В качестве примера, тяжелая цепь CDR3 антитела паливизумаб мутирована путем замены NWY на FGG, что снижает связывание с RSV-F по сравнению с немутированным паливизумабом. Согласно другому примеру тяжелая цепь CDR3 антитела трастузумаб мутирована путем удаления приблизительно 1, 2, 3, 4, 5 или всех аминокислот CDR3, что снижает связывание с Her2 по сравнению с немутантным трастузумабом. В некоторых случаях одна или несколько аминокислот CDR3 трастузумаба заменены пептидом GM-CSF или вставкой GM-CSF.

Согласно некоторым вариантам осуществления часть антитела не является специфической для млекопитающей мишени. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой противовирусное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой антибактериальное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой антипаразитарное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой противогрибковое антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления часть антитела происходит из вакцины на основе антител.

Согласно некоторым вариантам осуществления часть антитела содержит последовательность антитела из без ограничения актоксумаба, безлотоксумаба, CR6261, эдобакомаба, эфунгумаба, эксбивирумаба, фелвизумаба, форавирумаба, ибализумаба (TMB-355, TNX-355), либивирумаба, мотавизумаба, небакумаба, пагибаксимаба, паливизумаба, панобакумаба, рафивирумаба, раксибакумаба, регавирумаба, севирумаба (MSL-109), сувизумаба, тефибазумаба, тувирумаба и уртоксазумаба.

Согласно некоторым вариантам осуществления часть антитела содержит последовательность антитела из антител, нацеленных на *Clostridium difficile*, ортомиксовирусы (вирус гриппа А, вирус гриппа В, вирус гриппа С, изавирус, тоготовирус), *Escherichia coli*, кандиды, бешенство, вирус иммунодефицита человека, гепатит, стафилококк, респираторно-синцитиальный вирус, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus anthracis*, *Cytomegalovirus* или *Staphylococcus aureus*.

Часть антитела может содержать последовательность антитела из противовирусного антитела. Противовирусное антитело может быть направлено против эпитопа вирусного белка. Противовирусное антитело может быть нацелено на один или несколько вирусов, включая без ограничения аденовирусы, герпесвирусы, поксвирусы, парвовирусы, реовирусы, пикорнавирусы, тогавирусы, ортомиксовирусы, рабдовирусы, ретровирусы и гепаднавирусы. Вирусный белок может происходить из респираторно-синцитиального вируса. Вирусный белок может представлять собой F-белок респираторно-синцитиального вируса. Эпитоп может находиться в антигенном сайте А белка F. Противовирусное антитело может быть основано на паливизумабе или получено из него. Антитело может быть основано на противовирусной вакцине или получено из нее. Противовирусное антитело может быть основано или получено из эксбивирумаба, форавирумаба, либивирумаба, рафивирумаба, регавирумаба, севирумаба, тувирумаба, фелвизумаба, мотавизумаба, паливизумаба и/или сувизумаба.

Часть антитела может содержать последовательность антитела из противовирусного антитела G. Часть антитела может содержать по меньшей мере часть противовирусного антитела G. Часть антитела может содержать аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95% или 97% или более идентична по меньшей мере части противовирусного антитела G. Согласно некоторым вариантам осуществления часть антитела содержит аминокислотную последовательность из противовирусного антитела M.

Часть антитела может содержать последовательность антитела из эксбивирумаба, форавирумаба, либивирумаба, рафивирумаба, регавирумаба, севирумаба, тувирумаба, фелвизумаба, мотавизумаба, паливизумаба и/или сувизумаба. Часть антитела может содержать по меньшей мере часть антитела эксбивирумаба, форавирумаба, либивирумаба, рафивирумаба, регавирумаба, севирумаба, тувирумаба, фелвизумаба, мотавизумаба, паливизумаба и/или сувизумаба. Часть антитела может содержать последовательность антитела, которая идентична или на по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95% или 97% или более идентична по меньшей мере части антитела эксбивирумаба, форавирумаба, либивирумаба, рафивирумаба, регавирумаба, севирумаба, тувирумаба, фелвизумаба, мотавизумаба, паливизумаба и/или сувизумаба.

Часть антитела может содержать последовательность антитела из антибактериального антитела. Антибактериальное антитело может быть направлено

против эпитопа бактериального белка. Антибактериальное антитело может быть нацелено на бактерии, включая без ограничения, *Acetobacter aurantius*, *Agrobacterium radiobacter*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Azorhizobium caulinodans*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Bartonella quintana*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia cepacia*, *Calymmatobacterium granulomatis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter pylori*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium fusiforme*, *Coxiella burnetii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus maloratus*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus pertussis*, *Haemophilus vaginalis*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Methanobacterium extroquens*, *Microbacterium multiforme*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella tularensis*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizobium radiobacter*, *Rickettsia rickettsii*, *Rothia dentocariosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Treponema denticola*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio comma*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis*. Антитело может быть основано на бактериальной вакцине или получено из нее. Противовирусное антитело может быть основано или получено из небакумаба, панобакумаба, раксибакумаба, эдобакомаба, пагибаксимаба и/или тефибазумаба.

Часть антитела может содержать последовательность антитела из антибактериального антитела G. Часть антитела может содержать по меньшей мере часть антибактериального антитела G. Часть антитела может содержать аминокислотную последовательность, идентичную или на по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95% или 97% или более идентичную по меньшей мере части антибактериального антитела G. Согласно некоторым вариантам осуществления часть антитела содержит аминокислотную последовательность на основе антибактериального антитела M или происходящую из него.

Часть антитела может содержать последовательность антитела из небакумаба, панобакумаба, раксибакумаба, эдобакомаба, пагибаксимаба и/или тефибазумаба. Часть антитела может содержать аминокислотную последовательность, идентичную или на по

меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95% или 97% или более идентичную по меньшей мере части антитела небакумаба, панобакумаба, раксибакумаба, эдобакомаба, пагибаксимаба и/или тефибазумаба.

Часть антитела может содержать последовательность антитела из антипаразитарного антитела. Антипаразитарное антитело может быть направлено против эпитопа паразитарного белка. Антипаразитарное антитело может нацеливаться на паразитов или паразитарные белки, в том числе на паразитов *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris*, *Babesia* (*B. divergens*, *B. bigemina*, *B. equi*, *B. microfti*, *B. duncani*), *Balantidium coli*, бластоцитоз, криптоспоридия, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Isospora belli*, лейшмания, *Naegleria fowleri*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale curtisi*, *Plasmodium ovale wallikeri*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*, *Rhinosporidium seeberi*, *Sarcocystis bovi hominis*, *Sarcocystis sui hominis*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, цестоды, *Taenia multiceps*, *Diphyllobothrium latum*, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus vogeli*, *Echinococcus oligarthrus*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*, *Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Bertiella mucronata*, *Bertiella studeri*, *Spirometra erinaceieuropaei*, *Clonorchis sinensis*, *Clonorchis viverrini*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Fasciolopsis buski*, *Gnathostoma spinigerum*, *Gnathostoma hispidum*, *Metagonimus yokogawai*, *Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus*, *Clonorchis sinensis*, *Paragonimus westermani*, *Paragonimus africanus*, *Paragonimus caliensis*, *Paragonimus kellicotti*, *Paragonimus skrjabini*, *Paragonimus uterobilateralis*, виды шистосом, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi*, *Echinostoma echinatum*, *Trichobilharzia regenti*, Schistosomatidae, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Angiostrongylus costaricensis*, *Anisakis*, *Ascaris* sp. *Ascaris lumbricoides*, *Baylisascaris procyonis*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Diocotophyme renale*, *Dracunculus medinensis*, *Enterobius vermicularis*, *Enterobius gregorii*, *Halicephalobus gingivalis*, *Loa filaria*, *Mansonella streptocerca*, *Onchocerca volvulus*, *Strongyloides stercoralis*, *Thelazia californiensis*, *Thelazia callipaeda*, *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, *Trichinella nelsoni*, *Trichinella nativa*, *Trichuris trichiura*, *Trichuris vulpis*, *Wuchereria bancrofti*, *Archiacanthocephala*, монилиформный красный лишай, *Linguatula serrata*, Oestroidea, каллифоры, саркофагиды, *Tunga penetrans*, *Dermatobia hominis*, иксодовые клещи, аргазиды, *Cimex lectularius*, *Pediculus humanus*, *Pediculus humanus corporis*, *Pthirus pubis*, *Demodex folliculorum/brevis/canis*, *Sarcoptes scabiei*, *Cochliomyia hominivorax* и *Pulex irritans*.

Часть антитела может содержать последовательность антитела из антипаразитарного антитела G. Часть антитела может содержать по меньшей мере часть антипаразитарного антитела G. Часть антитела может содержать аминокислотную последовательность, идентичную или на по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95% или 97% или более идентичную по меньшей мере части антипаразитарного антитела G.

Часть антитела может содержать последовательность антитела из противогрибкового антитела. Противогрибковое антитело может быть нацелено на эпитоп грибкового белка. Противогрибковое антитело может быть нацелено на грибы или грибковые белки, включая без ограничения *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida stellatoidea*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida viswanathii*, *Candida lusitaniae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida stellata*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces exiguus* и *Pichia pastoris*. Противогрибковое антитело может быть основано на эфунгумабе или получено из него.

Часть антитела может содержать последовательность антитела из противогрибкового антитела G. Часть антитела может содержать по меньшей мере часть противогрибкового антитела G. Часть антитела может содержать аминокислотную последовательность, идентичную или на по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95% или 97% или более идентичную по меньшей мере части противогрибкового антитела G.

Часть антитела может содержать последовательность антитела из противоракового антитела. Примеры противораковых антител включают без ограничения абциксимаб, адалимумаб, алемтузумаб, базиликсимаб, белимумаб, бевацизумаб, брентуксимаб, канакинумаб, цертолизумаб, цетуксимаб, даклизумаб, деносумаб, экулизумаб, эфализумаб, гемтузумаб, голимумаб, ибритумомаб, инфликсимаб, ипилимумаб, муромонаб-cd3, натализумаб, офатумумаб, омализумаб, паливизумаб, панитумумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, тоцилизумаб, тозитумомаб, трастусумаб.

Часть антитела может содержать по меньшей мере часть человеческого антитела. Часть антитела может содержать по меньшей мере часть гуманизированного антитела. Часть антитела может содержать по меньшей мере часть химерного антитела. Часть антитела может быть основана на человеческом антителе или происходить из него. Часть антитела может быть основана на гуманизированном антителе или происходить из него. Часть антитела может быть основана на химерном антителе или происходить из него. Часть антитела может быть основана на моноклональном антителе или происходить из него. Часть антитела может быть основана на поликлональном антителе или происходить из него. Часть антитела может содержать по меньшей мере часть антитела млекопитающего, птицы, рептилии, амфибии или их комбинации. Млекопитающее может быть человеком. Млекопитающее может быть приматом, отличным от человека. Млекопитающее может быть собакой, кошкой, овцой, козой, коровой, кроликом, крысой или мышью.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к переменным доменам антитела, содержащим: (a) легкую цепь, содержащую (i) CDRL1, содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3

аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 22, (ii) CDRL2, содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 23, и (iii) CDRL3, содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 16 или 77, и (b) тяжелую цепь, содержащую (i) CDRH1, содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 19, (ii) CDRH2, содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 20, и (iii) CDRH3, содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 21. Согласно некоторым вариантам осуществления CDRL3 содержит последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 24. Согласно некоторым вариантам осуществления переменные домены антитела содержат легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 22, 23 и 16, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 19-21. Согласно некоторым вариантам осуществления переменные домены антитела содержат легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 22, 23 и 77, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 19-21. Согласно некоторым вариантам осуществления переменные домены антитела содержат легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 22, 23 и 24, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 19-21. Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам, содержащим переменный домен антитела и дополнительно содержащим область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с человеческим IgG (SEQ ID NO: 25). Пониженная эффекторная функция может представлять собой пониженную ADCC и/или пониженную CDC. Область Fc может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3. Согласно некоторым вариантам осуществления область Fc содержит модифицированный IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к переменным доменам антитела, содержащим: (a) легкую цепь, содержащую (i) CDRL1, содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 37, (ii) CDRL2, содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 38, и (iii) CDRL3, содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 39, и (b) тяжелую цепь, содержащую (i) CDRH1, содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID

NO: 34, (ii) CDRH2, содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 35, и (iii) CDRH3, содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 16. Согласно некоторым вариантам осуществления CDRH3 содержит последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 36. Согласно некоторым вариантам осуществления переменные домены антитела содержат легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 37-39, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 34, 35 и 16. Согласно некоторым вариантам осуществления переменные домены антитела содержат легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 37-39, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 34-36. Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам, содержащим переменный домен антитела и дополнительно содержащим область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с человеческим IgG (SEQ ID NO: 25). Пониженная эффекторная функция может представлять собой пониженную ADCC и/или пониженную CDC. Область Fc может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3. Согласно некоторым вариантам осуществления область Fc содержит модифицированный IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к переменным доменам антитела, содержащим: (a) легкую цепь, содержащую (i) CDRL1, содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 37, (ii) CDRL2, содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 38, и (iii) CDRL3, содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 39, и (b) тяжелую цепь, содержащую (i) CDRH1 содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 34, (ii) CDRH2 содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 35, и (iii) CDRH3 содержащую последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2 или 3 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 77. Согласно некоторым вариантам осуществления CDRH3 содержит последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 36. Согласно некоторым вариантам осуществления переменные домены антитела содержат легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 37-39, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 34, 35 и 77. Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам, содержащим переменный

домен антитела и дополнительно содержащим область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с человеческим IgG (SEQ ID NO: 25). Пониженная эффекторная функция может представлять собой пониженную ADCC и/или пониженную CDC. Область Fc может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3. Согласно некоторым вариантам осуществления область Fc содержит модифицированный IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

Пониженная эффекторная функция

Каркасы антител согласно настоящему изобретению могут содержать одну или несколько аминокислотных добавлений, делеций и/или замен в области Fc IgG дикого типа для снижения связывания с эффекторной молекулой по сравнению с IgG дикого типа. Антитело может иметь пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или комплемент-зависимую цитотоксичность. В качестве примера, каркас содержит область Fc IgG1, содержащую одну или несколько из следующих мутаций: E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S и P331S. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит, константную область, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит домен CH1, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит область Fc, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 4.

Линкеры

Молекулы GM-CSF могут содержать пептид GM-CSF, соединенный с каркасом через один или несколько линкеров. В некоторых случаях молекула линкера содержит линкерный пептид, содержащий вторичную структуру. Вторичная структура может представлять собой альфа-спираль. Иллюстративные пептиды альфа-спирали содержат последовательности, имеющие по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 8-9. Согласно некоторым вариантам осуществления линкерная молекула содержит линкерный пептид, который является гибким, не имеющий регулярную вторичную структуру. Иллюстративные линкерные пептиды включают последовательности, имеющие по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 10-11. Согласно некоторым вариантам осуществления первый линкер содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 12. Согласно некоторым вариантам осуществления второй линкер содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 13.

Согласно некоторым вариантам осуществления молекула GM-CSF содержит пептид GM-CSF, расположенный в каркасе, так что амино-конец пептида GM-CSF и карбокси-конец пептида GM-CSF каждый соединен с каркасом. Пептид GM-CSF может быть соединен при амино-конце с каркасом посредством первого линкера, и соединен при карбокси-конце с каркасом посредством второго линкера. В качестве примера, раскрыта молекула GM-CSF, содержащая A1-L1-T-L2-A2, где A1 и A2 представляют собой первую и вторую части каркаса A3 (например, последовательность антитела), L1 представляет собой первый линкер, L2 представляет собой второй линкер, и T представляет собой пептид GM-CSF. A3 может представлять собой тяжелую или легкую цепь варибельного домена антитела. В некоторых случаях на основе первичной последовательности L1, L1 сконфигурирован с образованием спирали. В некоторых случаях на основе первичной последовательности L2, L2 сконфигурирован с образованием спирали. В некоторых случаях L1 сконфигурирован с образованием первой спирали, L2 сконфигурирован с образованием второй спирали, и первая и вторая спирали сконфигурированы с образованием суперспирали. Суперспираль может быть встречно-параллельной. Согласно некоторым вариантам осуществления L1 содержит последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 8. Согласно некоторым вариантам осуществления L2 содержит последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 9. Согласно некоторым вариантам осуществления L1 содержит гибкий линкер. L1 может содержать последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1 или 2 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 10. L1 может содержать последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1 или 2 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 11. Согласно некоторым вариантам осуществления L2 содержит гибкий линкер. L2 может содержать последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1 или 2 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 10. L2 может содержать последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1 или 2 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 11. Согласно некоторым вариантам осуществления L1 содержит последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 12. Согласно некоторым вариантам осуществления L2 содержит последовательность, которая не имеет или имеет приблизительно 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен или делеций по сравнению с SEQ ID NO: 13. L1-T-L2 может содержать последовательность, на по меньшей мере

приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 18.

Векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные способы

Согласно одному аспекту молекулы GM-CSF, раскрытые в настоящем документе, содержат полипептидную последовательность. Такие молекулы GM-CSF, раскрытые в настоящем документе (в некоторые случаях указываемые как слитые белки GM-CSF), могут экспрессироваться и могут быть очищены известными рекомбинантными способами и способами очистки белков. В иллюстративном варианте осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, синтезируют, амплифицируют (например, с помощью ПЦР), расщепляют рестриктазным ферментом и подвергают очистке на основе геля. Расщепленная нуклеиновая кислота может быть встроена в реплицируемый вектор. Реплицируемый вектор, содержащий вставку расщепленного слитого белка, можно трансформировать или трансдуцировать в клетку-хозяин для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. Клетки-хозяева могут быть прокариотическими или эукариотическими клетками. Кроме того, фаговые векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, которые совместимы с микроорганизмом-хозяином, могут быть использованы в качестве трансформирующих векторов вместе с этими хозяевами. Например, бактериофаг, такой как λ GEM™-11, можно использовать для создания рекомбинантного вектора, который можно использовать для трансформации восприимчивых клеток-хозяев, таких как *E. coli* LE392. Слияния белков могут экспрессироваться внутриклеточно (например, цитоплазма) или внеклеточно (например, секреция). Для внеклеточной экспрессии вектор может воспроизводить сигнал секреции, который делает возможной транслокацию белков антитела вне клетки.

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих слияние белков, включают прокариотические и эукариотические клетки. Клетка-хозяин может быть эукариотической. Примеры эукариотических клеток включают без ограничения эмбриональную клетку почки человека (НЕК) (например, клетку НЕК 293F), клетку яичника китайского хомячка (СНО), грибы, дрожжи, клетки беспозвоночных (например, клетки растений и клетки насекомых), лимфоидные клетки (например, клетки YO, NSO, Sp20). Другими примерами подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7), клетки почки новорожденного хомяка (ВНК), клетки Сертоли мыши, клетки почки обезьяны (CV1), клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76), клетки карциномы шейки матки человека (HELA), клетки почки собаки (MDCK), клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A), клетки легких человека (W138), клетки печени человека (Hep G2), опухоль молочной железы мыши (ММТ 060562), клетки TR1, клетки MRC 5 и клетки FS4. Клетка-хозяин может быть прокариотической клеткой (например, *E. coli*).

Клетки-хозяева могут быть трансформированы векторами, содержащими нуклеотиды, кодирующие слитый белок GM-CSF. Трансформированные клетки-хозяева можно культивировать в среде. Среда может быть дополнена одним или несколькими

агентами для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации или экспрессии генов, кодирующих желаемые последовательности. Способы трансформации клеток-хозяев известны в данной области техники и могут включать электропорацию, хлорид кальция или полиэтиленгликоль/ДМСО. Клетки-хозяева могут быть трансфицированы или трансдуцированы векторами, содержащими нуклеотиды, кодирующие слияния белков GM-CSF. Трансфицированные или трансдуцированные клетки-хозяева можно культивировать в среде. Среда может быть дополнена одним или несколькими агентами для индукции промоторов, отбора трансфицированных или трансдуцированных клеток или экспрессии генов, кодирующих желаемые последовательности.

Экспрессированные слитые белки GM-CSF могут секретироваться и извлекаться из периплазмы клеток-хозяев или транспортироваться в культуральную среду. Извлечение белка из периплазмы может предусматривать разрушение клетки-хозяина. Разрушение клетки-хозяина может быть вызвано осмотическим шоком, обработкой ультразвуком и/или лизисом. Для удаления клеточного дебриса или целых клеток можно использовать центрифугирование или фильтрацию. Слитые белки GM-CSF могут быть дополнительно очищены, например, с помощью аффинной хроматографии на смоле. Альтернативно, слитые белки GM-CSF, которые секретируются в культуральную среду, могут быть выделены из нее. Клетки могут быть удалены из культуры, а супернатант культуры отфильтрован и сконцентрирован для дальнейшей очистки полученных белков. Экспрессированные полипептиды могут быть дополнительно выделены и идентифицированы с использованием общеизвестных способов, таких как электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) и вестерн-блоттинг.

Получение слитого белка GM-CSF можно проводить в больших количествах в процессе ферментации. Для получения рекомбинантных белков доступны различные крупномасштабные процедуры периодической ферментации с подпиткой. Крупномасштабные ферментеры имеют емкость по меньшей мере 1000 литров, например, приблизительно от 1000 до 100000 литров. В этих ферментерах используются лопастные мешалки для распределения кислорода и питательных веществ, особенно глюкозы (предпочтительный источник углерода/энергии). Ферментация в небольшом масштабе обычно относится к ферментации в ферментере, объемная емкость которого не превышает приблизительно 100 литров, и может варьироваться от приблизительно 1 литра до приблизительно 100 литров. В процессе ферментации индукцию экспрессии белка обычно инициируют после того, как клетки выращены в подходящих условиях до желаемой плотности, например, OD550 приблизительно 180-220, при которой клетки находятся в ранней стационарной фазе. Можно использовать различные индукторы в соответствии с используемой векторной конструкцией, как известно в данной области техники и описано в настоящем документе. Клетки можно выращивать в течение более коротких периодов до индукции. Клетки обычно индуцируют приблизительно в течение 12-50 часов, хотя можно использовать более длительное или более короткое время индукции.

Для повышения выхода продукции и качества слитых белков GM-CSF, описанных в настоящем документе, можно менять различные условия ферментации. Например, для улучшения правильной сборки и укладки секретлируемых гибридных белков GM-CSF дополнительные векторы, сверхэкспрессирующие белки-шапероны, такие как белки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD и/или DsbG) или FkpA (пептидилпролил цис, транс-изомераза с шаперонной активностью) можно использовать для совместной трансформации прокариотических клеток-хозяев. Было продемонстрировано, что белки-шапероны облегчают правильную укладку и растворимость гетерологичных белков, продуцируемых в бактериальных клетках-хозяевах.

Для того, чтобы свести к минимуму протеолиз экспрессированных гетерологичных белков (особенно тех, которые являются протеолитически чувствительными), для настоящего изобретения могут быть использованы определенные штаммы-хозяева, дефицитные по протеолитическим ферментам. Например, штаммы клеток-хозяев могут быть модифицированы для осуществления генной мутации (мутаций) в генах, кодирующих известные бактериальные протеазы, такие как протеаза III, OmpT, DegP, Tsp, протеаза I, протеаза Mi, протеаза V, протеаза VI и их комбинации. Доступны некоторые штаммы E. coli, дефицитные по протеазам.

Можно использовать стандартные способы очистки белка, известные в данной области техники. Следующие процедуры являются неограничивающими примерами подходящих процедур очистки: фракционирование на иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на силикагеле или на катионообменной смоле, такой как DEAE, хроматофокусирование, SDS-PAGE, осаждение сульфатом аммония, хроматография на гидроксилпатите, гель-электрофорез, диализ, аффинная хроматография и гель-фильтрация с использованием, например, Sephadex G-75.

Слитые белки GM-CSF можно концентрировать с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрации белков, например, узла ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon[®].

Ингибиторы протеазы или смеси ингибиторов протеазы могут быть включены на любой из вышеперечисленных стадий для ингибирования протеолиза слитых белков GM-CSF.

В некоторых случаях слитый белок GM-CSF может не быть биологически активным после выделения. Для восстановления биологической активности можно использовать различные способы «рефолдинга» или превращения полипептида в его третичную структуру и образования дисульфидных связей. Такие способы предусматривают воздействие на солюбилизованный полипептид значением pH обычно выше 7 и в присутствии определенной концентрации хаотропа. Выбор хаотропа аналогичен выбору, используемому для солюбилизации телец включения, но обычно хаотроп используют при более низкой концентрации и не обязательно такой же, как для хаотропов, используемых для солюбилизации. В большинстве случаев раствор для

рефолдинга/окисления также будет содержать восстанавливающий агент или восстанавливающий агент плюс его окисленную форму в определенном соотношении для создания определенного окислительно-восстановительного потенциала, обеспечивающего перетасовку дисульфидов при образовании цистеинового мостика (цистеиновых мостиков) белка. Некоторые из обычно используемых окислительно-восстановительных пар включают цистеин/цистамин, глутатион (GSH)/дителиобис-GSH, хлорид меди, дитиотреитол (DTT)/дителиан-DTT и 2-меркаптоэтанол (bME)/дителио-b (ME). Во многих случаях для повышения эффективности рефолдинга можно использовать соразстворитель, и обычные реагенты, используемые для этой цели, включают глицерин, полиэтиленгликоль различной молекулярной массы, аргинин и т.п.

Композиции

В настоящем документе раскрыты композиции, содержащие пептид GM-CSF, такой как молекула GM-CSF, содержащая пептид GM-CSF и каркас (например, молекула GM-CSF длительного действия). Для каркасов, содержащих полипептидную последовательность, молекула GM-CSF в некоторых случаях также может быть указана как слитый белок GM-CSF.

Композиции могут дополнительно содержать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей, вспомогательных веществ или носителей. Фармацевтически приемлемые соли, вспомогательные вещества или носители для применения в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению включают носители, вспомогательные вещества, разбавители, антиоксиданты, консерванты, красители, ароматизаторы и разбавители, эмульгаторы, суспендирующие агенты, растворители, наполнители, объемобразующие агенты, буферы, носители для доставки, агенты, регулирующие тоничность, соразстворители, смачивающие агенты, комплексообразователи, буферные агенты, противомикробные вещества и поверхностно-активные вещества.

Примерами подходящих носителей являются нейтральный забуференный физиологический раствор или физиологический раствор, смешанный с сывороточным альбумином. Фармацевтические композиции могут включать антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, низкомолекулярные полипептиды, белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или антитела, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин, моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины, хелатирующие агенты, такие как EDTA, сахарные спирты, такие как маннит или сорбит, солеобразующие противоионы, такие как натрий, и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, плуроники или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Также в качестве примера подходящие агенты, повышающие тоничность, включают галогениды щелочных металлов (предпочтительно хлорид натрия или калия), маннит, сорбит и т.п. Подходящие консерванты включают хлорид бензалкония, тимеросал, фенилэтиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин,

сорбиновую кислоту и т.п. Перекись водорода также может быть использована в качестве консерванта. Подходящие сорастворители включают глицерин, пропиленгликоль и ПЭГ. Подходящие комплексообразователи включают кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин. Подходящие поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты включают сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 80, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал и т.п. Буферы могут быть обычными буферами, такими как ацетатный, боратный, цитратный, фосфатный, бикарбонатный или трис-НСI. Ацетатный буфер может иметь pH 4-5,5, а Трис-буфер может иметь pH 7-8,5. Дополнительные фармацевтические агенты раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990.

Композиция может быть в жидкой форме или в лиофилизированной или высушенной замораживанием форме и может включать один или несколько лиопротекторов, вспомогательных веществ, поверхностно-активных веществ, высокомолекулярных структурных добавок и/или наполнителей. Согласно одному варианту осуществления включен лиопротектор, который представляет собой невосстанавливающий сахар, такой как сахароза, лактоза или трегалоза. Обычно включаемое количество лиопротектора является таким, что после восстановления полученный состав будет изотоническим, хотя также могут быть подходящими гипертонические или слегка гипотонические составы. Кроме того, количество лиопротектора должно быть достаточным для предотвращения неприемлемого разрушения и агрегации белка при лиофилизации. Согласно другому варианту осуществления включено поверхностно-активное вещество, такое как, например, неионные поверхностно-активные вещества и ионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты (например, полисорбат 20, полисорбат 80), полочсамеры (например, полочсамер 188), простые фениловые эфиры поли(этиленгликоля) (например, тритон), додецилсульфат натрия (SDS), лаурилсульфат натрия, октилгликозид натрия, лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарил-сульфобетаин, лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарил-саркозин, линолеил-, миристил- или цетил-бетаин, лауроамидопропил-, кокамидопропил-, линолеамидопропил-, миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропил-бетаин (например, лауроамидопропил), миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропил-диметиламин, метил-кокоил натрия или динатрия метилофеил-таурат, серия MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), полиэтиленгликоль, полипропилгликоль и сополимеры этилена и пропиленгликоля (например, Pluronic, PF68 и т.д.). Иллюстративные количества поверхностно-активного вещества, которые могут присутствовать в предварительно лиофилизированном составе, составляют приблизительно 0,001-0,5%. Высокомолекулярные структурные добавки (например, наполнители, связующие вещества) могут включать, например, гуммиарабик, альбумин, альгиновую кислоту, фосфат кальция (двухосновный), целлюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксиэтилцеллюлозу,

гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, декстран, декстрин, декстраты, сахарозу, тилозу, прежелатинизированный крахмал, сульфат кальция, амилозу, глицин, бентонит, мальтозу, сорбит, этилцеллюлозу, гидрофосфат динатрия, фосфат динатрия, пиросульфит натрия, поливиниловый спирт, желатин, глюкозу, гуаровую камедь, жидкую глюкозу, прессуемый сахар, алюмосиликат магния, мальтодекстрин, полиэтиленоксид, полиметакрилаты, повидон, альгинат натрия, трагакантовую микрокристаллическую целлюлозу, крахмал и зеин. Иллюстративные концентрации высокомолекулярных структурных добавок составляют от 0,1 мас.% до 10 мас.%. Согласно другим вариантам осуществления может быть включен наполнитель (например, маннит, глицин).

Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и буферные среды. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или нелетучие масла. Внутривенные носители включают восполнители жидкости и питательных веществ, восполнители электролитов, такие как средства на основе декстрозы Рингера, и т.п. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные вещества, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и т.п. См. в общем, Remington's Pharmaceutical Science, 16th Ed., Mack Eds., 1980.

Композиции, описанные в настоящем документе, могут быть составлены для контролируемой или пролонгированной доставки таким образом, который обеспечивает локальную концентрацию продукта (например, болюсный эффект, эффект депо) и/или повышенную стабильность или период полувыведения в конкретной локальной среде. Композиции могут представлять собой состав белков, полипептидов, нуклеиновых кислот или векторов молекулы GM-CSF, раскрытых в настоящем документе, с препаратами в виде частиц полимерных соединений, таких как полимолочная кислота, полигликолевая кислота и т.д., а также такими агентами, как биоразлагаемая матрица, микросферы для инъекций, микрокапсульные частицы, микрокапсулы, гранулы биоразлагаемых частиц, липосомы и имплантируемые устройства доставки, которые обеспечивают контролируемое или замедленное высвобождение активного агента, который затем может быть доставлен в виде инъекции депо. Способы составления таких средств пролонгированной или контролируемой доставки известны, и для контролируемого высвобождения и доставки лекарственных средств были разработаны и использованы различные полимеры. Такие полимеры обычно являются биоразлагаемыми и биосовместимыми. Полимерные гидрогели, в том числе образованные путем комплексообразования энантиомерных полимерных или полипептидных сегментов, и гидрогели с чувствительными к температуре или pH свойствами могут быть желательны

для обеспечения эффекта депо лекарственного средства на основе мягких и водных условий, связанных с улавливанием биоактивных белковых агентов.

Фармацевтическую композицию, раскрытую в настоящем документе, можно вводить субъекту любым подходящим путем введения, включая без ограничения парентеральное (внутривенное, подкожное, внутрибрюшинное, внутримышечное, внутрисосудистое, интратекальное, интравитреальное, инфузионное или локальное), местное, пероральное и/или назальное введение.

Составы, подходящие для внутримышечной, подкожной, перитуморальной или внутривенной инъекции, могут включать физиологически приемлемые стерильные водные или неводные растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии и стерильные порошки для восстановления в стерильные растворы или дисперсии для инъекций. Примеры подходящих водных и неводных носителей, разбавителей, растворителей или сред включают воду, этанол, полиолы (пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, глицерин, кремофор и т.п.), их подходящие смеси, растительные масла (такие как оливковое масло) и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть поддерживают, например, посредством использования покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и посредством использования поверхностно-активных веществ. Составы, подходящие для подкожной инъекции, также содержат необязательные добавки, такие как консервирующие, смачивающие, эмульгирующие и дозирующие агенты.

Для внутривенных инъекций активный агент может быть необязательно введен в состав в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер.

Парентеральные инъекции необязательно включают болюсную инъекцию или непрерывную инфузию. Составы для инъекций необязательно представлены в виде стандартной дозированной формы, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах, с добавлением консерванта. Фармацевтическая композиция, раскрытая в настоящем документе, может быть в форме, подходящей для парентеральной инъекции, в виде стерильных суспензий, растворов или эмульсий в масляных или водных носителях, и может содержать агенты для образования состава, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Фармацевтические составы для парентерального введения включают водные растворы активного агента в водорастворимой форме. Кроме того, суспензии необязательно получают в виде подходящих масляных суспензий для инъекций.

Альтернативно или дополнительно композиции можно вводить локально посредством имплантации в пораженный участок мембраны, губки или другого подходящего материала, на котором была абсорбирована или в который была инкапсулирована молекула GM-CSF, раскрытая в настоящем документе. Если используется устройство для имплантации, это устройство может быть имплантировано в любую подходящую ткань или орган, и доставка пептида, нуклеиновой кислоты или

вектора GM-CSF, раскрытого в настоящем документе, может осуществляться непосредственно через устройство в виде болюса, или посредством непрерывного введения, или посредством катетера с непрерывной инфузией.

Фармацевтическая композиция, содержащая молекулу GM-CSF, раскрытую в настоящем документе, может быть составлена для ингаляции, например, в виде сухого порошка. Ингаляционные растворы также могут быть составлены в сжиженном пропелленте для доставки аэрозоля. В другом составе растворы можно распылять. Для легочной доставки размер частиц должен быть подходящим для доставки в дистальные отделы легкого. Например, размер частиц может быть от 1 мкм до 5 мкм, однако, можно использовать более крупные частицы, например, если каждая частица является достаточно пористой.

Определенные составы, содержащие молекулу GM-CSF, раскрытую в настоящем документе, можно вводить перорально. Составы, вводимые таким образом, могут быть получены с носителями или без них, которые обычно используются при получении твердых дозированных форм, таких как таблетки и капсулы. Например, капсула может быть разработана для высвобождения активной части состава в той точке желудочно-кишечного тракта, где биодоступность является максимальной, а пресистемное разрушение сведено к минимуму. Дополнительные агенты могут быть включены для облегчения абсорбции селективного связывающего агента. Разбавители, ароматизаторы, воски с низкой температурой плавления, растительные масла, смазывающие вещества, суспендирующие агенты, агенты распадаемости таблетки и связующие вещества также могут быть использованы.

Другой препарат может включать эффективное количество молекулы GM-CSF в смеси с нетоксичными вспомогательными веществами, которые подходят для получения таблеток. Путем растворения таблеток в стерильной воде или другом подходящем носителе растворы могут быть получены в форме стандартной дозы. Подходящие вспомогательные вещества включают без ограничения инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат или бикарбонат натрия, лактоза или фосфат кальция, или связующие агенты, такие как крахмал, желатин или гуммиарабик, или смазывающие агенты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк.

«Фармацевтически приемлемый» может относиться к одобренному или одобряемому регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или указанному в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных, включая человека.

«Фармацевтически приемлемая соль» может относиться к соли соединения, которая является фармацевтически приемлемой и обладает желаемой фармакологической активностью исходного соединения.

«Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или адъювант» может относиться к вспомогательному веществу, носителю или адъюванту, который можно вводить субъекту вместе с по меньшей мере одним антителом согласно

настоящему изобретению, который не нарушает его фармакологическую активность и нетоксичен при введении в дозах, достаточных для доставки терапевтического количества соединения.

«Фармацевтически приемлемый носитель» может относиться к разбавителю, адъюванту, вспомогательному веществу или носителю, с которым вводят по меньшей мере одно антитело согласно настоящему изобретению.

Терапевтическое применение

Согласно одному аспекту молекулы GM-CSF, раскрытые в настоящем документе, содержат пептид GM-CSF для лечения, облегчения, ингибирования и/или профилактики одного или нескольких заболеваний и/или состояний. Согласно некоторым вариантам осуществления заболеванием или состоянием является неврологическое заболевание или состояние. Неограничивающие примеры неврологических заболеваний или состояний включают болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или заболевания или состояния, характеризующиеся нейровоспалением. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой воспалительное заболевание или состояние. Неограничивающие примеры воспалительных заболеваний или состояний включают болезнь Крона и колит. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой инфекционное заболевание. Инфекционное заболевание может содержать цитомегаловирусную инфекцию. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит болезнь Паркинсона (PD). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит латеральный амиотрофический склероз (ALS). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит болезнь Альцгеймера (AD). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит травматическое повреждение мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит воспалительное заболевание кишечника (IBD), включая колит и болезнь Крона (CD). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит острый лучевой синдром. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит рак.

Согласно некоторым вариантам осуществления молекулу GM-CSF, раскрытую в настоящем документе, вводят субъекту после индукционной химиотерапии. Молекула GM-CSF может сократить время восстановления нейтрофилов и/или снизить частоту инфекций. В некоторых случаях у субъекта обнаруживается острый миелогенный лейкоз.

Согласно некоторым вариантам осуществления молекулу GM-CSF, раскрытую в настоящем документе, вводят для мобилизации гемопоэтических клеток-предшественников в периферической крови для сбора с помощью лейкофереза. Мобилизация может обеспечить сбор большего количества клеток-предшественников, способных к приживлению, по сравнению со сбором без мобилизации. После химиотерапии, такой как миелоаблативная химиотерапия, трансплантация увеличенного

количества клеток-предшественников может привести к более быстрому приживлению трансплантата.

Согласно некоторым вариантам осуществления молекулу GM-CSF, раскрытую в настоящем документе, вводят для ускорения миелоидного восстановления у субъекта, страдающего неходжкинской лимфомой (NHL). Согласно некоторым вариантам осуществления молекулу GM-CSF, раскрытую в настоящем документе, вводят для ускорения миелоидного восстановления у субъекта, страдающего острым лимфобластным лейкозом (ALL). Согласно некоторым вариантам осуществления молекулу GM-CSF, раскрытую в настоящем документе, вводят для ускорения миелоидного восстановления у субъекта, страдающего болезнью Ходжкина. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту проводят аутологичную трансплантацию костного мозга (BMT). Введение GM-CSF может ускорить приживление миелоидного трансплантата по сравнению с миелоидным трансплантатом без введения GM-CSF. Введение GM-CSF может уменьшить среднюю продолжительность введения антибиотиков по сравнению с продолжительностью без введения GM-CSF. Введение может уменьшить среднюю продолжительность инфекционных эпизодов по сравнению с отсутствием введения молекулы GM-CSF. Введение может сократить среднюю продолжительность госпитализации по сравнению с отсутствием введения молекулы GM-CSF. Гематологический ответ на GM-CSF можно обнаружить с помощью полного анализа крови.

Согласно некоторым вариантам осуществления молекулу GM-CSF, раскрытую в настоящем документе, вводят для ускорения миелоидного восстановления у субъектов, перенесших аллогенную BMT от HLA-совместимых родственных доноров.

Согласно некоторым вариантам осуществления молекулу GM-CSF, раскрытую в настоящем документе, вводят субъекту, перенесшему аллогенную или аутологичную трансплантацию костного мозга (BMT), при котором приживление трансплантата было замедлено или не удалось. Введение может продлить выживание субъекта. Рекомбинантный человеческий GM-CSF применяют при различных нарушениях кроветворения, включая снижение тяжести вызванной химиотерапией нейтропении, ускорение восстановления кроветворения после трансплантации костного мозга и мобилизацию клеток-предшественников крови для трансплантации. Однако рекомбинантный GM-CSF имеет короткий период полувыведения у людей и обычно вводится путем ежедневных инъекций в течение 15-21 дня после химиотерапии. Необходимость ежедневного введения также ограничивает привлекательность GM-CSF для пациентов, проходящих химиотерапию, и для лечения пациентов, подвергшихся облучению, таких как пациенты ARS. Соответственно, настоящее изобретение относится к способам применения молекул GM-CSF длительного действия при таких состояниях, включая острый лучевой синдром.

[005] Кроме того, предварительные доклинические результаты показали, что GM-CSF может защищать и лечить клетки от повреждений или побочных эффектов

радиационной токсичности. GM-CSF может способствовать более быстрому заживлению поврежденных радиацией тканей.

Для того, чтобы оценить эффективность GM-CSF у людей, были проведены ретроспективные анализы пациентов, которые проходят курс лечения рака и у которых после лучевой терапии произошло повреждение клеток. Было обнаружено, что у пациентов, получавших GM-CSF до лучевой терапии, лечение улучшило состояние, причем у некоторых наблюдалось заживление поврежденных тканей быстрее, чем в контрольных группах. Соответственно, способы согласно настоящему изобретению предусматривают лечение молекулой GM-CSF согласно настоящему изобретению субъекта, который будет подвергаться лучевой терапии, подвергается лучевой терапии или прошел лучевую терапию.

Согласно некоторым вариантам осуществления молекулу GM-CSF, раскрытую в настоящем документе, вводят при остром лучевом синдроме. Молекула GM-CSF может увеличить выживаемость у субъектов, подвергшихся миелосупрессивным дозам облучения (гематопоэтический синдром острого лучевого синдрома, H-ARS). Миелосупрессия возникает, когда радиация повреждает костный мозг. Подавление костного мозга блокирует выработку клеток крови. Молекула GM-CSF может способствовать восстановлению клеток костного мозга, которые развиваются в лейкоциты. Следовательно, GM-CSF можно также использовать для лечения и/или профилактики инфекции.

GM-CSF играет критическую роль в иммуномодуляции и гемопоэзе. Не ограничиваясь теорией, экспериментальные данные указывают на то, что GM-CSF, который часто повышающе регулируется при множестве типах рака человека, помечает раковые клетки, на которые нацелена иммунная система. Активация рецепторов GM-CSF способствует выживанию, росту и дифференцировке многих различных типов иммунных клеток, включая нейтрофилы, макрофаги и различные Т-клетки, в дополнение к прямому стимулирующему действию на множество иммунных функций. Предварительные доклинические результаты показали, что GM-CSF может различными способами стимулировать иммунную систему, чтобы остановить или задержать рост опухолевых клеток. GM-CSF может увеличить количество иммунных клеток, обнаруживаемых в костном мозге или периферической крови. GM-CSF также может вызывать обширное разрушение опухоли.

Для оценки эффективности GM-CSF для иммуноонкологии проводили ретроспективный анализ пациентов с диагнозом рак. Было обнаружено, что у тех, кто получал GM-CSF, лечение улучшало их состояние. У некоторых пациентов, получавших GM-CSF, лечение замедляло рост опухоли по сравнению с контрольными группами. Кроме того, у некоторых пациентов, получавших GM-CSF, размер опухоли уменьшился по сравнению с контрольными группами. Эти результаты позволяют предположить, что GM-CSF может создавать благоприятную среду для презентации опухолевого антигена.

Соответственно, способы предусматривают лечение субъекта, страдающего раком, молекулой GM-CSF, раскрытой в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления способы согласно настоящему изобретению предусматривают лечение субъекта, страдающего деменцией, такой как болезнь Альцгеймера, сосудистая деменция, церебральная амилоидная ангиопатия (CAA).

Предварительные доклинические результаты показали, что GM-CSF быстро снижает отложение амилоида в головном мозге и полностью устраняет нарушения памяти у трансгенных мышинных моделей болезни Альцгеймера (AD). Был проведен ретроспективный анализ исследования когнитивных функций пациентов, которые перенесли трансплантацию гемопоэтических клеток в связи с раком и у которых развились когнитивные нарушения в результате химиотерапии или облучения (NCT01409915). У пациентов, получавших колониестимулирующий фактор (CSF) для стимуляции костного мозга и восстановления функции иммунной системы, было обнаружено, что у тех, кто получал GM-CSF плюс G-CSF, значительно улучшались когнитивные функции по сравнению с теми, кто получал только G-CSF. Эти результаты в сочетании с накопленными более чем за два десятилетия данными о безопасности использования рекомбинантного белка GM-CSF у пожилых лейкопенических пациентов подтверждают применение GM-CSF в качестве лечения для устранения церебральной амилоидной патологии и когнитивных нарушений при AD.

Способы лечения могут предусматривать введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей одну или несколько молекул GM-CSF, раскрытых в настоящем документе. Композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Молекулы GM-CSF могут быть в значительной степени очищены (например, в значительной степени освобождены от веществ, которые ограничивают их действие или вызывают нежелательные побочные эффекты). Субъектом может быть животное, включая без ограничения таких животных, как коровы, свиньи, овцы, козы, кролики, лошади, куры, кошки, собаки, мыши и т.д. Субъектом может быть млекопитающее. Субъектом может быть человек. Субъектом может быть примат, не относящийся к человеку. Субъектом может быть бык. Субъектом может быть птица, рептилия или амфибия.

Настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ предусматривает введение субъекту композиции, содержащей молекулу GM-CSF, содержащую пептид GM-CSF, соединенный с каркасом, содержащим переменный домен антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления заболеванием или состоянием является неврологическое заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления неврологическое заболевание или состояние содержит болезнь Паркинсона. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит латеральный амиотрофический склероз (ALS). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит болезнь Альцгеймера (AD). Согласно некоторым вариантам осуществления

заболевание или состояние содержит травматическое повреждение мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит воспалительное заболевание кишечника (IBD), включая колит и/или болезнь Крона (CD). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит острый лучевой синдром. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит рак. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулу GM-CSF вводит один раз приблизительно каждые 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дней, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 дней, 32 дней, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц. Варибельный домен антитела может содержать первый полипептид и второй полипептид, где первый или второй полипептид содержат или иным образом соединены с пептидом GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 6. В некоторых случаях первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к молекуле GM-CSF, содержащей варибельный домен антитела, содержащий последовательность легкой цепи, содержащую первый полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 6, и последовательность тяжелой цепи, содержащую второй полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях первый

полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 30. В некоторых случаях первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29. В некоторых случаях второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 28. В некоторых случаях второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к молекуле GM-CSF, содержащей переменный домен антитела, содержащий последовательность легкой цепи, содержащую первый полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31, и последовательность тяжелой цепи, содержащую второй полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29.

Настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ предусматривает введение субъекту композиции, содержащей молекулу GM-CSF, содержащую пептид GM-CSF, соединенный с каркасом, содержащим переменный домен антитела, содержащий последовательность легкой цепи, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 26 (DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKSLASGVP SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCFQGS[X1]PFTFGGGTKLEIKR), где последовательность легкой цепи содержит X1, и X1 содержит GM-CSF, и последовательность тяжелой цепи, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления заболеванием или состоянием является неврологическое заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления неврологическое заболевание или состояние содержит болезнь Паркинсона. Согласно некоторым вариантам осуществления неврологическое заболевание или состояние содержит латеральный амиотрофический склероз (ALS). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит болезнь Альцгеймера (AD). Согласно некоторым

вариантам осуществления заболевание или состояние содержит травматическое повреждение мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит воспалительное заболевание кишечника (IBD), включая колит и/или болезнь Крона (CD). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит острый лучевой синдром. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит рак. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулу GM-CSF вводит один раз приблизительно каждые 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дней, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 дней, 32 дней, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц. GM-CSF может быть человеческим, бычьим или мышинным GM-CSF. GM-CSF может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16. GM-CSF может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 77. GM-CSF может включать вариант или гомолог GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность легкой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 26. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность легкой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 27 (DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLAAGVPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCFQGSQGGSGAKLAALKAKLAALKGGGGGS[X2]GGGGSELALEAELAAGGSGPFTFGGGTKLEIKR), где последовательность легкой цепи содержит X2, и X2 содержит GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность тяжелой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым вариантам осуществления легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам

осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула GM-CSF дополнительно содержит область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека (SEQ ID NO: 25). Пониженная эффекторная функция может содержать пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Область Fc может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3. В некоторых случаях область Fc содержит IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

Настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ предусматривает введение субъекту композиции, содержащей молекулу GM-CSF, содержащую пептид GM-CSF, соединенный с каркасом, содержащим варибельный домен антитела, содержащий последовательность тяжелой цепи, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 42 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR[[X5]]WGQGTLLTVSS), где последовательность тяжелой цепи содержит X6, и X6 содержит пептид GM-CSF, и последовательность легкой цепи, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31. Согласно некоторым вариантам осуществления заболеванием или состоянием является неврологическое заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления неврологическое заболевание или состояние содержит болезнь Паркинсона. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит латеральный амиотрофический склероз (ALS). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит болезнь Альцгеймера (AD). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит травматическое повреждение мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит воспалительное заболевание кишечника (IBD), включая колит и/или болезнь Крона (CD). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит острый лучевой синдром. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит рак. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулу GM-CSF вводят один раз приблизительно каждые 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дней, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 дней, 32 дней, один раз в неделю, два раза в неделю или раз в

месяц. GM-CSF может быть человеческим, бычьим или мышинным GM-CSF. GM-CSF может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16. GM-CSF может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 77. GM-CSF может включать вариант или гомолог GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность тяжелой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 42. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность тяжелой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 43 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGSGAKLAALKAKLAALKGGGGS[[X6]]GGGGSELALEAELAALAEAGGSGDYWGQGLVTVSS), где последовательность тяжелой цепи содержит X6, и X6 содержит GM-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность тяжелой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 43. Согласно некоторым вариантам осуществления легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула GM-CSF дополнительно содержит область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека (SEQ ID NO: 25). Пониженная эффекторная функция может содержать пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Область Fc может содержать последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3.

В некоторых случаях область Fc содержит IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

Настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ предусматривает введение субъекту композиции, содержащей молекулу GM-CSF, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29, и второй полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 96% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 96% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 97% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 97% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 98% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 98% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит SEQ ID NO: 29, и второй полипептид содержит SEQ ID NO: 31. Согласно некоторым вариантам осуществления заболеванием или состоянием является неврологическое заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления неврологическое заболевание или состояние содержит болезнь Паркинсона. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит латеральный амиотрофический склероз (ALS). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит воспалительное заболевание кишечника (IBD), включая колит и болезнь Крона (CD). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит болезнь Альцгеймера (AD). Согласно некоторым вариантам осуществления

заболевание или состояние содержит травматическое повреждение мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит острый лучевой синдром. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит рак. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулу GM-CSF вводят один раз приблизительно каждые 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дней, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 дней, 32 дней, один раз в неделю, два раза в неделю или раз в месяц.

Настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ предусматривает введение субъекту композиции, содержащей молекулу GM-CSF, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 28, и второй полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 28, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 96% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 28, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 96% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 97% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 28, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 97% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 98% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 28, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 98% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 28, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит SEQ ID NO: 28, и второй полипептид содержит SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам осуществления заболеванием или состоянием является неврологическое заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления неврологическое заболевание

или состояние содержит болезнь Паркинсона. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит латеральный амиотрофический склероз (ALS). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит болезнь Альцгеймера (AD). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит травматическое повреждение мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит воспалительное заболевание кишечника (IBD), включая колит и/или болезнь Крона (CD). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит острый лучевой синдром. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит рак. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулу GM-CSF вводят один раз приблизительно каждые 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дней, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 дней, 32 дней, один раз в неделю, два раза в неделю или раз в месяц.

Настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ предусматривает введение субъекту композиции, содержащей молекулу GM-CSF, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2, и второй полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 6. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 6. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 96% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 96% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 6. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 97% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 97% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 6. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 98% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 98% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 6. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2, и второй

полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 6. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит SEQ ID NO: 2 и второй полипептид содержит SEQ ID NO: 6. Согласно некоторым вариантам осуществления неврологическое заболевание или состояние содержит болезнь Паркинсона. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит латеральный амиотрофический склероз (ALS). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит болезнь Альцгеймера (AD). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит травматическое повреждение мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит воспалительное заболевание кишечника (IBD), включая колит и/или болезнь Крона (CD). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит острый лучевой синдром. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит рак. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулу GM-CSF вводят один раз приблизительно каждые 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дней, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 дней, 32 дней, один раз в неделю, два раза в неделю или раз в месяц.

Настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ предусматривает введение субъекту композиции, содержащей молекулу GM-CSF, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 1, и второй полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 1, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 96% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 1, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 96% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 97% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 1, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 97% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере

приблизительно 98% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 1, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 98% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 1, и второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления первый полипептид содержит SEQ ID NO: 1, и второй полипептид содержит SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления заболеванием или состоянием является неврологическое заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления неврологическое заболевание или состояние содержит болезнь Паркинсона. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит латеральный амиотрофический склероз (ALS). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит болезнь Альцгеймера (AD). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит травматическое повреждение мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит воспалительное заболевание кишечника (IBD), включая колит и/или болезнь Крона (CD). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит острый лучевой синдром. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние содержит рак. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулу GM-CSF вводят один раз приблизительно каждые 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дней, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 дней, 32 дней, один раз в неделю, два раза в неделю или раз в месяц.

Введение

Согласно одному аспекту молекулы GM-CSF, содержащие каркас, раскрытый в настоящем документе, обладают длительным действием, имеют период полувыведения больше периода полувыведения пептида GM-CSF отдельно. Такие молекулы GM-CSF можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, один раз каждые 7 дней, один раз каждые 8 дней, один раз каждые 9 дней, один раз каждые 10 дней, один раз каждые 11 дней, один раз каждые 12 дней, один раз каждые 13 дней, один раз каждые 14 дней, один раз каждые 15 дней, один раз каждые 16 дней, один раз каждые 17 дней, один раз каждые 18 дней, один раз каждые 19 дней, один раз каждые 20 дней, один раз каждый 21 день, один раз каждые 22 дня, один раз каждые 23 дня, один раз каждые 24 дня, один раз каждые 25 дней, один раз каждые 26 дней, один раз каждые 27 дней, один раз каждые 28 дней, один раз каждые 29 дней, один раз каждые 30 дней, один раз каждый 31 день, один раз каждые 32 дня или один раз в месяц. Молекулу GM-CSF, раскрытую в настоящем документе, можно вводить приблизительно один раз каждые две недели. Молекулу GM-CSF, раскрытую в настоящем документе, можно вводить приблизительно один раз каждые

три недели. Молекулу GM-CSF, раскрытую в настоящем документе, можно вводить приблизительно один раз каждые четыре недели. Молекулу GM-CSF, раскрытую в настоящем документе, можно вводить приблизительно один раз в месяц. Количество композиций, раскрытых в настоящем документе, которое будет эффективным при лечении, ингибировании и предупреждении заболевания или нарушения, может быть определено стандартными клиническими способами. Кроме того, необязательно можно использовать анализы *in vitro*, чтобы помочь определить оптимальные диапазоны доз. Точная доза, используемая в составе, также может зависеть от пути введения и тяжести заболевания или нарушения и должна быть определена в соответствии с мнением лечащего врача и обстоятельствами каждого пациента. Эффективные дозы могут быть экстраполированы на основе кривых зависимости ответа от дозы, полученных в лабораторных условиях, в тест-системах на животных или в клинических испытаниях. В неограничивающих вариантах осуществления молекулу GM-CSF вводят для лечения болезни Паркинсона.

Фармакологические свойства

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способам улучшения одного или нескольких фармакологических свойств GM-CSF. GM-CSF включает по меньшей мере человеческий, бычий, крысиный и мышинный GM-CSF, и GM-CSF, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичный последовательности согласно SEQ ID NO: 16 или 77. Способ может предусматривать получение молекулы GM-CSF, как например, молекулы GM-CSF, содержащей пептид GM-CSF, соединенный с каркасом, как раскрыто в настоящем документе. Примеры фармакологических свойств могут включать без ограничения период полувыведения, стабильность, растворимость, иммуногенность, токсичность, биодоступность, всасывание, высвобождение, распределение, метаболизм и экскрецию. Высвобождение может относиться к процессу высвобождения GM-CSF из фармацевтического состава. Всасывание может относиться к процессу поступления вещества в кровоток. Распределение может относиться к рассеиванию или распространению веществ по жидкостям и тканям организма. Метаболизация (или биотрансформация, или инактивация) может относиться к распознаванию организмом присутствия чужеродного вещества и необратимому превращению исходных соединений в дочерние метаболиты. Экскреция может относиться к удалению веществ из организма.

Период полувыведения молекулы GM-CSF может составлять по меньшей мере от приблизительно 5 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от приблизительно 10 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от приблизительно 15 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от приблизительно 20 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от приблизительно 25 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от приблизительно 30 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от приблизительно 40 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от приблизительно 50 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от

приблизительно 60 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от
 приблизительно 70 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от
 приблизительно 80 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от
 приблизительно 90 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от
 приблизительно 100 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от
 приблизительно 125 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от
 приблизительно 150 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от
 приблизительно 175 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от
 приблизительно 200 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от
 приблизительно 225 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от
 приблизительно 250 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от
 приблизительно 275 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от
 приблизительно 300 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от
 приблизительно 350 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от
 приблизительно 400 часов до приблизительно 1000 часов, по меньшей мере от
 приблизительно 450 часов до приблизительно 1000 часов или по меньшей мере от
 приблизительно 500 часов до приблизительно 1000 часов. Согласно некоторым вариантам
 осуществления период полувыведения молекулы GM-CSF, как раскрыто в настоящем
 документе, составляет между приблизительно 100 часов и приблизительно 500 часов,
 между приблизительно 150 часов и приблизительно 500 часов, между приблизительно 200
 часов и приблизительно 500 часов, между приблизительно 100 часов и приблизительно
 400 часов, между приблизительно 150 часов и приблизительно 400 часов, между
 приблизительно 200 часов и приблизительно 400 часов или между приблизительно 100
 часов и приблизительно 300 часов. Например, период полувыведения составляет
 приблизительно 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 или 300 часов. Период
 полувыведения может быть измерен в крови, сыворотке и/или плазме человека, крысы или
 мыши. Период полувыведения может быть измерен с использованием способа,
 представленного в примерах в настоящем документе. Период полувыведения может быть
 измерен после введения субъекту молекулы GM-CSF. Время полужизни можно измерить
 после инкубации молекулы GM-CSF в биологическом образце, полученном у субъекта.

Период полувыведения молекулы GM-CSF, содержащей каркас, может быть по
 меньшей мере приблизительно в 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160,
 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 или 500 раз больше, чем
 период полувыведения пептида GM-CSF отдельно (например, сарграмостим). Период
 полувыведения молекулы GM-CSF может быть по меньшей мере приблизительно в 50 раз
 больше, чем период полувыведения пептида GM-CSF отдельно. Период полувыведения
 молекулы GM-CSF может быть по меньшей мере приблизительно в 100 раз больше, чем
 период полувыведения пептида GM-CSF отдельно. Период полувыведения молекулы GM-
 CSF может быть по меньшей мере приблизительно в 200 раз больше, чем период
 полувыведения пептида GM-CSF отдельно. Период полувыведения молекулы GM-CSF

может быть по меньшей мере приблизительно в 300 раз больше, чем период полувыведения пептида GM-CSF отдельно. Период полувыведения молекулы GM-CSF может быть по меньшей мере приблизительно в 400 раз больше, чем период полувыведения пептида GM-CSF отдельно.

Наборы

Кроме того, настоящее изобретение относится к наборам, которые содержат одну или несколько молекул GM-CSF, раскрытых в настоящем документе, или их композиции. Молекулы GM-CSF могут быть упакованы способом, облегчающим их применение для осуществления способов согласно настоящему изобретению. Например, набор содержит молекулу GM-CSF, раскрытую в настоящем документе, упакованную в контейнер с прикрепленной к контейнеру этикеткой или листком-вкладышем, описывающим применение композиции при практическом осуществлении способа. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). Набор может содержать контейнер с содержащейся в нем молекулой GM-CSF. Набор может дополнительно содержать листок-вкладыш, указывающий, что молекулу GM-CSF можно применять для лечения определенного состояния. Альтернативно или дополнительно набор может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер (например, бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), физиологический раствор с фосфатным буфером, раствор Рингера и раствор декстрозы). Набор может дополнительно содержать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая без ограничения другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы. Молекула GM-CSF может быть упакована в стандартную дозированную форму. Набор может дополнительно содержать устройство, подходящее для введения слитого белка антитела в соответствии со специфическим путем введения. Набор может содержать этикетку с описанием применения молекулы GM-CSF.

Примеры

[006] Данные по активности, представленные в следующих примерах, в общем получены с использованием молекул, определенных в примере и проиллюстрированных представленным SEQ ID. Следует понимать, что активности любой молекулы, описанной в настоящем документе, могут усиливаться или ослабляться в зависимости от условий, не относящихся к первичной последовательности, например, от условий экспрессии и очистки.

Пример 1. Получение GM-CSF длительного действия

[007] Экспрессионная конструкция: гены, кодирующие GM-CSF, синтезировали посредством IDT (Coralville, IA) и амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции с использованием ДНК-полимеразы PfuUltra II (Agilent Technologies, CA).

Фрагменты ДНК, кодирующие тяжелые и легкие цепи антител паливизумаба со сниженным связыванием RSV-F и трастузумаба, вместе с линкерами также синтезировали посредством IDT и амплифицировали способом ПЦР. Фрагменты слитых генов собирали в остов pFuse (Invivogen, CA) с использованием Master Mix сборки Gibson (New England Biolabs, MA). Последовательности полученных экспрессионных векторов млекопитающих подтверждали секвенированием ДНК (GENEWIZ, CA). Конструкции, кодирующие слияния в Таблице 1, получены этим способом. На фиг. 7 представлена схема Fab-доменов различных молекул GM-CSF длительного действия, где GM-CSF расположен на аминоконце или CDR каркаса IgG для образования слияния IgG.

[008] Тяжелая цепь молекулы GM-CSF длительного действия содержит константную область тяжелой цепи IgG1 человека с мутациями (E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S) для снижения комплементзависимой и антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности.

[009] Экспрессия и очистка: гены, содержащие тяжелые и легкие цепи каждой молекулы GM-CSF, совместно экспрессировали в соответствии с таблицей 1 путем временной трансфекции в клетках HEK 293F (Life Technologies, CA). Клетки HEK293F культивировали в колбах-шейкерах, содержащих среду FreeStyle (Life Technologies, CA), и встряхивали при 125 оборотах в минуту, 37°C и 5% CO₂. Для трансфекции клетки 293F выращивали до плотности один миллион клеток на мл и трансфицировали легкой цепью, плазмидой тяжелой цепи и 293fectin при соотношении 1:2:6 в соответствии с инструкциями производителя. Среду для экспрессии собирали на 5-й день после трансфекции для сбора секретированных белков. Слитые антитела очищали с помощью хроматографии с белком А (Thermo Fisher, IL) и анализировали с помощью SDS-PAGE и масс-спектрометрического анализа.

Таблица 1. Молекулы GM-CSF длительного действия

Молекула LA-GMCSF	Тяжелая цепь (SEQ ID NO)	Легкая цепь (SEQ ID NO)	Выход (мг/л)
Her-hGMCSF CDR	28	30	30
Syn-hGMCSF CDR	1	5	11,5-20
Syn-hGMCSF NT (N- концевое HC слияние)	47	48	13,8
Syn-hGMCSF NT (N- концевое LC слияние)	63	64	12,2
Her-mGMCSF CDR	55	56	30
Syn-mGMCSF CDR	59	60	12,3
Syn-mGMCSF NT (N- концевое HC слияние)	51	52	20,7
hGMCSF-hIgG1 Fc	67	-	3

mGMCSF-hIgG1 Fc	68	-	3
-----------------	----	---	---

[0010] Подтверждение отсутствия Fc, вызванного семью точечными мутациями: для подтверждения того, что семь точечных мутаций в Fc слитых белков могут значительно уменьшить нежелательные эффекты ADCC и CDC, опосредованные взаимодействиями с рецептором Fcγ, антитело, содержащее терапевтический пептид (INVKCSLPQQCSIKPCKDAGMRFGKCMNKKCRCYS, SEQ ID NO: 77), расположенный в CDR3 тяжелой цепи антитела, содержащий мутантную Fc (SEQ ID NO: 25, Fc-null) или Fc IgG1 дикого типа, меченный Alexa Fluor 488, инкубировали с THP-1, моноцитарной клеточной линией человека с высокой экспрессией рецептора Fcγ. Слитое антитело Fc-null не связывалось с THP-1 при концентрациях до 100 нМ, в то время как слитое антитело с Fc IgG1 дикого типа значительно связывалось с THP-1 при таких низких концентрациях, как 1 нМ.

Пример 2. Характеристики и активности in vitro молекул GM-CSF длительного действия

[0011] Определяли биологическую активность молекул GM-CSF, полученных в примере 1, в анализе пролиферации TF-1. Лейкоциты человека TF-1 (ATCC, CRL-2003) культивировали в среде RPM1640, состав ATCC, дополненный 10% фетальной телячьей сывороткой (FBS) при 37°C и 5% CO₂. Для анализа пролиферации клетки 5 раз промывали PBS для удаления FBS. Слияния GM-CSF или коммерческий стандарт GM-CSF (R&D systems) добавляли к клеткам в 96-луночных планшетах при плотности 5000 клеток/луночка в 150 мкл среды RPM1640 с 2% FBS. После 72 часов инкубации в каждую лунку добавляли 15 мкл AlamarBlue (Invitrogen, DAL1025) и измеряли флуоресцентный сигнал при 565/595 нм после 4 часов инкубации при 37°C с 5% CO₂. Соответствующие данные показаны на фиг. 6A-B и в Таблице 2.

Таблица 2. Характеристики молекул GM-CSF длительного действия

Молекула GM-CSF	EC ₅₀ (пМ)	Произведено	Молекулярная масса (Да)
Her-hGMCSF CDR (Her hGMCSF CDR на фиг. 6B)	6,4 (рекомбинантный человеческий GM-CSF «rhGM-CSF» 0,7)	FreeStyle 293	HC 66508.22 LC 23443.1
Syn-hGMCSF CDR (Syn hGMCSF CDR3L на фиг. 6A)	60-69 (12,9X по сравнению с rhGM-CSF)	FreeStyle 293	HC 49065.6 LC 41355.7
Syn-hGMCSF NT (N-концевое HC слияние)	34,6 (8,7X по сравнению с	FreeStyle 293	HC 64528 LC 23182

(NhGM Syn HC на фиг. 6А)	rhGM-CSF)		
Syn-hGMCSF NT (N-концевое LC слияние) (NhGM Syn LC на фиг. 6А)	43,8 (10,9X по сравнению с rhGM-CSF)	FreeStyle 293	HC 49065.6 LC 38644.4
hGMCSF-hIgG1 Fc	25 (8,9X по сравнению с rhGM-CSF)	FreeStyle 293	41431.82
Her-mGMCSF CDR	21,3 (10.X по сравнению с rhGM-CSF)	FreeStyle 293	HC 66142.87 LC 23443.1
Syn-mGMCSF CDR	40,1 (5,9X по сравнению с rmGM-CSF)	FreeStyle 293	HC 49065.61 LC 40990.34
Syn-mGMCSF NT (N-концевое HC слияние)	47,5 (7,0X по сравнению с rmGM-CSF)	FreeStyle 293	HC 64162.69 LC 23181.98
Syn-mGMCSF NT (N-концевое LC слияние)	131 (14,7X по сравнению с rmGM-CSF)	FreeStyle 293	HC 49065.61 LC 38279.06
mGMCSF-hIgG1 Fc	44,7 (6,6X по сравнению с rmGM-CSF)	FreeStyle 293	41066.47
rh GM-CSF	0,7-1,7	Происходящий из E. coli рекомбинантный человеческий белок GM-CSF от R&D system	
rm GM-CSF	3,1-15,7	Происходящий из E. coli	

		рекомбинантный мышинный белок GM-CSF от R&D system	
--	--	---	--

Пример 3. Фармакокинетическая (PK), фармакодинамическая (PD) и *in vivo* эффективность GM-CSF длительного действия у крыс

[0012] Фармакокинетический анализ на крысах: Образцы белков GM-CSF длительного действия вводили внутривенно крысам Sprague-Dawley в однократной дозе 10 мг/кг или внутривенно мышам в дозе 3 мг/кг или 10 мг/кг. Образцы крови брали в различные моменты времени. Образцы хранили в гепаринизированных пробирках для сбора, центрифугировали и хранили при -80°C до дальнейшей обработки. После оттаивания и надлежащего разведения образца количество антител в каждом образце крови определяли количественно с помощью ELISA. Данные анализировали с помощью программы моделирования фармакокинетики (WinNonlin, Certara, NJ) для определения фармакокинетических параметров. Эксперименты проводили с использованием молекул из таблицы 1, данные представлены на фиг. 8А-В и в Таблице 3. На Фиг. 8А показаны концентрации Syn-hGMCSF CDR и Her-hGMCSF CDR в плазме крыс с течением времени. На фиг. 8В показаны концентрации Syn-mGMCSF CDR и Syn-mGMCSF NT (N-концевое HC слияние) в плазме мышей с течением времени. Syn-hGMCSF CDR и Her-hGMCSF CDR показали увеличение периода полувыведения по сравнению с рекомбинантным GM-CSF ($t_{1/2}$ составляет приблизительно 200 ч по сравнению $t_{1/2}$ сарграмостима $< 0,5$ ч). hGMCSF CDR слияние показало C_{\max} 2,481 нМ и AUC_{∞} (ч*нМ) 63,257.

[0013] Анализ T_{reg} : На фиг. 9 показано, что субхроническое лечение Syn-mGMCSF CDR (показанным как Syn-GMCSF) значительно повышает увеличение T_{reg} у мышей. На фиг. 10 показано, что один GM-CSF Her-hGMCSF CDR длительного действия повышал увеличение T_{reg} в течение до 14 дней.

[0014] Анализ PK/PD яванских макаков: Образцы Her-hGMCSF CDR вводили внутривенно (IV) или подкожно (SC) яванским макакам ($n=4$, ~ 3 кг, возраст 2-5 лет) в однократной дозе 1 мг/кг (IV), 5-10 мг/кг (IV) или 5-10 мг/кг (SC). Для PK плазмы собирали 13 временных точек: до введения дозы, 10 мин (для SC=30 мин), 1, 3, 10, 24, 48, 72, 120, 168, 240, 336 и 504 часа. Образцы крови собирали для проточной цитометрии для 6 временных точек: до введения дозы, через 72, 120, 240, 336 и 504 часа. Явных негативных клинических признаков не было. Как показано на фиг. 11, Her-hGMCSF CDR повышал зависимым от дозы образом циркулирующие T_{reg} с пиковым увеличением T_{reg} на 8-й день и до 20-кратного увеличения в группах, получавших дозу 5 мг/кг.

[0015] In vivo эффективность: анализ описан далее в Примере 4.

[0016] Воздействие на головной мозг у мышей: GMCSF длительного действия (Her-hGMCSF CDR и Her-mGMCSF CDR) активно транспортируется в мозг мышей, как показано на фиг. 12. Образцы белков GM-CSF длительного действия вводили внутривенно

мышам CD1 (n=4, самки, возраст 12 недель) в однократной дозе 10 мг/кг. Ткани головного мозга собирали через 3 часа после введения дозы. Образцы головного мозга растирали на сухом льду и переносили в пробирки для гомогенизации, предварительно заполненные керамическими шариками диаметром 1,4 мм. Ткани гомогенизировали в буфере RIPA с добавлением ингибиторов протеазы. После центрифугирования при 4 °С в течение 30 минут при 1,7000 g собирали надосадочную жидкость и измеряли концентрацию белка. Для анализа ELISA планшеты покрывали 2,5 мкг/мл антитела против Fc IgG человека при 37 °С в течение 2 часов с последующей промывкой и блокированием с помощью 2% обезжиренного молока в 0,5% PBST в течение 1 часа. После добавления стандартного белка и разведенных образцов планшеты инкубировали при 4 °С в течение ночи и промывали 0,5% PBST. Затем 1 мкг/мл анти-человеческого или мышинового GMCSF антитела добавляли в лунки и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После промывки добавляли 0,5 мкг/мл HRP-связанного антитела против мышинового IgG, а затем 1 час инкубировали при комнатной температуре. В лунки добавляли предварительно нагретый субстрат TMB и инкубировали в темноте 10 минут при комнатной температуре. Поглощение при 450 нМ измеряли с помощью устройства для считывания микропланшетов.

Таблица 3. Фармакокинетика, фармакодинамика и эффективность in vivo GM-CSF длительного действия

Молекула GMCSF	PK $t_{1/2}$ (ч) у крыс	In vivo PD (T_{reg})	In vivo эффективность
Her-hGMCSF CDR	~200 ч	Повышенные T_{reg}	n/a
Syn-hGMCSF CDR	~200 ч	требуется яванские макаки	n/a
Syn-hGMCSF NT (N-концевое HC слияние)	n/a	требуется яванские макаки	n/a
Her-mGMCSF CDR	n/a	Повышенные T_{reg}	нейропротективное действие
Syn-mGMCSF CDR	7-17 ч (см. фиг. 8B «CDR»)	Повышенные T_{reg}	нейропротективное действие
Syn-mGMCSF NT (N-концевое HC слияние)	7-17 ч (см. фиг. 8B «N-конец»)	Повышенные T_{reg}	n/a
rGM-CSF	< 0,5 ч	Слегка повышенные T_{reg}	нейропротективное действие у мышей МРТР-Тх

n/a - не оценено

Пример 4. Нейропротективное действие и противовоспалительные свойства длительного действия GM-CSF

[0017] Болезнь Паркинсона (PD) характеризуется потерей дофаминергических нейронов вдоль нигростриарного пути. Иммунная дисфункция и нейровоспаление связаны с прогрессированием заболевания и потерей нейронов. Дисфункция врожденного иммунитета при PD связана с повышенной продукцией провоспалительных цитокинов, микроглиозом, уровнями активных форм кислорода и нейротоксинов, все из которых обладают способностью влиять на гибель нейронов. Подобным образом, дисфункции адаптивного иммунного ответа при PD включают снижение уровня T-клеток CD4+, наличие эффекторных T-клеток памяти, снижение уровня регуляторных T-клеток (T_{reg}) и повышение частоты Th1 и Th17 T-эффекторных T-клеток (T_{eff}). Без ограничения конкретной теорией, эти иммунные изменения могут способствовать патогенезу заболевания. Подобные адаптивные иммунные aberrации наблюдали при латеральном амиотрофическом склерозе (ALS), болезни Альцгеймера (AD) и болезни Крона (CD), что указывает на критическую роль T_{reg} в подавлении воспаления.

[0018] После обработки мышей GM-CSF длительного действия полный анализ крови и биохимический профиль крови определяли с помощью проточного цитометрического анализа. Нейропротективное действие и противовоспалительные свойства GM-CSF длительного действия оценивали на 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридиновой (MPTP) модели болезни Паркинсона. Обработка GM-CSF длительного действия приводила к индукции T_{reg} и усилению иммуносупрессивной функции T_{reg}.

[0019] Применение композиции GM-CSF длительного действия вызывало нейропротекторную иммунную трансформацию на периферии. Наблюдаемый фенотипический сдвиг и нейропротекторный ответ были выше, чем при использовании рекомбинантного GM-CSF (rGM-CSF), что позволяет предположить, что GM-CSF длительного действия может быть кандидатом для лечения PD и других нейродегенеративных заболеваний.

Способы

[0020] Животные, обработка GM-CSF антителами и интоксикация MPTP

[0021] Самцов мышей C57BL/6 (возраст 6-8 недель) получали у Jackson Laboratories. После акклиматизации мышам внутрибрюшинно (i.p.) инъецировали GM-CSF Her-mGMCSF CDR длительного действия (SEQ ID NO: 55, 56). Для изучения ответа на дозу мышам вводили одну инъекцию в диапазоне доз от 0 мг/кг до 30,0 мг/кг. Для инъекций белка rGM-CSF (рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) мышам вводили либо однократную инъекцию (1X), либо 5 ежедневных инъекций (5X) перед умерщвлением или интоксикацией MPTP в дозе 0,1 мг/кг. Для экспериментов по нейропротекции мышам вводили либо носитель (DPBS, 10 мл/кг массы тела), либо гидрохлорид 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина

(МРТР-НС1), восстановленный в PBS, полученный у Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Мышам вводили 4 подкожных инъекции МРТР-НС1 (16 мг/кг, свободное основание МРТР), одну инъекцию с 2-часовыми интервалами. Меры безопасности МРТР были выполнены в соответствии с протоколом безопасности и обработки МРТР. На 2-й и 7-й дни после интоксикации МРТР мышей умерщвляли и забирали головной мозг для обработки. Всех животных содержали и поддерживали в соответствии с институциональными рекомендациями Национального института здравоохранения и одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) при University of Nebraska Medical Center.

[0022] Перфузии и иммуногистохимия

[0023] Под терминальной анестезией (Fatal Plus, пентобарбитал) мышам перфузировали через сердечную пункцию DPBS с последующим введением 4% параформальдегида (Sigma-Aldrich) в DPBS. После перфузии весь головной мозг собирали и обрабатывали для оценки выживаемости дофаминергических нейронов в черной субстанции и полосатом теле. Замороженные срезы среднего мозга нарезали до 30 мкм, иммуноокрашивали анти-тирозингидроксилазой (TH) (анти-TH, 1:2000, EMD Millipore) и контрастно окрашивали на базофильное вещество. Для оценки дофаминергических окончаний срезы полосатого тела также метили анти-TH (1:1000, EMD Millipore). Для микроглиального мечения срезы среднего мозга иммуноокрашивали комплексом антигенов против макрофагов-1 (Mac-1) (анти-CD11b, 1:1000, AbD Serotech). Для визуализации всех тканей, меченных антителами, срезы инкубировали в растворе стрептавидин-пероксидазы хрена (HRP) (ABC Elite Vector Kit, Vector Laboratories), окрашивание создавали с помощью системы генерации окраски глюкозооксидазой и инкубировали с диаминобензидиновым (DAB) хромогеном (ACROS Organics) для визуализации. В SN общее количество клеток Mac-1+, TH+Nissl+ (дофаминергические нейроны) и TH-Nissl+ (недофаминергические нейроны) оценивали с помощью стереологического анализа с использованием программного обеспечения Stereo Investigator в модуле оптического фракционирования (MBF Bioscience). Денситометрический анализ окончаний дофаминергических нейронов в полосатом теле определяли с использованием программного обеспечения Image J (National Institutes of Health).

[0024] Выделение Т-клеток CD4+

[0025] Через пять дней после однократного введения Her-mGMCSF CDR или 5 доз rGM-CSF мышей-доноров умерщвляли и получали суспензии одиночных клеток из селезенки. Для исследования геномики все клетки CD4+ выделяли с использованием набора EasySep Mouse CD4+ T Cell Isolation Kit (StemCell) в соответствии с инструкциями производителя. Для анализа пролиферации CD4+CD25+ T_{reg} и CD4+CD25-обычные респондерные Т-клетки (Tresp) выделяли из селезенки с использованием набора EasySep Mouse CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit II (StemCell) в соответствии с инструкциями производителя. Чистоту выделенных клеток оценивали с помощью

проточного цитометрического анализа, и было определено, что она составляет >90% для всех выделений.

[0026] Оценки посредством проточной цитометрии

[0027] Через пять дней после лечения собирали цельную кровь и селезенку для определения профилей Т-клеток и В-клеток с помощью проточного цитометрического анализа. Цельную кровь (50 мкл) и спленоциты (1×10^6) флуоресцентно метили с использованием антител против внеклеточных маркеров CD3, CD4, CD25, CD8, CD19 и внутриклеточного маркера FoxP3. Кровь и спленоциты мышей метили PerCP-Cy5.5-анти-CD3 (eBioscience), PE-Cy7-анти-CD4 (eBioscience), PE-анти-CD25 (eBioscience), FITC-анти-CD8 (eBioscience) и PE-анти-CD19 (eBioscience). Для внутриклеточного окрашивания клетки подвергали пермеабиллизации в течение 45 мин при 4°C с использованием набора буферов для окрашивания FoxP3/фактор транскрипции (eBioscience). Затем клетки метили APC-анти-FoxP3 (eBioscience) с последующей фиксацией. Образцы анализировали с помощью проточного цитометра LSRII и программного обеспечения FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA). Все частоты клеток определяли из общей популяции лимфоцитов.

[0028] Химия крови и оценка периферической крови

[0029] Во время умерщвления 250 мкл цельной крови собирали в пробирки для сбора крови с K2EDTA для проведения развернутого анализа крови (CBC) или в пробирки для сбора гепаринизированной крови для определения биохимического состава крови и уровней метаболитов. После выделения гепаринизированную кровь центрифугировали и собирали плазму. Полные метаболические панели получали с использованием картриджей VetScan Chemistry Comprehensive Test (Abaxis) на устройстве VetScan VS2. Для анализа CBC цельную кровь, собранную из пробирок с K2EDTA, немедленно анализировали на устройстве VetScan HM5.

[0030] Статистические анализы

[0031] Все значения выражены как среднее \pm SEM. Различия в средних значениях между группами анализировали с использованием ANOVA с последующим апостериорным тестом Ньюмана-Кейлса (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Сравнение наклона и подъема для анализов ингибирования CFSE оценивали с использованием линейной регрессии. Наклоны для всех линий были значительно отличны от нуля, а значения анализа линейной регрессии выражены на соответствующих графиках или отмечены в подписях к рисункам.

Результаты

[0032] Обработка GM-CSF длительного действия значительно увеличивает уровни CD4+CD25+FoxP3+ в крови и селезенке и усиливает иммунодепрессивную функцию.

[0033] Анализ проточной цитометрии популяций лимфоцитов в периферической крови показал, что обработка Her-mGMCSF CDR не влияет на уровни CD8+ (фиг. 1A). Однако уровни CD4+ были значительно снижены (фиг. 1B). Напротив, только обработка 30,0 мг/кг Her-mGMCSF CDR значительно повышала частоту клеток CD4+CD25+Foxp3+

по сравнению с контрольными уровнями (фиг. 1C). Обработка повышенной дозой rGM-CSF не изменяет уровни CD8⁺ или CD4⁺ (фиг. 1D и фиг. 1E), но приводит к незначительному повышению уровней CD4⁺CD25⁺FoxP3 (фиг. 1F). Анализ проточной цитометрии популяций лимфоцитов селезенки после обработки Her-mGMCSF CDR показал слегка отличающиеся результаты. Обработка Her-mGMCSF CDR приводила к значительному снижению уровней CD8⁺ при обработке 3,0 мг/кг, 10,0 мг/кг и 30,0 мг/кг (фиг. 1G) и не вызывала значительных изменений уровней CD4⁺ (фиг. 1H). Также наблюдалось зависимое от дозы увеличение уровней CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ($R^2=0,72$, $p=0,0337$) (фиг. 1I). Подобно наблюдениям за кровью, обработка rGM-CSF не изменяет уровни CD8 или CD4 (фиг. 1J и фиг. 1K), но также приводит к зависимому от дозы увеличению уровней CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ($R^2=0,78$, $p=0,0197$) (фиг. 1L).

[0034] Предварительная обработка GM-CSF длительного действия ослабляет микроглиоз и оказывает нейропротекторное действие на мышей с интоксикацией МРТР.

[0035] После оценок индукции T_{reg} оценивали способность обработки Her-mGMCSF CDR ослаблять нейровоспалительную реакцию, связанную с интоксикацией МРТР, путем количественного определения уровней реактивных микроглий. Через два дня после интоксикации МРТР после предварительной обработки Her-mGMCSF CDR или rGM-CSF передний средний мозг собирали во время пика воспаления. Реактивность оценивали по наличию микроглий Mac-1⁺ с амeboидной морфологией (фиг. 2). Интоксикация МРТР значительно повысила число реактивных микроглий от $4 \pm 0,8$ клеток/мм² до $70 \pm 6,4$ клеток/мм² по сравнению с контрольной группой PBS (фиг. 2). Обработка Her-mGMCSF CDR значительно снижала количество реактивных микроглий до 47 ± 4 клеток/мм² для 1,0 мг/кг, $49 \pm 5,5$ клеток/мм² для 3,0 мг/кг, $46 \pm 6,8$ клеток/мм² для 5,0 мг/кг и $33 \pm 3,6$ клеток/мм² для 10,0 мг/кг по сравнению с только интоксикацией МРТР. Обработка 0,1 мг/кг rGM-CSF также снижала нейровоспалительную реакцию, уменьшая число клеток до $46 \pm 5,6$ клеток/мм².

[0036] Оценивали нейропротективную способность предварительной обработки Her-mGMCSF CDR на мышинной модели МРТР (фиг. 3). После интоксикации МРТР число дофаминергических нейронов значительно снизилось от 9313 ± 418 до 4873 ± 211 по сравнению с контрольной группой PBS (фиг. 3). Предварительная обработка однократной дозой 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1,0 мг/кг или 3,0 мг/кг Her-mGMCSF CDR не привела к существенному выживанию нейронов, что привело к 3891 ± 248 , 3631 ± 364 , 5104 ± 488 , и 5089 ± 378 нейронов после обработки. Однако обработка 5,0 мг/кг и 10,0 мг/кг Her-mGMCSF CDR приводила к значительному нейропротективному действию по сравнению с только интоксикацией МРТР, что приводило к сохранению нейронов на 81% и 76%, соответственно. Для сравнения, обработка с 5 последовательными дозами 0,1 мг/кг rGM-CSF также значительно сохраняет количество дофаминергических нейронов, повышая выживаемость от 45% до 78%, соответственно. Однако использование однократной инъекции 0,1 мг/кг rGM-CSF не приводило к нейропротективному действию, что указывает на необходимость последовательного дозирования при использовании rGM-

CSF без длительного действия. Выживаемость окончаний полосатого тела также оценивали с помощью иммуногистохимии для окончаний TH+. Анализ цифровых изображений показал, что обработка МРTP значительно снижала плотность окончаний полосатого тела по сравнению с контролем, обработанным PBS (фиг. 4). Предварительная обработка 1,0 мг/кг, 20,0 мг/кг и 25,0 мг/кг Her-mGMCSF CDR умеренно уменьшала сокращение окончаний полосатого тела, однако уровни были все еще значительно ниже контролей PBS. Обработка всеми другими дозами, включая Her-mGMCSF CDR и rGM-CSF, не защищала окончания полосатого тела, подтверждая мнение о повышенной чувствительности дофаминергических окончаний полосатого тела.

[0037] Оценивали терапевтический потенциал однократной инъекции Her-mGMCSF CDR длительного действия. Мышей подвергали интоксикации МРTP и умерщвляли через два или семь дней после интоксикации для оценки воспалительной реакции и выживаемости дофаминергических нейронов (фиг. 5А и фиг. 5В). Интоксикация МРTP сама по себе приводила к значительному увеличению количества реактивных микроглий Mac-1+ в передней части среднего мозга (фиг. 5А). Обработка Her-mGMCSF CDR за 15 дней до интоксикации МРTP не ослабляла наблюдаемый микроглиоз. Обработка Her-mGMCSF CDR за 10 или 5 дней до этого значительно снизила число реактивных микроглий от 113 ± 7 клеток/мм² до 69 ± 9 и 38 ± 10 клеток/мм². Подобным образом, интоксикация МРTP значительно снижала количество дофаминергических нейронов TH+/Nissl+ от 8418 ± 130 до 6252 ± 292 (фиг. 5В). Однако только обработка Her-mGMCSF CDR за 5 дней до интоксикации МРTP приводила к значительному сохранению нейронов, возвращая количество нейронов к контрольным уровням. В совокупности эти данные указывают на возможную продолжительность терапевтического лечения Her-mGMCSF CDR до 10 дней.

[0038] Эти эксперименты показывают, что периферическая обработка Her-mGMCSF CDR увеличивала частоту и активность T_{reg}, ослабляла нейровоспалительную реакцию и селективно уменьшала нейротоксичность, вызванную МРTP.

[0039] Обработка GM-CSF длительного действия приводит к противовоспалительному фенотипу T-клеток CD4+.

[0040] Исследовали эффект обработки с 10 мг/кг Her-mGMCSF CDR на периферические адаптивные иммунные популяции, особенно T-клетки CD4+. Транскриптомный анализ T-клеток CD4+ после обработки Her-mGMCSF CDR привел к значительному нарушению регуляции многочисленных генов, связанных с дифференцировкой T-клеток, нормализованному относительно контрольных групп, обработанных PBS. Для сравнения, обработка 0,1 мг/кг rGM-CSF приводила лишь к незначительным кратным изменениям в экспрессии генов при нормализации относительно PBS-контролей

Применение GM-CSF длительного действия при нейровоспалительных заболеваниях

[0041] Обработка GM-CSF обладает потенциалом модифицировать нейровоспалительные заболевания на основе его известной противовоспалительной способности и способности индуцировать популяции T_{reg} . Однако препятствием для клинического применения является его относительно короткий период полувыведения и ограниченная биодоступность. Представленные в настоящем документе примеры характеризуют нейропротекторный потенциал состава GM-CSF длительного действия, Her-mGMCSF CDR.

[0042] Обработка Her-mGMCSF CDR приводила к зависимому от дозы увеличению числа T_{reg} , которое могло сохраняться до 10 дней после однократной инъекции, а также приводила к усилению клеточной функции в периферической крови и селезенке по сравнению с таковой, наблюдаемой при лечении rGM-CSF. Повышение числа T_{reg} после однократной инъекции также продлевается в течение до 14 дней после инъекции, что подтверждает его иммуномодулирующий потенциал длительного действия. Аналогично, T_{reg} , выделенные у мышей, получавших Her-mGMCSF CDR, проявляли повышенное антипролиферативное действие и были способны подавлять пролиферацию T_{resp} в большей степени, чем T_{reg} , выделенные у животных, получавших rGM-CSF.

[0043] Ежедневная доза rGM-CSF обладает потенциалом увеличить выживаемость нейронов и уменьшать микроглиоз на моделях нейродегенеративных заболеваний. Благодаря природе длительного действия Her-mGMCSF CDR почти одинаковые уровни нейропротективного действия были достигнуты на мышинной модели MPTP при использовании схемы однократной инъекции. Обработка Her-mGMCSF CDR значительно сохраняет тела дофаминергических нейронов вместе с их проекциями в полосатое тело у мышей с поражением MPTP. Обработка Her-mGMCSF CDR также приводила к более выраженному противовоспалительному ответу, чем обработка rGM-CSF отдельно, о чем свидетельствует снижение микроглиоза в месте поражения. Результирующее снижение популяций реактивных микроглий может быть связано с общим сдвигом противовоспалительного фенотипа, наблюдаемым в общей популяции T-клеток CD4+ после обработки Her-mGMCSF CDR. Интоксикация MPTP в общем приводит к гибели 10% нейронов от самого нейротоксина. Однако для того, чтобы поражение, вызванное MPTP, прогрессировало и проявлялось, требуются T-клетки CD4+ для поддержания воспалительной микросреды в головном мозге. После интоксикации MPTP T-клетки CD4+ преодолевают гематоэнцефалический барьер (BBB), взаимодействуют с микроглиями, меняют свой фенотип и усиливают продукцию провоспалительных и нейротоксических медиаторов.

[0044] Эксперименты, проведенные в примерах, демонстрируют, что молекулы GM-CSF длительного действия, раскрытые в настоящем документе, могут обеспечивать снижение частоты дозирования и повышение биодоступности GM-CSF. Обработка Her-mGMCSF CDR селективно индуцировала популяции T_{reg} более чем в 2 раза и усиливала иммуносупрессивные и антипролиферативные клеточные функции T_{reg} . Обработка Her-mGMCSF CDR сохраняла дофаминергические нейроны в SN после интоксикации MPTP и

снижала соответствующий иммуноопосредованный воспалительный ответ. Уменьшение микроглиоза и результирующее нейропротективное действие были связаны с противовоспалительным и регуляторным фенотипом Т-клеток, обеспечиваемым обработкой Her-mGMCSF CDR. Наряду с его надежным нейропротекторным и противовоспалительным профилем, все результирующие положительные изменения были достигнуты при использовании одной дозы Her-mGMCSF CDR, а не пяти последовательных доз, что подтверждает мнение о том, что лечение GM-CSF длительного действия трансляционно привлекательна и клинически полезна для лечения PD.

[0045] Перечень аббревиатур: AD - болезнь Альцгеймера, ALS - латеральный амиотрофический склероз, CFSE - 5(6)-карбоксихлорофлуоресцеин N-гидроксисукцинимидиловый простой эфир, DAB - 3,3'-диаминобензидин, DPBS - физиологический раствор, забуференный фосфатом Дульбекко, GM-CSF - гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор, HRP - пероксидаза хрена, IPA - анализ пути изобретательности, MPTP - 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин, PBS - физиологический раствор с фосфатным буфером, PD - болезнь Паркинсона, rGM-CSF - рекомбинантный гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор, RT-PCR - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, SEM - стандартная средняя ошибка, TBI - травматическое повреждение мозга, TH- тирозингидроксилаза, UPDRS - унифицированная шкала оценки болезни Паркинсона.

Пример 5. Клинические испытания при болезни Паркинсона

[0046] Рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование однократной/многократной восходящей дозы GM-CSF длительного действия из таблицы 1 (например, Her-hGMCSF CDR, Syn-hGMCSF CDR) проводили на здоровых субъектах и субъектах с болезнью Паркинсона.

[0047] Критерии включения:

[0048] Показания: Идиопатическая болезнь Паркинсона (умеренная идиопатическая болезнь Паркинсона - Hoehn и Yahr 1-3 с брадикинезией плюс еще один признак болезни Паркинсона (тремор покоя или ригидность), прием препаратов для лечения болезни Паркинсона по сравнению с вымыванием.

[0049] Здоровые субъекты по сравнению с пациентами с болезнью Паркинсона: Ph1a: здоровые -> пациенты Ph1b с PD или Ph1a/b: пациенты с PD.

[0050] Количество субъектов на группу (10), 6 групп с возрастающими дозами, случайным образом распределенных для получения GM-CSF длительного действия или плацебо.

[0051] Продолжительность лечения (8 недель вводного периода, 8-26 недель лечения), введение каждые 2-4 недели GM-CSF длительного действия или плацебо и контроль в течение периода наблюдения.

[0052] Критерии исключения: отклонения от нормы на MPT, значительные отклонения в лабораторных показателях.

[0053] Конечные точки:

[0054] Оценка безопасности и переносимости: физикальное и неврологическое обследование, лабораторные анализы, показатели жизненно важных функций и нежелательные явления.

[0055] Фармакокинетические параметры (сыворотка и CSF): максимальная концентрация GM-CSF длительного действия, площадь под кривой и период полувыведения.

[0056] Фармакодинамика: T_{reg} , WBC, лейкоциты, улучшение контроля движения и подвижности, баллы UPDRS.

[0057] Иммуногенность (ADA).

Пример 6. Клинические испытания при трансплантации костного мозга

[0058] Субъектов лечили плацебо или молекулами GM-CSF, проиллюстрированными в настоящем документе, после аутологичной или аллогенной трансплантации костного мозга или клеток-предшественников периферической крови (PBPC). Педиатрические и взрослые пациенты получали внутривенные инфузии молекулы GM-CSF или плацебо раз в две недели в течение 30 дней.

Пример 7. Лечение ALS посредством GM-CSF длительного действия на мышинной модели

[0059] Предыдущие эксперименты показали, что модели ALS на мышах SOD1 предсказывают успех терапии у людей (Cleveland and Rothstein (2001), Nat Rev Neurosci, 2, 806-19). Первичными конечными точками в таких анализах являются как появление двигательных признаков, так и смертность. Например, появление двигательных признаков можно определить как первый день, когда мышь не может оставаться на вращающемся стержне в течение 7 минут при скорости 20 оборотов в минуту (Li, et al (2000), Science, 288, 335-9). Смертность оценивается как день смерти или день, когда дефицит настолько серьезен, что мышь приходится умерщвлять (например, апатия и неспособность контролировать себя). Дополнительные параметры определяются путем измерения двигательной силы с помощью тестов на силу захвата, подсчета двигательных нейронов в спинном мозге, толщины нерва (например, седалищного нерва, диафрагмального нерва) и наличия апоптотических окрашиваний в двигательных нейронах спинного мозга. Молекулы GM-CSF из Таблице 1 вводили через осмотический насос в желудочки головного мозга в заранее определенной дозе, например, 60 мкг/кг массы тела/день. Альтернативно, молекулы GM-CSF вводили внутривенно или внутривентриально в дозе 60 мкг/кг массы тела в день или в более высоких дозах. Лечение начинали на 60-й день на поздней досимптомной стадии мутанта SOD1 G93A. У мышей без обработки с наследственным ALS моторные нарушения появляются в возрасте 12-14 недель, тогда как паралич не наблюдается до 20-ти недельного возраста. Продолжительность жизни 140-170 дней. За мышами наблюдали на предмет эффективного лечения, включая продление жизни по сравнению с контрольной группой более чем на 15% (Cleveland and Rothstein (2001), Nat. Rev. Neurosci., 2, 806-19). В качестве контрольной группы для лечения

использовали животных, получавших как носитель, так и zVADfmk (мощный ингибитор каспазы, который показал эффективность на этой модели). В каждой группе содержит 10 животных.

Пример 8. GM-CSF длительного действия для лечения ALS

[0060] Пациенты с ALS получали лечение молекулой GM-CSF из Таблицы 1 и за ними наблюдали на предмет улучшения двигательной функции.

Пример 9. Лечение острого лучевого синдрома с помощью GM-CSF длительного действия

[0061] Молекулы GM-CSF из Таблицы 1 вводили мышам после облучения для того, чтобы продемонстрировать эффективность в повышении выживаемости после облучения.

[0062] Кратко, для этих исследований использовали мышей *mus musculus/C57BL/6*. LD50/30 представляет собой дозу облучения, которая, как ожидается, вызовет смерть 50% облученной популяции в течение 30 дней. LD 70/30 представляет собой дозу облучения, которая, как ожидается, вызовет смерть 70% облученной популяции в течение 30 дней. Доза облучения, равная LD50/30 или LD70/30, доставляется как однократная доза гамма-излучения всего тела. Эффективность молекул GM-CSF или контроля (носителя) для повышения 30-дневной выживаемости тестировали при различных дозах GM-CSF и различных дозах облучения. Мышей контролировали на выживаемость до 30-го дня. Конечные точки исследования включали 30-дневную общую выживаемость, среднее время выживания (MST) и анализ общего анализа крови (CBC). Повышенный CBC может указывать на ускоренное восстановление кроветворения у мышей, получавших GM-CSF, по сравнению с контрольными мышами, не получавшими GM-CSF. Этот эксперимент повторяли для того, чтобы определить, улучшит ли выживаемость введение молекул GM-CSF перед облучением.

[0063] Эксперименты, подобные описанным в настоящем документе, проводили для того, чтобы определить, улучшает ли введение молекул из Таблицы 1 выживаемость и ускоряет ли восстановление гемопозеза у других видов животных, таких как собаки и обезьяны, после летального облучения. Можно определить дозы облучения, которые соответствуют дозам от LD50 до LD70. Выживаемость можно проследить в течение 30-60 дней после облучения. Частота дозирования и доза белков могут быть скорректированы для того, чтобы отразить различия в скорости клиренса молекул между видами. Для каждой молекулы можно определить оптимальную дозу и режим дозирования.

Пример 10. Лечение радиационной токсичности посредством GM-CSF длительного действия

[0064] Пациентов, подвергающихся лучевой терапии, лечили молекулой GM-CSF из Таблицы 1 перед лучевой терапией, во время лучевой терапии или после лучевой терапии. Пациентов контролировали на предмет уменьшения клеточного повреждения после лучевой терапии.

Пример 10. GM-CSF длительного действия для лечения рака

[0065] Пациентов с диагнозом рак лечили молекулами GM-CSF из Таблицы 1. Пациентов контролировали на предмет замедления роста опухоли и уменьшения размера опухоли.

Пример 11. Лечение болезни Альцгеймера посредством GM-CSF длительного действия на мышинной модели

[0066] Мышей обрабатывали молекулами GM-CSF из Таблицы 1. Определяли, проявляются ли у мышей без обработки ухудшение по сравнению с группами, получавшими лечение.

[0067] *Тестирование водного лабиринта с радиальными рукавами (RAWM) для оценки кратковременной памяти*

[0068] Эксперимент проводили как в общем описано (Arendash et al. (2001), Ethell et al. (2006), Arendash et al. (2007)).

[0069] Кратко, алюминиевую вставку помещали в круглый бассейн для создания 6 радиально распределенных плавательных рукавов, исходящих из центральной круглой плавательной зоны. Ассортимент 2-D и 3-D визуальных сигналов окружает бассейн. Количество ошибок до определения того, какой из 6 плавательных рукавов содержит затопленную спасательную платформу, определяли для 5 испытаний в день в течение 8 дней тестирования до лечения и 4 дней тестирования после лечения. Во время каждого испытания (максимум 60 с) мышь возвращается к стартовому рукаву этого испытания после плавания в неправильном рукаве, и записывают количество секунд, необходимое для обнаружения погруженной платформы. Если мышь не находит платформу в течение 60-секундного испытания, ее направляют к платформе на 30-секундное пребывание. Количество ошибок и латентность спасения считаются показателями рабочей памяти и по времени аналогичны стандартному тестированию регистрации/воспоминания конкретных элементов, используемых в клинической практике при оценке пациентов.

[0070] *Задача когнитивной интерференции*

[0071] Эксперимент проводили как описано (Loewenstein et al. (2004)).

[0072] После завершения тестирования RAWM после лечения (4 дня) всех мышей дополнительно оценивали по новой задаче когнитивной интерференции в течение 6 дней. Эта задача включает два водных лабиринта с радиальными рукавами в двух разных комнатах и 3 разных набора визуальных сигналов. Задача требует, чтобы животные запомнили набор визуальных сигналов для того, чтобы после вмешательства с другим набором сигналов можно было вспомнить первоначальный набор сигналов для успешного решения задачи водного лабиринта с радиальными рукавами.

[0073] Пример 12. Лечение болезни Альцгеймера посредством GM-CSF длительного действия

[0074] Клинические испытания для оценки безопасности и эффективности молекул GM-CSF из таблицы 1 при лечении пациентов с легкими когнитивными нарушениями, вызванными AD.

[0075] Молекулу GM-CSF из Таблицы 1 или плацебо вводили субъектам до 24 недель. Флорбетапир вводили для PET-сканирования для того, чтобы изучить визуализацию исходного уровня головного мозга и изменения при лечении.

[0076] Критерии первичного результата: изменение по сравнению с исходным уровнем стандартизированного коэффициента поглощения, измеренного с помощью PET с использованием флорбетапира F18 (Amyvid) [Временные рамки: от исходного уровня до 24-й недели]

[0077] Вторичные показатели результатов: количество пациентов, у которых возникли нежелательные явления, возникшие после лечения (TEAE) [Временные рамки: неделя 24], изменение по сравнению с исходным уровнем в анализе CSF [Временные рамки: до первой инъекции в 1-й день для использования в качестве исходного уровня для любого необходимого последующего наблюдения и необязательная оценка на 155-й день], МРТ для оценки появления аномалий визуализации, связанных с амилоидом (ARIA) [Временные рамки: при скрининге и в дни 43, 85 и 155], Измерение уровней анти-лекарственное средство антител [Временные рамки: в день 1, 29, 57, 85 и 155]

[0078] Критерии включения:

[0079] Мужчины и женщины ≥ 40 лет и ≤ 80 лет с диагнозом MCI из-за AD в соответствии с критериями Национального института проблем старения - Ассоциации по борьбе с болезнью Альцгеймера (NIA-AA) (промежуточная или высокая вероятность) со спорадическим или семейным типом наследования. Легкие когнитивные нарушения AD определяются как: свидетельствующие о беспокойстве явные изменения в когнитивных функциях по сравнению с предыдущим уровнем у субъекта (субъективные жалобы/ухудшения памяти в течение последнего года в течение более 6 месяцев и/или подтвержденные информантом и/или клиницистом) и объективное нарушение функции памяти, подтвержденное количественным показателем ошибок в разделе отсроченного припоминания когнитивной подшкалы шкалы оценки болезни Альцгеймера (ADAS-cog) $\geq 1,5$ стандартных отклонений (SD) от среднего значения, стратифицированного по возрасту, т.е. возраст 55-69 лет: ≥ 6 ошибок, возраст 70-74 лет: ≥ 7 ошибок, возраст 75+ лет: ≥ 8 ошибок, но без явных нарушений в повседневной жизни (ADL), по мнению исследователя, как оценено согласно Совместному исследованию болезни Альцгеймера (ADCS) ADL, адаптированному к MCI, и доказательства повышенного содержания амилоида в коре головного мозга с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с использованием флорбетапира F18 (Amyvid) (положительное сканирование) посредством качественной оценки в соответствии с этикеткой продукта.

[0080] Наличие специального партнера/лица, осуществляющего уход, который может помочь пациенту с процедурами исследования и введением исследуемого препарата, и находится в компании пациента по меньшей мере 12 часов в неделю.

[0081] Готовность и возможность предоставить подписанное информированное согласие.

[0082] Критерий исключения:

[0083] Предшествующее лечение экспериментальной антиамилоидной терапией.

[0084] Противопоказание для люмбальной пункции, или противопоказание, или невозможность выполнить магнитно-резонансную томографию (МРТ), или наличие в прошлом или планирование в будущем воздействия ионизирующего излучения, которое вместе с излучением, полученным в результате введения индикатора PET, используемого в этом исследовании, превысит применимые институциональные, местные или национальные рекомендации по ежегодному или пожизненному воздействию.

[0085] Модифицированная шкала оценки ишемии по Хачинскому >4.

[0086] Другое неврологическое или психиатрическое состояние (кроме AD), которое может ухудшить когнитивные функции, или компьютерная томография (КТ)/МРТ, свидетельствующая о потенциально значительных внутречерепных аномалиях, не связанных с AD (например, признаки обширного инсульта или лакун в области, важной для когнитивной функции, инфекции, рак, гидроцефалия, рассеянный склероз и т.д.) или аномалиях спинномозговой жидкости (CSF), не соответствующих AD.

[0087] МРТ-признаки >4 микрокровоизлияний: пациенты, которые могут быть склонны к спонтанным аномалиям визуализации, связанным с амилоидом (ARIA-H), и/или могут быть более восприимчивы к побочным эффектам ARIA-H.

[0088] Нелеченое или нестабильное медицинское состояние, которое, по мнению исследователя, может помешать оценке исследования или может потребовать иммуностимулирующего, иммуносупрессивного или иммуномодулирующего лечения (лечений) во время проведения исследования, как например, иммуноглобулин, терапевтические вакцины, цитокины, антицитокиновые моноклональные антитела. Аспления, гипоспления или спленэктомия в анамнезе (независимо от хирургических причин).

[0089] Текущее аффективное или тревожное расстройство, и/или психотическое расстройство, и/или расстройство, связанное с приемом психоактивных веществ, в соответствии с Diagnostic and Statistical Manual of Psychiatric Disorders, Edition IV, text revision (DSM-IV-TR) или DSM-V, или рассматривается суицид или проявляются суицидальные мысли по оценке исследователя.

[0090] Лабораторные отклонения, свидетельствующие о нелеченном медицинском или гематологическом состоянии, которое может увеличить риск или повлиять на результаты исследования, включая нелеченый гипо- или гипертиреоз, дефицит витамина B12, гиперлейкоцитарный синдром (включая без ограничения хронический миелогенный лейкоз, лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому), моноклональную гаммапатию и тромбоцитемию.

[0091] Известные нарушения функции почек или уровень креатинина в сыворотке >150 мкмоль/л.

[0092] Известная дисфункция печени (кроме синдрома Жильбера) или уровень аланинаминотрансферазы (ALT) в сыворотке в ≥ 3 раза выше верхнего предела нормы (ULN).

[0093] Беременная или кормящая женщина.

[0094] Существующая или имеющаяся в анамнезе гиперчувствительность к лекарственным средствам или известная гиперчувствительность к сарграмостиму, продуктам, полученным из дрожжей, любому другому компоненту продукта или бензиловому спирту (присутствует в бактериостатической воде или физиологическом растворе для инфузий).

[0095] Признаки задержки жидкости (клинические или рентгенологические), респираторные симптомы (например, одышка), сердечно-сосудистые симптомы или электрокардиографические признаки сердечного заболевания, которые требуют терапевтического вмешательства (например, суправентрикулярная аритмия).

[0096] Тромбоз глубоких вен (DVT) или легочная эмболия в анамнезе или семейная предрасположенность к DVT или легочной эмболии.

[0097] Женщины и партнеры детородного возраста, не защищенные высокоэффективными методами контрацепции (т.е. пероральными или депо-контрацептивами или внутриматочной спиралью [ВМС] или субъект был стерилизован хирургическим путем) и/или не желающие или неспособные пройти тестирование на беременность, или беременные или кормящие грудью.

[0098] Получатель исследуемого препарата в течение предшествующих 60 дней или в течение 5-кратного периода полувыведения этого препарата, который является самым продолжительным.

[0099] Аллергия на латекс или дрожжевую аллергию в анамнезе.

[00100] Любой пациент, который:

[00101] Вероятно, не будет соблюдать требования, покинет территорию или разлучится с назначенным опекуном/информатором более чем на 3 дня во время исследования,

[00102] не способен к сотрудничеству из-за языковой проблемы или плохого умственного развития, или

[00103] контролирует или реализует любой аспект исследования.

[00104] Вышеизложенное только иллюстрирует принципы настоящего раскрытия. Следует понимать, что специалисты в данной области техники способны разработать различные модификации, которые, хотя и не описаны или не показаны в явном виде, воплощают принципы настоящего изобретения и входят в его сущность и объем. Кроме того, все приведенные примеры и условные формулировки в основном предназначены для того, чтобы помочь при прочтении понять принципы настоящего раскрытия и концепции, внесенные изобретателями в развитие техники, и должны рассматриваться как относящиеся без ограничения к таким конкретно приведенным примерам и условия. Более того, все утверждения при перечислении принципов, объектов и вариантов осуществления настоящего изобретения, а также его конкретных примеров предназначены для охвата как их структурных, так и функциональных эквивалентов. Кроме того, предполагается, что такие эквиваленты включают как известные в настоящее время эквиваленты, так и

эквиваленты, разработанные в будущем, т.е. любые разработанные элементы, выполняющие ту же функцию, независимо от структуры. Таким образом, объем настоящего раскрытия не предназначен для ограничения показанными и описанными примерами. Напротив, объем и сущность настоящего раскрытия раскрыты в прилагаемой формуле изобретения.

Таблица 4. Последовательности антител

Название	SEQ ID NO	Последовательность
GMCSF CDR3L HC аминокислота	1	<u>QVT</u> <u>LR</u> <u>ES</u> <u>GP</u> <u>AL</u> <u>VK</u> <u>PT</u> <u>QT</u> <u>LT</u> <u>LT</u> <u>CT</u> <u>FS</u> <u>GF</u> <u>SL</u> <u>ST</u> <u>SG</u> <u>MS</u> <u>VG</u> <u>W</u> <u>IR</u> <u>QP</u> <u>PG</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>W</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>C</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>Y</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>O</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>K</u>
GMCSF CDR3L VH аминокислота	2	<u>QVT</u> <u>LR</u> <u>ES</u> <u>GP</u> <u>AL</u> <u>VK</u> <u>PT</u> <u>QT</u> <u>LT</u> <u>LT</u> <u>CT</u> <u>FS</u> <u>GF</u> <u>SL</u> <u>ST</u> <u>SG</u> <u>MS</u> <u>VG</u> <u>W</u> <u>IR</u> <u>QP</u> <u>PG</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>W</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>S</u>
GMCSF CDR3L/CDR3 H Fc аминокислота	3	<u>D</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>Y</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>O</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>K</u>
GMCSF CDR3L/CDR3 H CH1 аминокислота	4	<u>A</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>C</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>C</u>
GMCSF CDR3L LC аминокислота	5	<u>D</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>W</u>

		EHVNAIQEARRLLNLSRDТААЕМNETVEVISEMFDLQEPTCLQT RLELYKQGLRGLSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETS CATQII TFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQEGGGGSELAALEAELAAL <u>EAGGSGPFTFGGGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTAS</u> VVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGE C
GMCSF CDR3L VL аминокислота	6	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TITCKCQLSVGYMHWYQQKPGK APKLLIYDTSK LASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCFQSGSGSGAKLAALKAKLAALKGGGGSAP ARSPSPSTQPW EHVNAIQEARRLLNLSRDТААЕМNETVEVISEMFDLQEPTCLQT RLELYKQGLRGLSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETS CATQII TFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQEGGGGSELAALEAELAAL <u>EAGGSGPFTFGGGTKLEIKR</u>
GMCSF CDR3L/CDR3 H CL аминокислота	7	<u>TVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWK</u> <u>VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK</u> <u>VYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC</u>
Линкер c1	8	<u>AKLAALKAKLAALK</u>
Линкер c2	9	<u>ELAALEAELA AEA</u>
Линкер g1	10	<u>GGSG</u>
Линкер g2	11	<u>GGGGS</u>
Линкер a	12	<u>GGSGAKLAALKAKLAALKGGGGS</u>
Линкер b	13	<u>GGGGSELAALEAELA AEAAGGSG</u>
GMCSF CDR3L VL N-концевая aa (FR1)	14	DIQMTQSPSTLSASVGDRV TITC
GMCSF CDR3L VL C-концевая aa (FR4)	15	FGGGTKLEIK
Человечески й GMCSF	16	AP ARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDТААЕМNETVEVISE MFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGLSLTKLKGPLTMMASHYKQHC

		PPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE
Немодифицированная VL	17	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCFQGS GYPFTFGGGTKLEIKR
GMCSF CDR3L вставка аминокислоты	18	<u>GGSGAKLAALKAKLAALKGGGG</u> SAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRD TAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGLSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQEGGGG <u>SELAALEAELA</u> LEAGGSG
GMCSF CDR3L HC CDR1	19	GFSLSTSGMSVG
GMCSF CDR3L HC CDR2	20	DIWWDDKKDYNPSLKS
GMCSF CDR3L HC CDR3	21	SMIT <u>EGGF</u> FDV
GMCSF CDR3L LC CDR1	22	KCQLSVGYMH
GMCSF CDR3L LC CDR2	23	DTSKLAS
GMCSF CDR3L LC CDR3	24	<u>FQSGSGGSAKLAALKAKLAALKGGGG</u> SAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRD TAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGLSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQEGGGG <u>SELAALEAELA</u> LEAGGSG <u>PFT</u>
IgG1 человека константные области CH1- CH3	25	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV

		NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
CDR3L слияние 1	26	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCFQGS[X1]PFTFGGGTKLEIKR
CDR3L слияние 2	27	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCFQSGSGSGAKLAALKAKLAALKGGGGGS[X2]GGGGSELAALAELEALEAGGSGPFTFGGGTKLEIKR
GMCSF CDR3H HC аминокислота	28	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGSGAKLAALKAKLAALKGGGGGSAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGLSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQEGGGGSELAALEAELAAGGSGDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
GMCSF CDR3H VH аминокислота	29	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGSGAKLAALKAKLAALKGGGGGSAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGLSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQEGGGGSELAALEAELAAGGSGDYWGQGTLVTVSS
GMCSF CDR3H LC	30	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFAT

аминокислота		<u>YYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
GMCSF CDR3H VL аминокислота	31	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR
GMCSF CDR3H VH N-концевая aa (FR1)	32	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
GMCSF CDR3H VH C-концевая aa (FR4)	33	WGQGTLLVTVSS
GMCSF CDR3H HC CDR1	34	<u>GFNIKDTYIH</u>
GMCSF CDR3H HC CDR2	35	<u>RIYPTNGYTRYADSVKG</u>
GMCSF CDR3H HC CDR3	36	<u>GGSGAKLAALKAKLAALKGGGSAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGSLLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQEGGGSELAALEAELAAGGGSDY</u>
GMCSF CDR3H LC CDR1	37	<u>RASQDVNTAVA</u>
GMCSF CDR3H LC CDR2	38	<u>SASFLYS</u>
GMCSF CDR3H LC	39	<u>QQHYTTPPT</u>

CDR3		
CDR3H слияние 1	40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCSR[[X3]]DYWGQGTLLTVSS
CDR3H слияния 2	41	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCSRGGSG <u>AKLAALKAKLAALKGGGGS</u> [[X4]]GGGGSE <u>LAALEAELA</u> AGGSGDYWGQGTLLTVSS
CDR3H HC каркасная аминокислота	42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCSR[[X5]]WGQGTLLTVSS
CDR3H HC каркасная аминокислота	43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCSRGGSG <u>AKLAALKAKLAALKGGGGS</u> [[X6]]GGGGSE <u>LAALEAELA</u> AGGSGDYWGQGTLLTVSS
Немодифици рованная VH	44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS
Syn-hGMCSF NT VH (HC слияние)	45	<u>APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDTAAEMNETVE</u> <u>VISEMFDLQEPCLQTRLELYKQGLRGSCLKKGPLTMMAS</u> <u>HYKQHCPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPV</u> <u>QEGGGGSGGGGSGGGGSGQVTLRESGPALVKPTQTLTLTCT</u> FSGFSLSTSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNP SLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITF GGFDVWGAGTTVTVSS
Syn-hGMCSF NT VL (HC слияние)	46	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGK APKLLIYDTSKSLASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPDFAT YYCFQGNQYPFTFGGGTKLEIKR
Syn-hGMCSF NT тяжелая цепь (HC слияние)	47	<u>APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDTAAEMNETVE</u> <u>VISEMFDLQEPCLQTRLELYKQGLRGSCLKKGPLTMMAS</u> <u>HYKQHCPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPV</u> <u>QEGGGGSGGGGSGGGGSGQVTLRESGPALVKPTQTLTLTCT</u> FSGFSLSTSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNP SLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITF

		GGFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
Syn-hGMCSF NT легкая цепь (HC слияние)	48	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGK APKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPDDFAT YYCFQGNQYPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
Syn- mGMCSF NT VH (HC слияние)	49	<u>APTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSN</u> <u>EFSFKKLTVCVQTRLKIFEQGLRGNFTKLGALNMTASYYYQT</u> <u>YCPPTPETDCETQVTTYADFIDSLKTFLTDIPFECKKPGQKGG</u> <u>GGSGGGGSGGGGSGQVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFS</u> LSTSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSR LTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITFGGFDV WGAGTTVTVSS
Syn- mGMCSF NT VL (HC слияние)	50	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGK APKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPDDFAT YYCFQGNQYPFTFGGGTKLEIKR
Syn- mGMCSF NT тяжелая цепь (HC слияние)	51	<u>APTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSN</u> <u>EFSFKKLTVCVQTRLKIFEQGLRGNFTKLGALNMTASYYYQT</u> <u>YCPPTPETDCETQVTTYADFIDSLKTFLTDIPFECKKPGQKGG</u> <u>GGSGGGGSGGGGSGQVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFS</u> LSTSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSR LTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITFGGFDV WGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP

		REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Her-mGMCSF CDR легкая цепь	56	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFAT YYCQOHYTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
Syn- mGMCSF CDR VH	57	QVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGVIRQP PGKALEWLADIWDDKDYNSLKSRLTISKDTSKNQVVL KVTNMDPADTATYYCARSMITFGGFVDVWGAGTTVTVSS
Syn- mGMCSF CDR VL	58	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGK APKLLIYDTSKLAGVPSRFSGSGSGTAFTLTISLQPDDFAT YYCFQGNNGSGAKLAALKAKLAALKGGGGSAPTRSPITVTR PWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKKLTVCV QTRLKIFEQGLRGNFTKLKGALNMTASYQTYCPPTPETDC ETQVTTYADFIDSLKTFLTDIPFECKKPGQKGGGGSELAAL AELAALAEAGGSGPFTFGGGTKLEIKR
Syn- mGMCSF CDR тяжелая цепь	59	QVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGVIRQP PGKALEWLADIWDDKDYNSLKSRLTISKDTSKNQVVL KVTNMDPADTATYYCARSMITFGGFVDVWGAGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Syn- mGMCSF CDR легкая	60	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGK APKLLIYDTSKLAGVPSRFSGSGSGTAFTLTISLQPDDFAT YYCFQGNNGSGAKLAALKAKLAALKGGGGSAPTRSPITVTR

цепь		<u>PWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKKLT</u> <u>CVQTRLKIFEQGLRGNFTKLKGALNMTASYQTYCPPTPETDC</u> <u>ETQVTTYADFIDSLKTFLLTDIPFECKKPGQKGGGGSELA</u> <u>AALEAELAAL</u> <u>EAGGSGPFTFGGGTKLEIKRTVAAPS</u> <u>VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY</u> <u>PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE</u> <u>QDSKDSTYLSSTLTL</u> <u>SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT</u> <u>KSFNRGEC</u>
Syn-hGMCSF NT VH (LC слияние)	61	<u>QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSV</u> <u>GWIRQPPGKALEWLADIW</u> <u>WDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVL</u> <u>KVTNMDPADTATYYCAR</u> <u>SMIT</u> <u>EGGFDVWGAGTTVTVSS</u>
Syn-hGMCSF NT VL (LC слияние)	62	<u>APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDTAAEMNETVE</u> <u>VISEMFDLQEP</u> <u>TCLQTRLELYKQGLRGS</u> <u>LTKLKGPLTMMAS</u> <u>HYKQHC</u> <u>PPTPETS</u> <u>CATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPV</u> <u>QEGGGGSGGGGSGGGGSGDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC</u> <u>KCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSK</u> <u>LASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISS</u> <u>LQPD</u> <u>DFATYYCFQNGYPFTFGGGTKLEIKR</u>
Syn-hGMCSF NT тяжелая цепь (LC слияние)	63	<u>QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSV</u> <u>GWIRQPPGKALEWLADIW</u> <u>WDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVL</u> <u>KVTNMDPADTATYYCAR</u> <u>SMIT</u> <u>EGGFDVWGAGTTVTVSSAS</u> <u>TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VTVSWNSGALTSGVHTFPA</u> <u>VLOSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN</u> <u>HKPSNTKVDK</u> <u>KVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPK</u> <u>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD</u> <u>WLN</u> <u>NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR</u> <u>DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA</u> <u>VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT</u> <u>VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
Syn-hGMCSF NT легкая цепь (LC слияние)	64	<u>APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDTAAEMNETVE</u> <u>VISEMFDLQEP</u> <u>TCLQTRLELYKQGLRGS</u> <u>LTKLKGPLTMMAS</u> <u>HYKQHC</u> <u>PPTPETS</u> <u>CATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPV</u> <u>QEGGGGSGGGGSGGGGSGDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC</u> <u>KCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSK</u> <u>LASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISS</u> <u>LQPD</u> <u>DFATYYCFQNGYPFTFGGGTKLEIKR</u> <u>TVAAPS</u> <u>VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY</u> <u>PREAKVQWK</u>

		VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Немодифицированная VH	65	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGVWIRQP PGKALEWLADIWDDKDYNSLKSRLTISKDTSKNQVVL KVTNMDPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAGTTVTVSS
Паливизумаб HC CDR3	66	SMITX(i)X(ii)X(iii)FDV где X(i) выбран из F, A, G и P, X(ii) выбран из G, A, S, T и P, и X(iii) выбран из G, A, V, L и P
hGMCSF-hIgG1 Fc	67	<u>APARSPSPSTOPWEHVNAIQEARLLNLSRD</u> <u>TAAEMNETVE</u> <u>VISEMF</u> <u>DLOEPTCLQTRLELYKQGLRGS</u> <u>LTKLKGPLTMMAS</u> <u>HYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLKD</u> <u>FLLVIPFDCWEPV</u> <u>QEGGSGGGSGGGGGSGGGGSEPKSCDK</u> <u>THTCPPCPAPPVAGPS</u> VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
mGMCSF-hIgG1 Fc	68	<u>APTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMP</u> <u>VTLN</u> <u>EEVEVVSN</u> <u>EFSFKKLT</u> <u>CVQTRLKIFEQGLRGNFTKLKG</u> <u>ALNMTASY</u> <u>YQ</u> <u>YCPPTPETDCETQVT</u> <u>TYAD</u> <u>FIDSLKTFL</u> <u>TDIPFECKKPG</u> <u>QKGG</u> <u>SGGSGGGGGSGGGGSEPKSCDK</u> <u>THTCPPCPAPPVAGPS</u> <u>VFLFP</u> PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
нуклеотидные последовательности Herceptin hGMCSF CDR тяжелой	69	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTCCAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGGT TCAATATTAAGGACACTTACATCCACTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGACGTATTTATCCT ACCAATGGTTACACACGCTACGCAGACTCCGTGAAGGGC CGATTCACCATCTCCGCAGACACTCCAAGAACACGGCGT ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG

цепь (НС слияние)	<p>TGTATTACTGTTTCGAGAGGCGGAAGCGGAGCAAAGCTCG CCGCACTGAAAGCCAAGCTGGCCGCTCTGAAGGGAGGTG GCGGGAGCGCACCCGCCCGCTCGCCCAGCCCCAGCACGC AGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCGGC GTCTCCTGAACCTGAGTAGAGACACTGCTGCTGAGATGAA TGAAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAATGTTTGACCTCCAG GAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCCTGGAGCTGTACAAG CAGGGCCTGCGGGGCAGCCTCACCAAGCTCAAGGGCCCC TTGACCATGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCTC CAACCCCGGAAACTTCCTGTGCAACCCAGATTATCACCTT TGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTC ATCCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAGTCCAGGAGGGCGGA GGTGGGAGTGAACCTGGCCGCACTGGAAGCTGAGCTGGCT GCCCTCGAAGCTGGAGGCTCTGGAGACTACTGGGGCCAA GGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCC CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCC CTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT GAACCCAAATCTTGCGACAAAACCTCACACATGCCACCGT GCCCAGCACCTCCAGTCGCCGACCGTCAGTCTTCCTCTT CCCTCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAAGCTCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG TGTACACCCTGCCTCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG</p>
----------------------	--

		GAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
нуклеотидны е последовател ьности Herception hGMCSF CDR легкая цепь (НС слияние)	70	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCAT CTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTC AGGATGTGAATACCGCGGTTCGCATGGTATCAGCAGAAAC CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCTT CTTGTATAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTAGA TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAAC CTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCATTACAC TACCCCTCCGACGTTCCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAGATC AAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTCGT GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGAC TACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGTCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG GGAGAGTGT
нуклеотидны е последовател ьности Synagis hGMCSF CDR тяжелая цепь (LC слияние)	71	CAGGTGACCCTGCGCGAGTCCGGCCCTGCACTGGTGAAG CCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCTCCGGCT TCTCCCTGTCCACCTCCGGCATGTCCGTGGGCTGGATCCG GCAGCCTCCCGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCTGACAT CTGGTGGGACGACAAGAAGGACTACAACCCCTCCCTGAA GTCCCGCCTGACCATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCAG GTGGTGCTGAAGGTGACCAACATGGACCCCGCCGACACC GCCACCTACTACTGCGCCCGCTCAATGATTACCTTCGGGG GCTTCGACGTGTGGGGAGCCGGTACCACCGTGACCGTGTC TTCCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACAC

		<p>CTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA GCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAACCCAAATCTTGCGACAA AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTCCAGTCGCC GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCTCCAAAACCCAAGGACA CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCTC CCAAGCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCTCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>
<p>нуклеотидны е последовател ьности Synagis hGMCSF CDR легкая цепь (LC слияние)</p>	72	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCTGTCCGCCT CCGTGGGCGACCGCGTGACCATCACCTGCAAGTGCCAGCT GTCCGTGGGCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGG CAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACACCTCCAAGCTG GCCTCCGGCGTGCCCTCCCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCG GCACCGAGTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCCGA CGACTTCGCCACCTACTACTGCTTCCAGGGCTCCGGCGGA AGCGGAGCAAAGCTCGCCGCACTGAAAGCCAAGCTGGCC GCTCTGAAGGGAGGTGGCGGGAGCGCACCCGCCCCGCTCG CCCAGCCCCAGCACGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCC ATCCAGGAGGCCCGGCGTCTCCTGAACCTGAGTAGAGAC ACTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTAGAAGTCATCTCA GAAATGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCC GCCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGGGGCAGCCTCA</p>

		<p>CCAAGCTCAAGGGCCCCTTGACCATGATGGCCAGCCACTA CAAGCAGCACTGCCCTCCAACCCCGGAAACTTCCTGTGCA ACCCAGATTATCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGA AGGACTTTCTGCTTGTTCATCCCCTTTGACTGCTGGGAGCC AGTCCAGGAGGGCGGAGGTGGGAGTGAAGTGGCCGCACT GGAAGCTGAGCTGGCTGCCCTCGAAGCTGGAGGCTCTGG ACCTTTCACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAA ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTCGTGT GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCA GGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA CAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA CGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCA GGGCCTGTCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG AGAGTGT</p>
<p>нуклеотидны е последовател ьности Herception hGMCSF CDR VH (НС слияние)</p>	73	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTCCAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGGT TCAATATTAAGGACACTTACATCCACTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTCGCACGTATTTATCCT ACCAATGGTTACACACGCTACGCAGACTCCGTGAAGGGC CGATTCACCATCTCCGCAGACACTTCCAAGAACACGGCGT ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG TGTATTACTGTTTCGAGAGGCGGAAGCGGAGCAAAGCTCG CCGCACTGAAAGCCAAGCTGGCCGCTCTGAAGGGAGGTG GCGGGAGCGCACCCGCCGCTCGCCAGCCCCAGCACGC AGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCGGC GTCTCCTGAACCTGAGTAGAGACACTGCTGCTGAGATGAA TGAAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAATGTTTGACCTCCAG GAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCCTGGAGCTGTACAAG CAGGGCCTGCGGGGCAGCCTCACCAAGCTCAAGGGCCCC TTGACCATGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCTC CAACCCCGGAAACTTCCTGTGCAACCCAGATTATCACCTT TGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTTCTGCTTGT ATCCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAGTCCAGGAGGGCGGA</p>

		GGTGGGAGTGAAGCTGGCCGCACTGGAAGCTGAGCTGGCT GCCCTCGAAGCTGGAGGCTCTGGAGACTACTGGGGCCAA GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
нуклеотидны е последовател ьности Herception hGMCSF CDR VL цепь (НС слияние)	74	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCAT CTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTC AGGATGTGAATACCGCGGTTCGCATGGTATCAGCAGAAAC CAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCTT CTTGTATAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTAGA TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAAC CTGAAGATTTTGAACCTTACTACTGTCAACAGCATTACAC TACCCCTCCGACGTTTCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAGATC AAACGA
нуклеотидны е последовател ьности Synagis hGMCSF CDR VH (LC слияние)	75	CAGGTGACCCTGCGCGAGTCCGGCCCTGCACTGGTGAAG CCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCTCCGGCT TCTCCCTGTCCACCTCCGGCATGTCCGTGGGCTGGATCCG GCAGCCTCCCGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCTGACAT CTGGTGGGACGACAAGAAGGACTACAACCCCTCCCTGAA GTCCCGCCTGACCATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCAG GTGGTGCTGAAGGTGACCAACATGGACCCCGCCGACACC GCCACCTACTACTGCGCCCGCTCAATGATTACCTTCGGGG GCTTCGACGTGTGGGGAGCCGGTACCACCGTGACCGTGTG TTCC
нуклеотидны е последовател ьности Synagis hGMCSF CDR VL (LC слияние)	76	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCTGTCCGCCT CCGTGGGCGACCGCGTGACCATCACCTGCAAGTGCCAGCT GTCCGTGGGCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGG CAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACACCTCCAAGCTG GCCTCCGGCGTGCCCTCCCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCG GCACCGAGTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCCGA CGACTTCGCCACCTACTACTGCTTCCAGGGCTCCGGCGGA AGCGGAGCAAAGCTCGCCGCACTGAAAGCCAAGCTGGCC GCTCTGAAGGGAGGTGGCGGGAGCGCACCCGCCCGCTCG CCCAGCCCCAGCACGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCC ATCCAGGAGGCCCGGCGTCTCCTGAACCTGAGTAGAGAC ACTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTAGAAGTCATCTCA GAAATGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCC

	GCCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGGGGCAGCCTCA CCAAGCTCAAGGGCCCCTTGACCATGATGGCCAGCCACTA CAAGCAGCACTGCCCTCCAACCCCGGAAACTTCCTGTGCA ACCCAGATTATCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGA AGGACTTTCTGCTTGTCATCCCCTTTGACTGCTGGGAGCC AGTCCAGGAGGGCGGAGGTGGGAGTGAAGTGGCCGCACT GGAAGCTGAGCTGGCTGCCCTCGAAGCTGGAGGCTCTGG ACCCTTCACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAA ACGA
--	--

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая первый полипептид, содержащий гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), и второй полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере 98% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2.

2. Композиция по п. 1, где GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16 или 77.

3. Композиция по п. 1 или 2, где GM-CSF содержит человеческий GM-CSF или мышинный GM-CSF.

4. Композиция по любому из пп. 1-3, где первый полипептид содержит модифицированную легкую цепь вариабельной области антитела.

5. Композиция по п. 4, где модифицированная легкая цепь вариабельного домена антитела содержит GM-CSF, расположенный между первой аминокислотной последовательностью вариабельной области антитела и второй аминокислотной последовательностью вариабельной области антитела.

6. Композиция по п. 5, где первая аминокислотная последовательность содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 14.

7. Композиция по п. 6, где первая аминокислотная последовательность содержит SEQ ID NO: 14.

8. Композиция по любому из пп. 5-7, где вторая аминокислотная последовательность содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 15.

9. Композиция по п. 8, где вторая аминокислотная последовательность содержит SEQ ID NO: 15.

10. Композиция по любому из пп. 4-9, где GM-CSF расположен в определяющей комплементарности области (CDR) модифицированной легкой цепи.

11. Композиция по п. 10, где GM-CSF расположен в CDR1, CDR2 или CDR3 легкой цепи.

12. Композиция по п. 11, где GM-CSF расположен в CDR3 легкой цепи.

13. Композиция по любому из пп. 4-12, где модифицированная легкая цепь модифицирована на основе вариабельной легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 17.

14. Композиция по любому из пп. 1-13, где первый полипептид дополнительно содержит первый линкерный пептид.

15. Композиция по п. 14, где первый линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 10.

16. Композиция по п. 14 или 15, где первый линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 8.

17. Композиция по любому из пп. 14-16, где первый линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 11.

18. Композиция по любому из пп. 14-17, где первый линкерный пептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 12.

19. Композиция по любому из пп. 1-18, где первый полипептид дополнительно содержит второй линкерный пептид.

20. Композиция по п. 19, где второй линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 10.

21. Композиция по п. 19 или 20, где второй линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 9.

22. Композиция по любому из пп. 19-21, где второй линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 11.

23. Композиция по любому из пп. 19-22, где второй линкерный пептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 13.

24. Композиция по любому из пп. 1-23, где первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 18.

25. Композиция по любому из пп. 1-24, где первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 6.

26. Композиция по любому из пп. 1-25, где первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7.

27. Композиция по любому из пп. 1-26, где первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 5.

28. Композиция по любому из пп. 1-27, где второй полипептид содержит тяжелую цепь вариабельной области антитела.

29. Композиция по любому из пп. 1-28, где второй полипептид содержит SEQ ID NO: 2.

30. Композиция по любому из пп. 1-29, где второй полипептид дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4.

31. Композиция по любому из пп. 1-31, где второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 1.

32. Композиция по любому из пп. 1-31, где первый полипептид и второй полипептид соединены через одну или несколько дисульфидных связей.

33. Композиция по любому из пп. 1-32, где первый полипептид и второй полипептид образуют вариабельный домен антитела.

34. Композиция по п. 33, где вариабельный домен антитела не связывается с антигеном с равновесной константой диссоциации (K_D) ниже приблизительно 10^{-2} М, 10^{-3} М или 10^{-4} М.

35. Композиция по п. 33 или 34, где вариабельный домен антитела содержит модифицированный вариабельный домен паливизумаба.

36. Композиция по п. 35, где модифицированный вариабельный домен паливизумаба содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 19.

37. Композиция по п. 35 или 36, где модифицированный вариабельный домен паливизумаба содержит CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20.

38. Композиция по любому из пп. 35-37, где модифицированный вариабельный домен паливизумаба содержит CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21.

39. Композиция по любому из пп. 35-38, где модифицированный вариабельный домен паливизумаба содержит CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 22.

40. Композиция по любому из пп. 35-39, где модифицированный вариабельный домен паливизумаба содержит CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 23.

41. Композиция по любому из пп. 35-40, где модифицированный вариабельный домен паливизумаба содержит CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 24, 77 или 16.

42. Композиция по любому из пп. 35-41, где модифицированный вариабельный домен паливизумаба не связывается с респираторно-синцитиальным вирусом (RSV) с K_D ниже приблизительно 10^{-2} М, 10^{-3} М или 10^{-4} М.

43. Композиция по любому из пп. 1-42, дополнительно содержащая область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека.

44. Композиция по п. 43, где IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25.

45. Композиция по п. 43 или 44, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

46. Композиция по любому из пп. 43-45, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

47. Композиция по любому из пп. 1-46, где первый полипептид дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или первый полипептид содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

48. Композиция, содержащая вариабельный домен антитела, содержащий последовательность легкой цепи, содержащую первый полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 6, и последовательность тяжелой цепи,

содержащую второй полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2.

49. Композиция по п. 48, где первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 6.

50. Композиция по п. 48 или 49, где второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2.

51. Композиция по любому из пп. 48-50, содержащая GM-CSF.

52. Композиция по п. 51, где GM-CSF представляет собой человеческий GM-CSF или мышинный GM-CSF.

53. Композиция по п. 51 или 52, где GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16 или 77.

54. Композиция по любому из пп. 48-53, где легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7.

55. Композиция по любому из пп. 48-54, где легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 5.

56. Композиция по любому из пп. 48-55, где тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4.

57. Композиция по любому из пп. 48-56, где тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 1.

58. Композиция по любому из пп. 48-57, дополнительно содержащая область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека.

59. Композиция по п. 58, где IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25.

60. Композиция по п. 58 или 59, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

61. Композиция по любому из пп. 58-60, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

62. Композиция по любому из пп. 48-61, где тяжелая цепь дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или тяжелая цепь содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

63. Композиция, содержащая переменный домен антитела, содержащий последовательность легкой цепи, содержащую последовательность, на по меньшей мере

приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 26 (DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVP SRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCFQGS[X1]PFTFGGGTKLEIKR), где последовательность легкой цепи содержит X1, и X1 содержит GM-CSF, и последовательность тяжелой цепи, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2.

64. Композиция по п. 63, где GM-CSF представляет собой человеческий GM-CSF или мышиный GM-CSF.

65. Композиция по п. 63 или 64, где GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16 или 77.

66. Композиция по любому из пп. 63-65, где последовательность легкой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 26.

67. Композиция по любому из пп. 63-66, где последовательность легкой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 27

(DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVP SRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCFQGS[GGSGAKLAALKLAALKGGGGS[X2] GGGSELALEAELAAGGSGPFTFGGGTKLEIKR), где последовательность легкой цепи содержит X2, и X2 содержит GM-CSF.

68. Композиция по любому из пп. 63-67, где последовательность тяжелой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2.

69. Композиция по любому из пп. 63-68, где легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7.

70. Композиция по любому из пп. 63-69, где легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 5.

71. Композиция по любому из пп. 63-70, где тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4.

72. Композиция по любому из пп. 63-71, где тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 1.

73. Композиция по любому из пп. 63-72, дополнительно содержащая область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека.

74. Композиция по п. 73, где IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25.

75. Композиция по п. 73 или 74, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

76. Композиция по любому из пп. 73-75, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

77. Композиция по любому из пп. 63-76, где тяжелая цепь дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или тяжелая цепь содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

78. Композиция, содержащая последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 18.

79. Композиция по п. 78, где последовательность на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности согласно SEQ ID NO: 18.

80. Композиция по п. 78 или 79, где последовательность соединена с доменом антитела.

81. Композиция по п. 80, где домен антитела представляет собой переменный домен антитела.

82. Композиция по п. 80 или 81, где последовательность расположена в домене антитела.

83. Композиция по п. 81, где последовательность расположена в CDR переменного домена антитела.

84. Композиция по п. 83, где последовательность расположена в CDR модифицированного переменного домена антитела трастузумаб.

85. Композиция по п. 83, где последовательность расположена в CDR модифицированного переменного домена антитела паливизумаб.

86. Композиция по любому из пп. 78-83, содержащая область, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 42, где область содержит X5, и X5 содержит последовательность.

87. Композиция по п. 86, дополнительно содержащая область, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31.

88. Композиция по любому из пп. 78-83, содержащая область, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 43, где область содержит X6, и X6 содержит последовательность.

89. Композиция по п. 88, дополнительно содержащая область, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 2.

90. Композиция по любому из пп. 78-89, дополнительно содержащая область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека.

91. Композиция по п. 90, где IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25.

92. Композиция по п. 90 или 91, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

93. Композиция по любому из пп. 90-92, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

94. Композиция по любому из пп. 90-93, где область Fc содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или область Fc содержит IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

95. Композиция, содержащая первый полипептид, содержащий: (i) SEQ ID NO: 22, 23 и 16, и второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 19-21, или (ii) SEQ ID NO: 22, 23 и 77, и второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 19-21.

96. Композиция по п. 95, где первый полипептид представляет собой легкую цепь варибельного домена антитела.

97. Композиция по п. 95 или 96, где второй полипептид представляет собой тяжелую цепь варибельного домена антитела.

98. Композиция по любому из пп. 95-97, где первый полипептид содержит SEQ ID NO: 24.

99. Композиция по любому из пп. 95-98, дополнительно содержащая область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека.

100. Композиция по п. 99, где IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25.

101. Композиция по п. 99 или 100, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

102. Композиция по любому из пп. 99-101, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

103. Композиция по любому из пп. 95-102, где второй полипептид дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или второй полипептид содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

104. Композиция, содержащая первый полипептид, содержащий: (i) SEQ ID NO: 37-39, и второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 34, 35, 16, или (ii) SEQ ID NO: 37-39, и второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 34, 35, 77.

105. Композиция по п. 104, где первый полипептид представляет собой легкую цепь переменного домена антитела.

106. Композиция по п. 104 или 105, где второй полипептид представляет собой тяжелую цепь переменного домена антитела.

107. Композиция по любому из пп. 104-106, где первый полипептид содержит SEQ ID NO: 36.

108. Композиция по любому из пп. 104-107, дополнительно содержащая область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека.

109. Композиция по п. 108, где IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25.

110. Композиция по п. 108 или 109, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

111. Композиция по любому из пп. 108-110, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

112. Композиция по любому из пп. 104-111, где второй полипептид дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или второй полипептид содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

113. Композиция, содержащая первый полипептид, содержащий SEQ ID NO: 31, и второй полипептид, содержащий гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

114. Композиция по п. 113, где GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16 или 77.

115. Композиция по п. 113 или 114, где GM-CSF содержит человеческий GM-CSF или мышинный GM-CSF.

116. Композиция по любому из пп. 113-115, где второй полипептид содержит модифицированную тяжелую цепь переменной области антитела.

117. Композиция по п. 116, где модифицированная тяжелая цепь переменного домена антитела содержит GM-CSF, расположенный между первой аминокислотной последовательностью переменной области антитела и второй аминокислотной последовательностью переменной области антитела.

118. Композиция по п. 117, где первая аминокислотная последовательность содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 32.

119. Композиция по п. 118, где первая аминокислотная последовательность содержит SEQ ID NO: 32.

120. Композиция по любому из пп. 117-119, где вторая аминокислотная последовательность содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 33.

121. Композиция по п. 120, где вторая аминокислотная последовательность содержит SEQ ID NO: 33.

122. Композиция по любому из пп. 116-121, где GM-CSF расположен в определяющей комплементарности области (CDR) модифицированной тяжелой цепи.

123. Композиция по п. 122, где GM-CSF расположен в CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи.

124. Композиция по п. 123, где GM-CSF расположен в CDR3 тяжелой цепи.

125. Композиция по любому из пп. 116-124, где модифицированная тяжелая цепь модифицирована на основе варибельной тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 44.

126. Композиция по любому из пп. 113-125, где второй полипептид дополнительно содержит первый линкерный пептид.

127. Композиция по п. 126, где первый линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 10.

128. Композиция по п. 126 или 127, где первый линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 8.

129. Композиция по любому из пп. 126-128, где первый линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 11.

130. Композиция по любому из пп. 126-129, где первый линкерный пептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 12.

131. Композиция по любому из пп. 113-130, где второй полипептид дополнительно содержит второй линкерный пептид.

132. Композиция по п. 131, где второй линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 10.

133. Композиция по п. 131 или 132, где второй линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 9.

134. Композиция по любому из пп. 131-133, где второй линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 11.

135. Композиция по любому из пп. 131-134, где второй линкерный пептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 13.

136. Композиция по любому из пп. 113-135, где второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 18.

137. Композиция по любому из пп. 113-136, где второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29.

138. Композиция по любому из пп. 113-137, где второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4.

139. Композиция по любому из пп. 113-138, где второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 28.

140. Композиция по любому из пп. 113-139, где первый полипептид содержит легкую цепь вариабельной области антитела.

141. Композиция по любому из пп. 113-140, где первый полипептид содержит SEQ ID NO: 31.

142. Композиция по любому из пп. 113-141, где первый полипептид дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7.

143. Композиция по любому из пп. 113-142, где второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 30.

144. Композиция по любому из пп. 113-143, где первый полипептид и второй полипептид соединены через одну или несколько дисульфидных связей.

145. Композиция по любому из пп. 113-144, где первый полипептид и второй полипептид образуют вариабельный домен антитела.

146. Композиция по п. 145, где вариабельный домен антитела не связывается с антигеном с равновесной константой диссоциации (K_D) ниже приблизительно 10^{-2} М, 10^{-3} М или 10^{-4} М.

147. Композиция по п. 145 или 146, где вариабельный домен антитела содержит модифицированный вариабельный домен трастузумаба.

148. Композиция по п. 147, где модифицированный вариабельный домен трастузумаба содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 34.

149. Композиция по п. 147 или 148, где модифицированный вариабельный домен трастузумаба содержит CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 35.

150. Композиция по любому из пп. 147-149, где модифицированный вариабельный домен трастузумаба содержит CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 36, 77 или 16.

151. Композиция по любому из пп. 147-150, где модифицированный вариабельный домен трастузумаба содержит CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 37.

152. Композиция по любому из пп. 147-151, где модифицированный вариабельный домен трастузумаба содержит CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38.

153. Композиция по любому из пп. 147-152, где модифицированный переменный домен трастуумаба содержит CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39.

154. Композиция по любому из пп. 147-153, где модифицированный переменный домен трастуумаба не связывается с человеческим рецептором эпидермального фактора роста 2 (Her2) с KD ниже приблизительно 10^{-2} М, 10^{-3} М или 10^{-4} М.

155. Композиция по любому из пп. 113-154, дополнительно содержащая область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека.

156. Композиция по п. 155, где IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25.

157. Композиция по п. 155 или 156, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

158. Композиция по любому из пп. 155-157, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

159. Композиция по любому из пп. 113-158, где второй полипептид дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или второй полипептид содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

160. Композиция, содержащая переменный домен антитела, содержащий последовательность легкой цепи, содержащую первый полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31, и последовательность тяжелой цепи, содержащую второй полипептид, содержащий последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29.

161. Композиция по п. 160, где первый полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31.

162. Композиция по п. 160 или 161, где второй полипептид содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29.

163. Композиция по любому из пп. 160-162, содержащая GM-CSF.

164. Композиция по п. 163, где GM-CSF представляет собой человеческий GM-CSF или мышинный GM-CSF.

165. Композиция по п. 163 или 164, где GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16 или 77.

166. Композиция по любому из пп. 160-165, где легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7.

167. Композиция по любому из пп. 160-166, где легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 30.

168. Композиция по любому из пп. 160-167, где тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4.

169. Композиция по любому из пп. 160-168, где тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 28.

170. Композиция по любому из пп. 160-169, дополнительно содержащая область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека.

171. Композиция по п. 170, где IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25.

172. Композиция по п. 170 или 171, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

173. Композиция по любому из пп. 170-172, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

174. Композиция по любому из пп. 160-173, где тяжелая цепь дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или тяжелая цепь содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

175. Композиция, содержащая переменный домен антитела, содержащий последовательность тяжелой цепи, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 42 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMNFKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSR[[X5]]WGQGTLLVTVSS), где последовательность тяжелой цепи содержит X6, и X6 содержит GM-CSF, и последовательность легкой цепи, содержащую последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 31.

176. Композиция по п. 175, где GM-CSF представляет собой человеческий GM-CSF или мышинный GM-CSF.

177. Композиция по п. 175 или 176, где GM-CSF содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16 или 77.

178. Композиция по любому из пп. 175-177, где последовательность тяжелой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 42.

179. Композиция по любому из пп. 175-178, где последовательность тяжелой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 43 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGSGAKLAALKAKLAALKGGGGS[[X6]]GGGGSELALEAELAALAEAGGSGDYWGQGLVTVSS), где последовательность тяжелой цепи содержит X6, и X6 содержит GM-CSF.

180. Композиция по любому из пп. 175-179, где последовательность тяжелой цепи содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 43.

181. Композиция по любому из пп. 175-180, где легкая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 7.

182. Композиция по любому из пп. 175-181, где тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 29.

183. Композиция по любому из пп. 175-182, где тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 4.

184. Композиция по любому из пп. 175-183, где тяжелая цепь содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 28.

185. Композиция по любому из пп. 175-184, дополнительно содержащая область Fc, содержащую пониженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 человека.

186. Композиция по п. 185, где IgG1 человека содержит SEQ ID NO: 25.

187. Композиция по п. 185 или 186, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

188. Композиция по любому из пп. 185-187, где пониженная эффекторная функция содержит пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

189. Композиция по любому из пп. 175-188, где тяжелая цепь дополнительно содержит последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и/или тяжелая цепь содержит область Fc, содержащую IgG1 человека, содержащий E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S, P331S согласно нумерации Кэбота.

190. Применение композиций по любому из пп. 1-189 для лечения неврологического заболевания или состояния.

191. Способ лечения неврологического заболевания или состояния, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции по любому из пп. 1-189.

192. Применение по п. 190 или способ по п. 191, где неврологическое заболевание или состояние содержит болезнь Паркинсона.

193. Применение композиций по любому из пп. 1-189 для лечения болезни Альцгеймера и/или травматического повреждения мозга.

194. Применение композиций по любому из пп. 1-189 для лечения ALS.

195. Применение композиций по любому из пп. 1-189 для лечения острого лучевого синдрома.

196. Применение композиций по любому из пп. 1-189 для лечения рака.

197. Применение или способ по любому из пп. 190-196, где композицию вводят один раз каждые приблизительно 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 дней в ходе периода лечения.

198. Применение или способ по п. 196, где композицию вводят один раз каждые приблизительно 14 дней в ходе периода лечения.

199. Применение или способ по любому из пп. 190-196, где композицию вводят один раз каждые приблизительно 2 недели в ходе периода лечения.

200. Применение или способ по любому из пп. 190-196, где композицию вводят один раз каждые приблизительно 3 недели в ходе периода лечения.

201. Применение или способ по любому из пп. 190-196, где композицию вводят один раз каждые приблизительно 4 недели в ходе периода лечения.

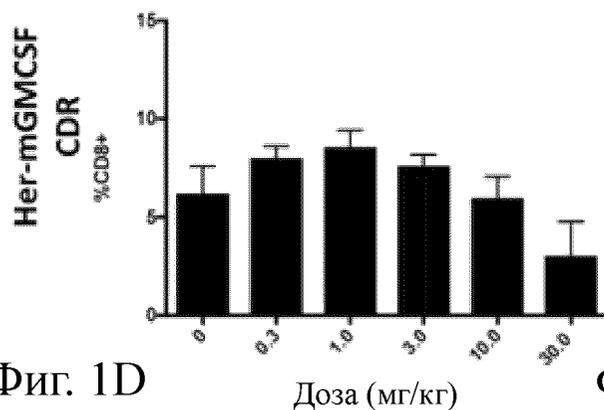
202. Применение или способ по любому из пп. 190-196, где композицию вводят приблизительно один раз в месяц в ходе периода лечения.

203. Применение или способ по любому из пп. 197-202, где период лечения составляет от приблизительно 8 недель до приблизительно 2 лет.

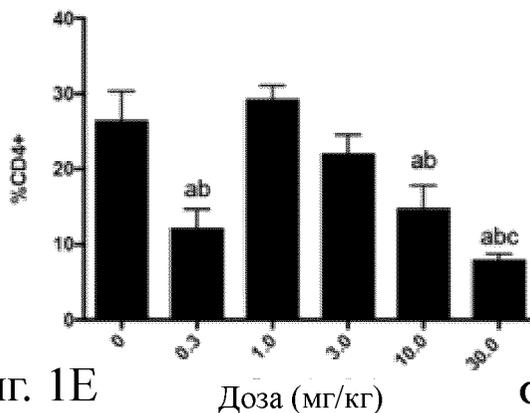
По доверенности

Периферическая кровь

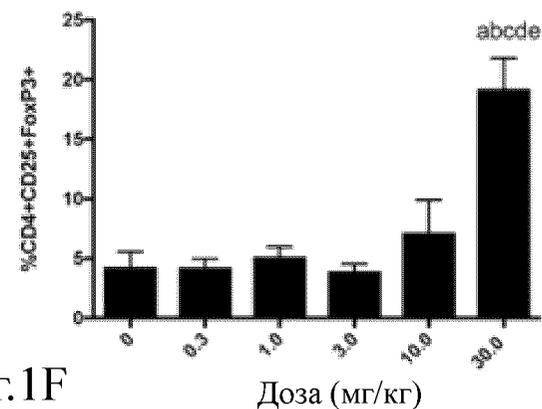
Фиг. 1А



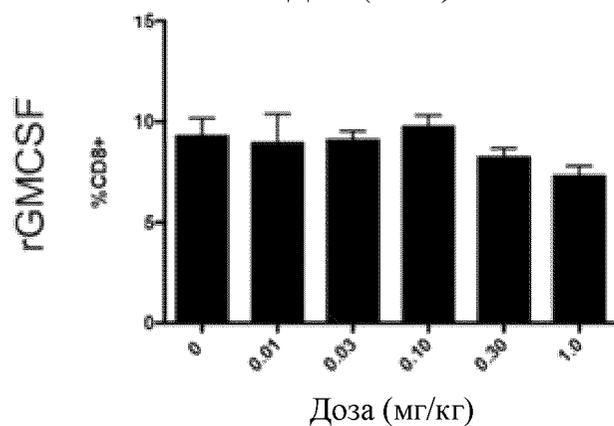
Фиг. 1В



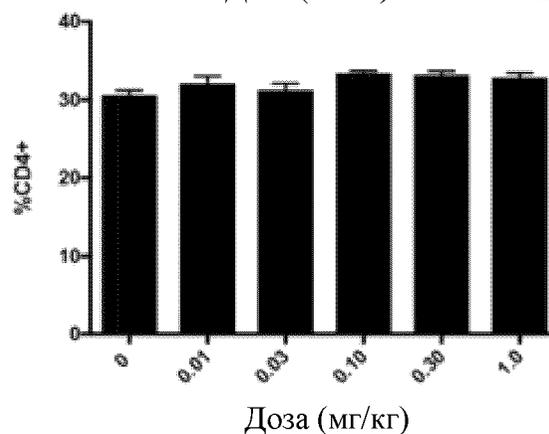
Фиг. 1С



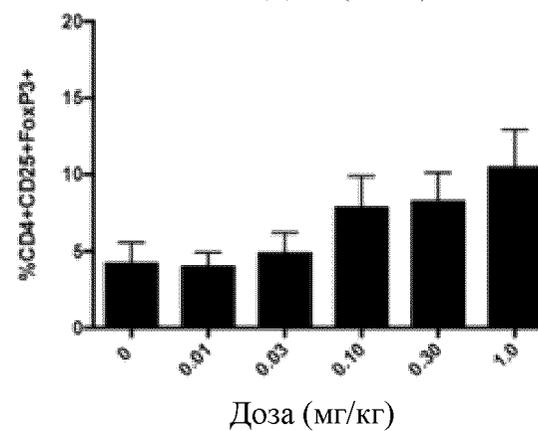
Фиг. 1D



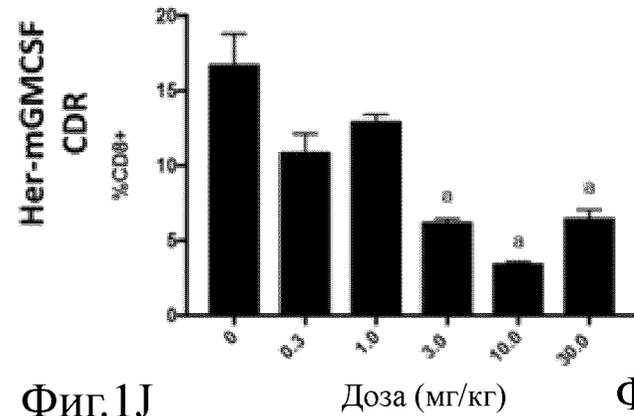
Фиг. 1Е



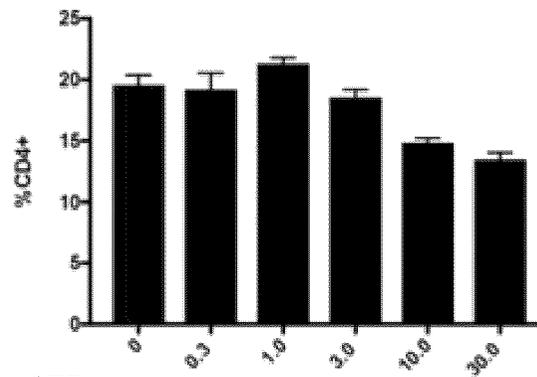
Фиг. 1F



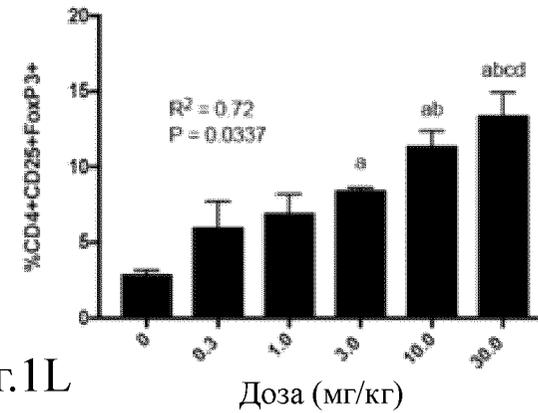
Фиг.1G



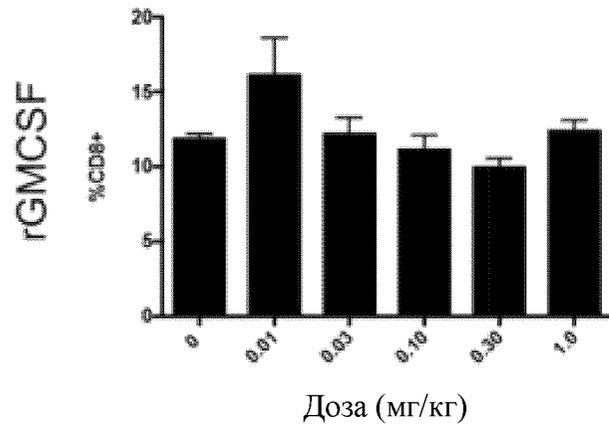
Фиг.1H Спленоциты



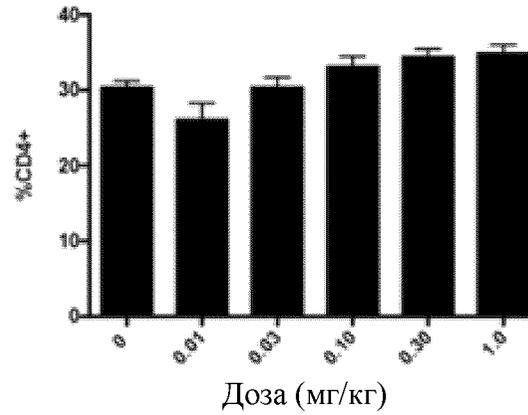
Фиг.1I



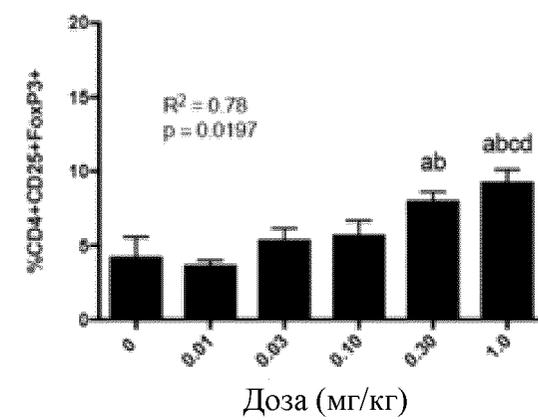
Фиг.1J



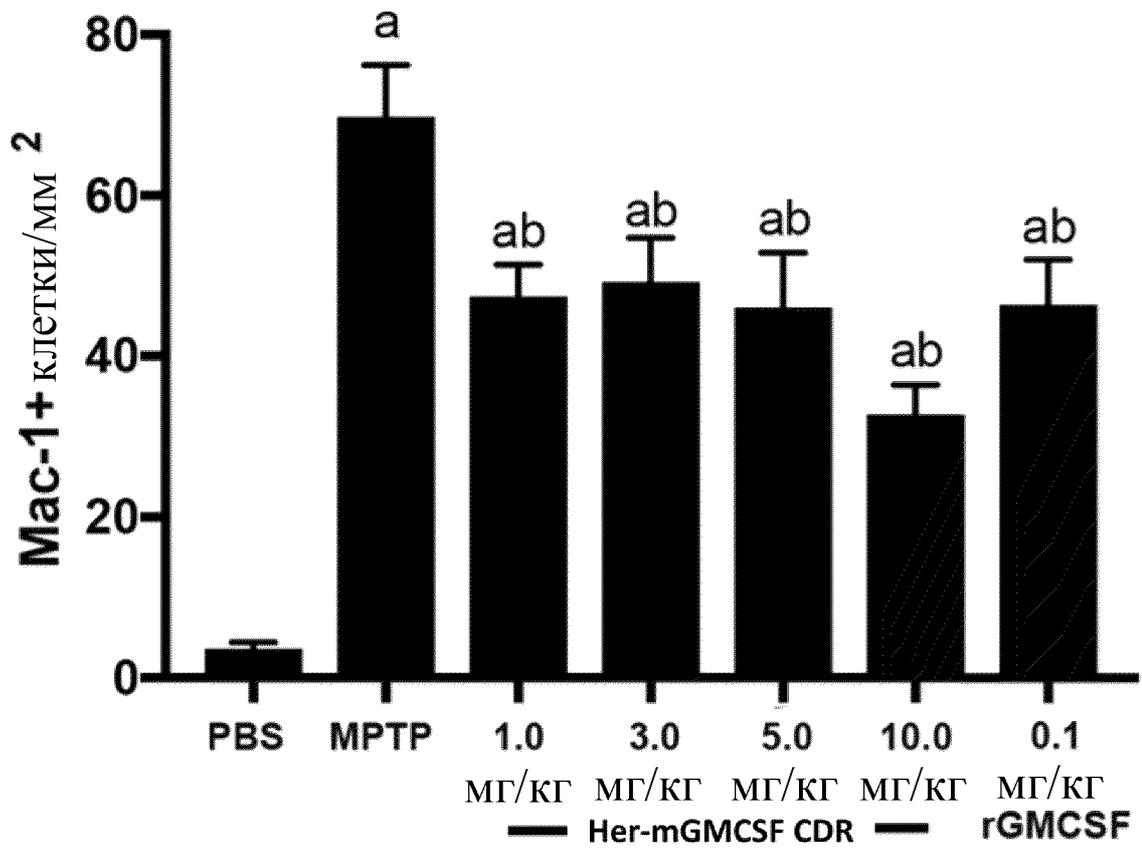
Фиг.1K



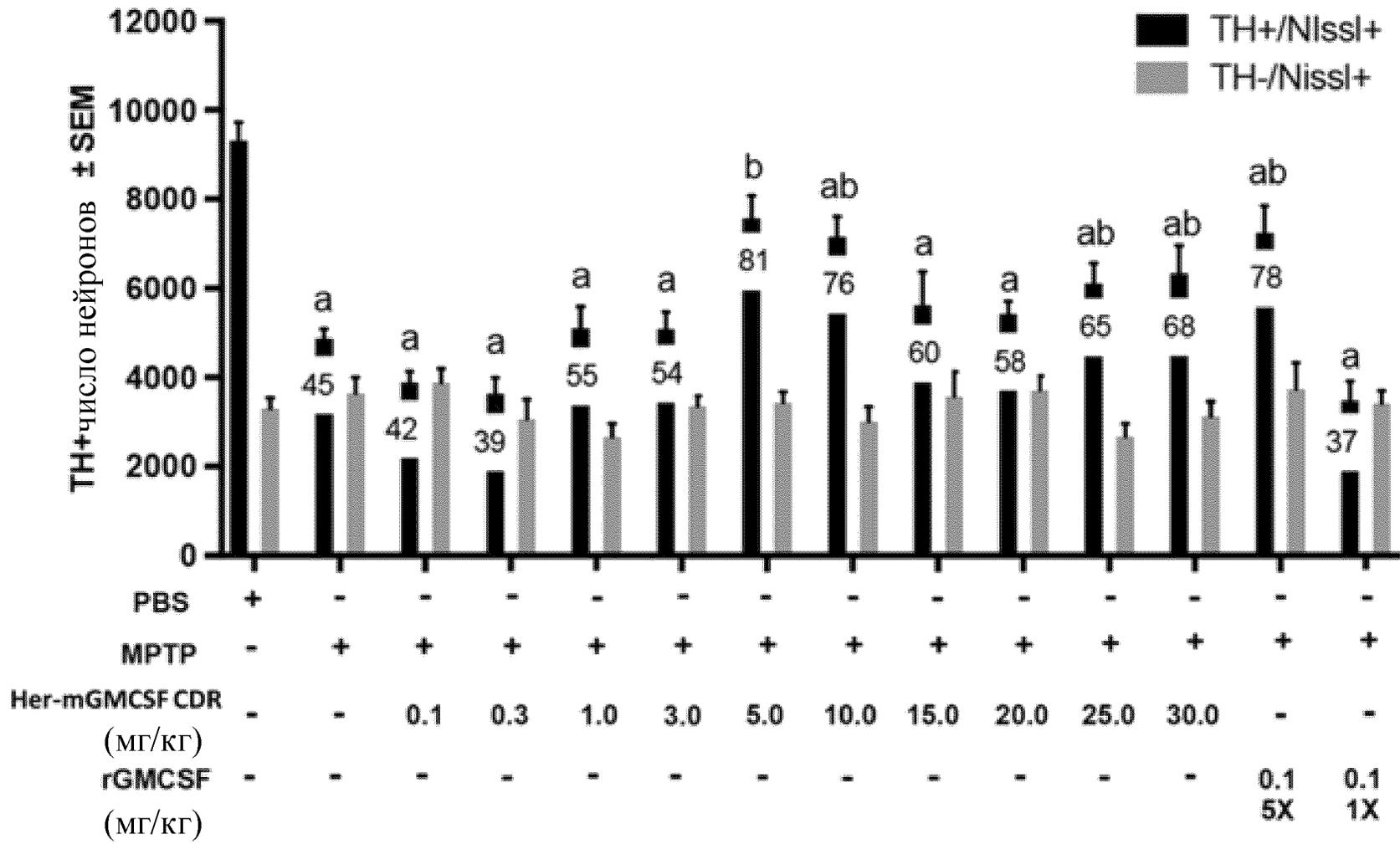
Фиг.1L



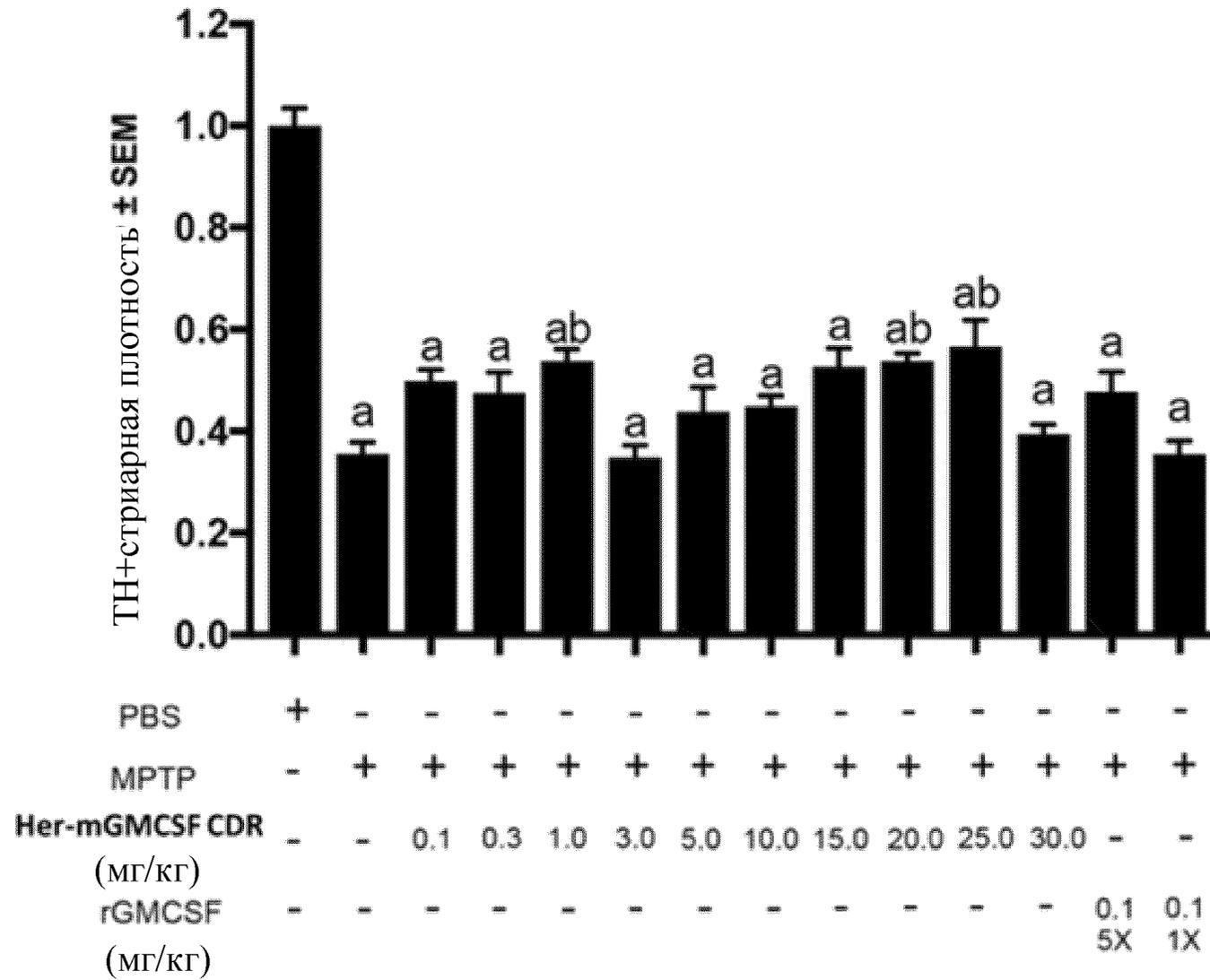
Фиг.2



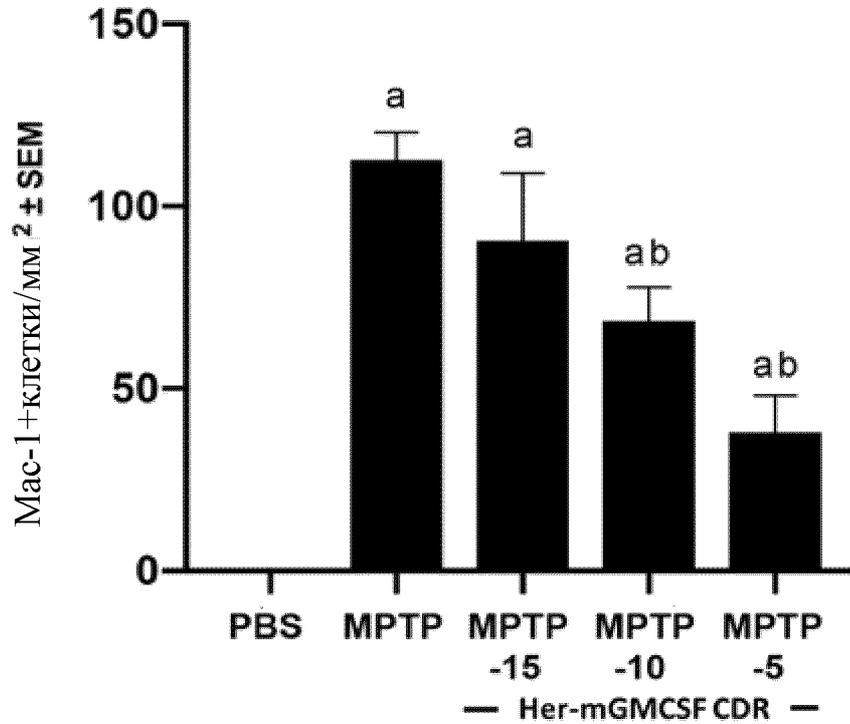
Фиг. 3



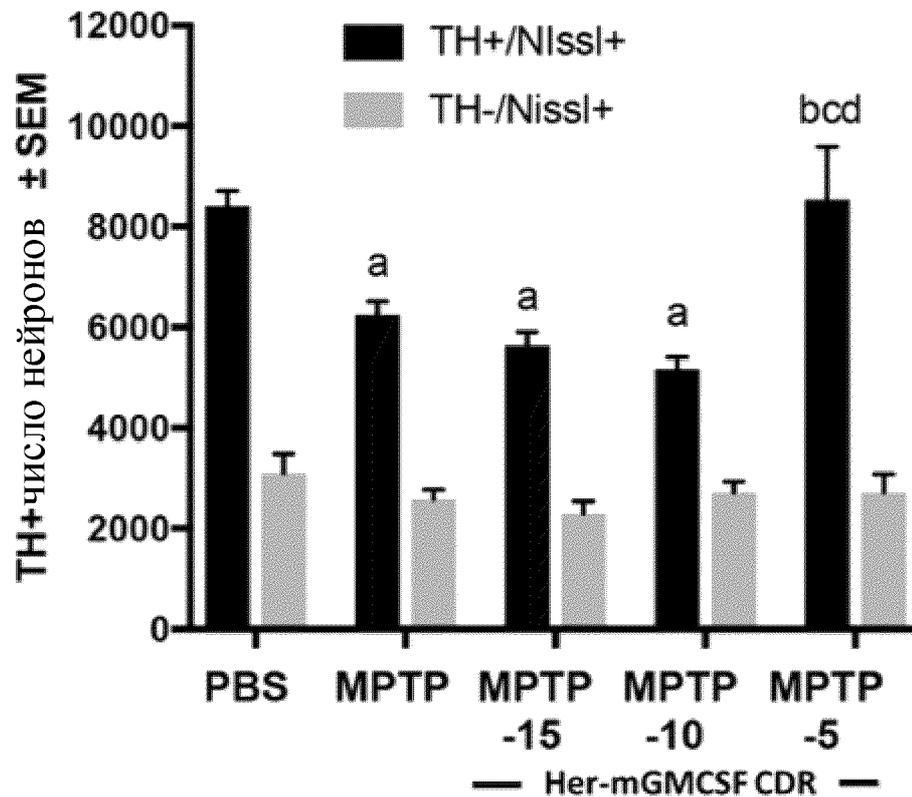
Фиг. 4



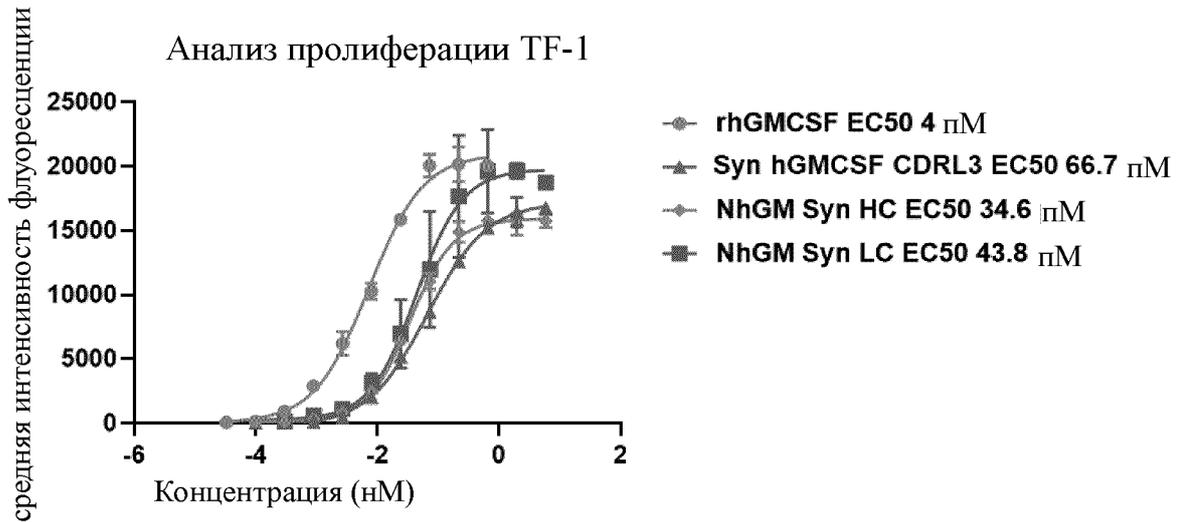
Фиг. 5А



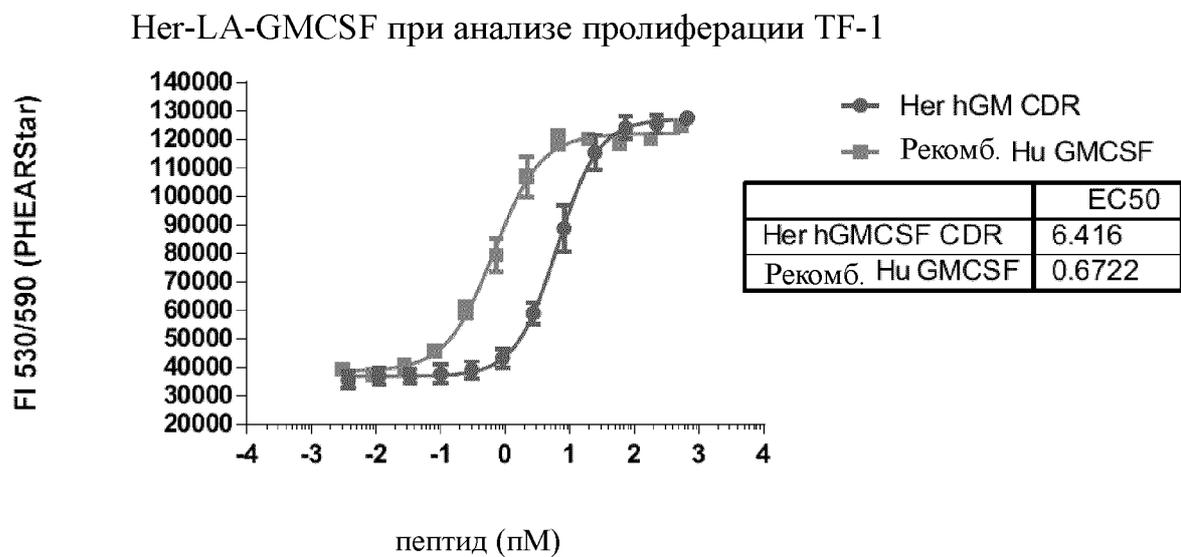
Фиг. 5В



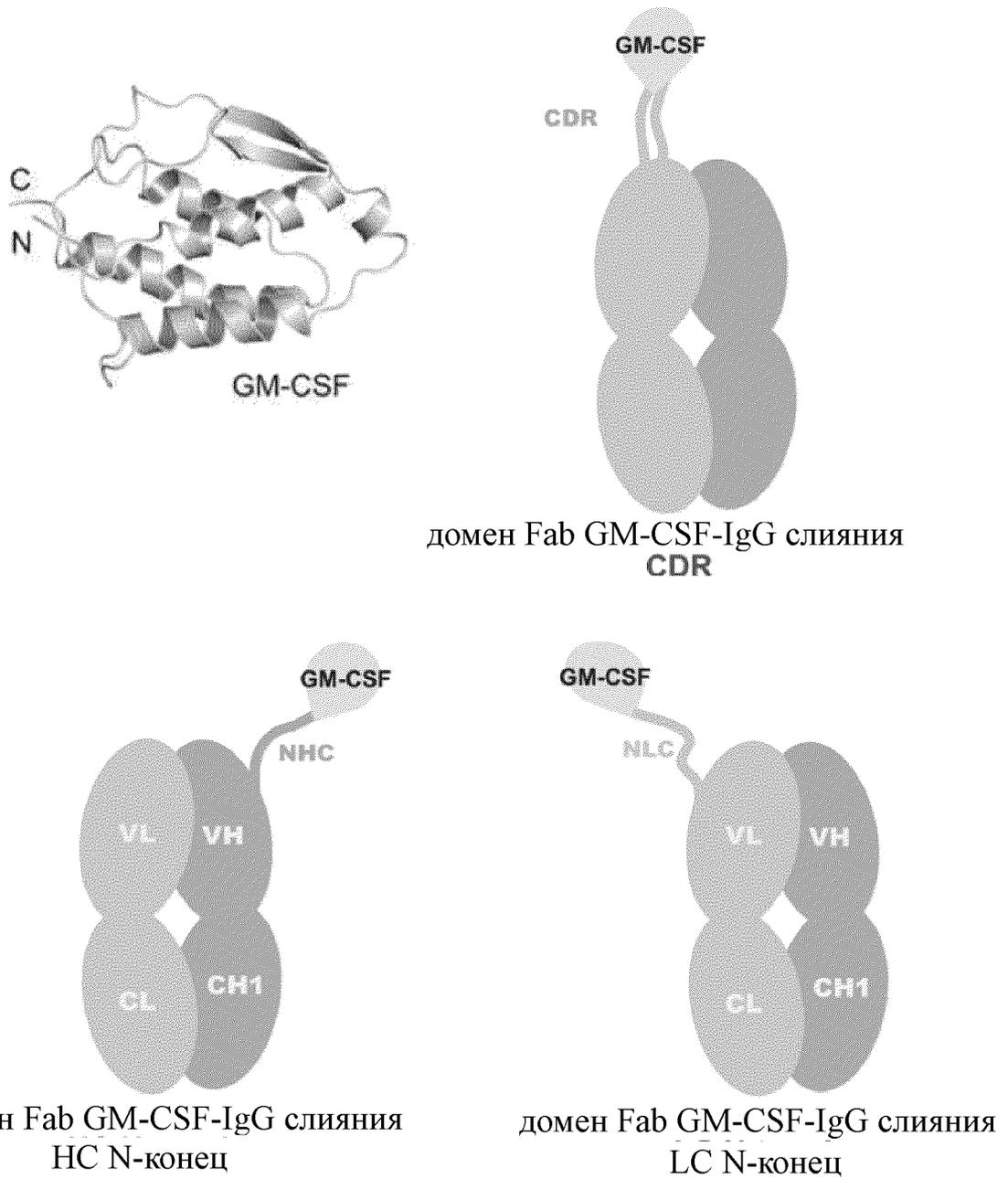
Фиг. 6А



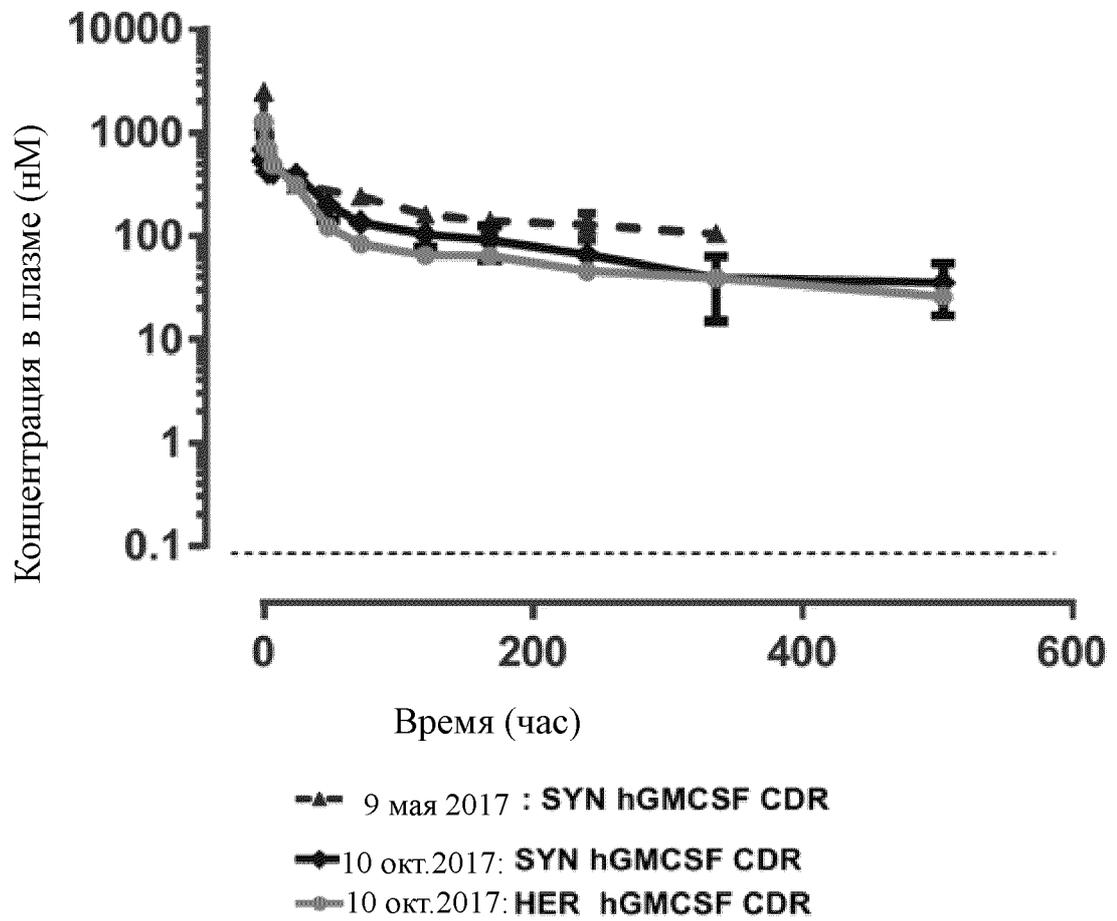
Фиг. 6В



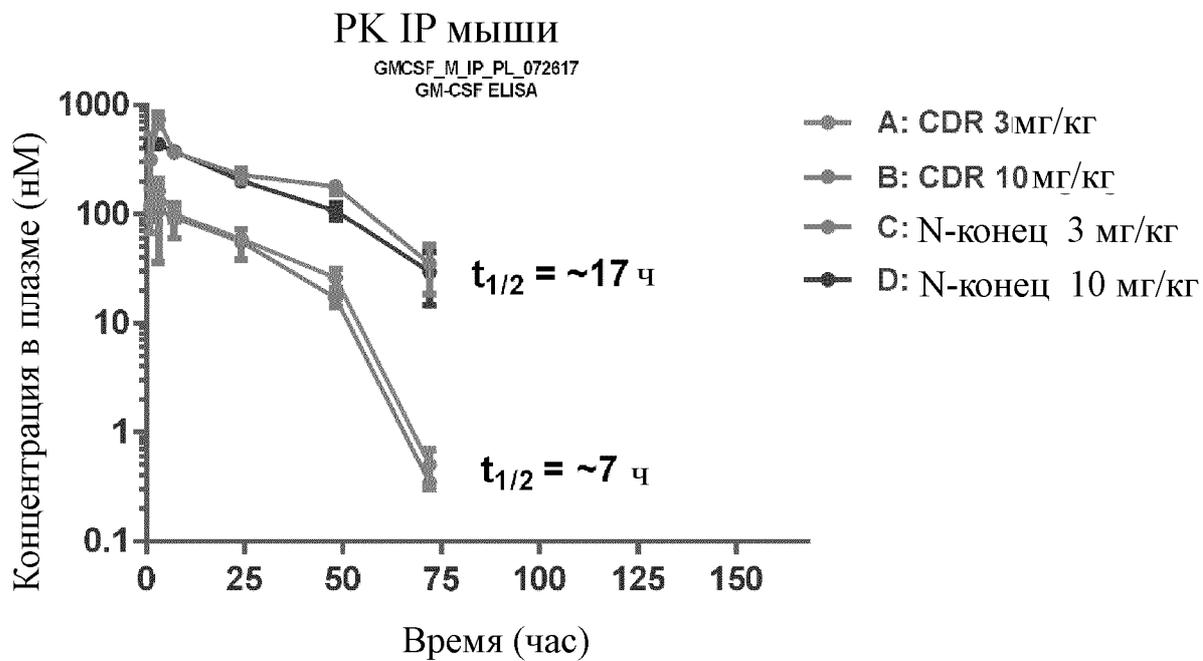
Фиг. 7



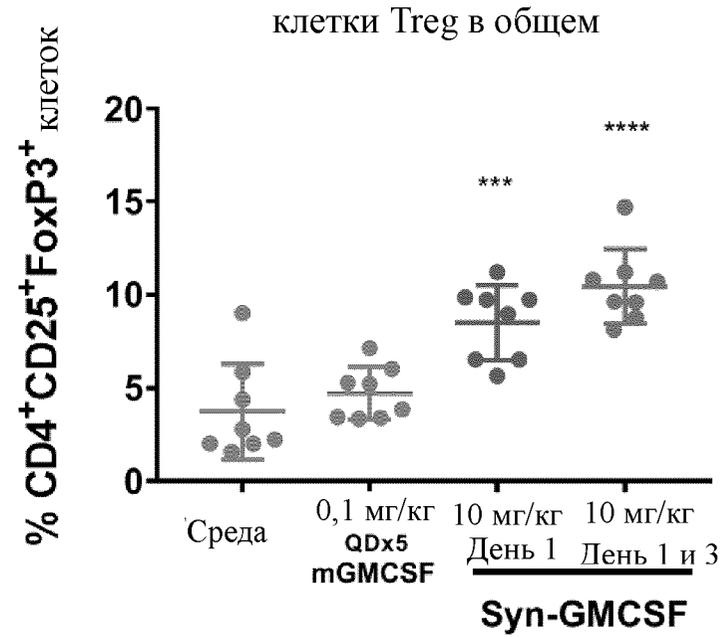
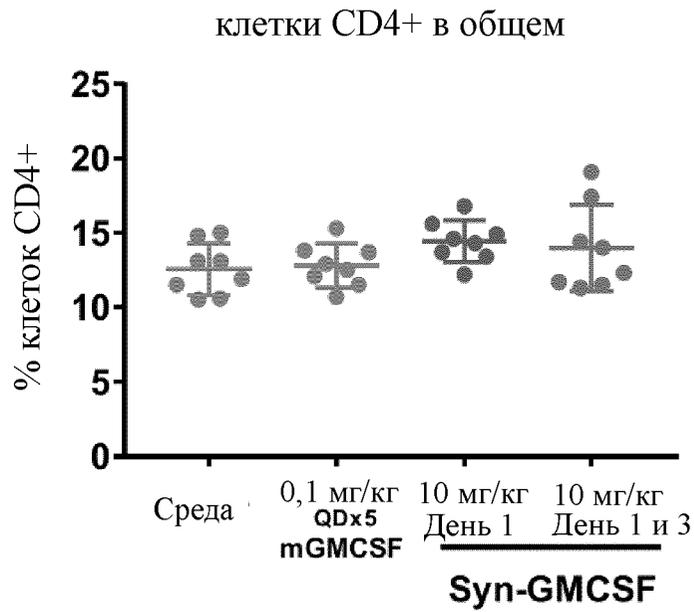
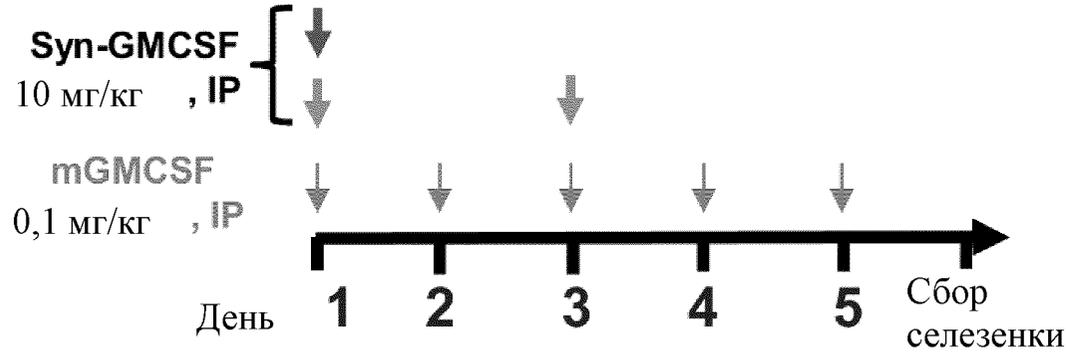
Фиг. 8А



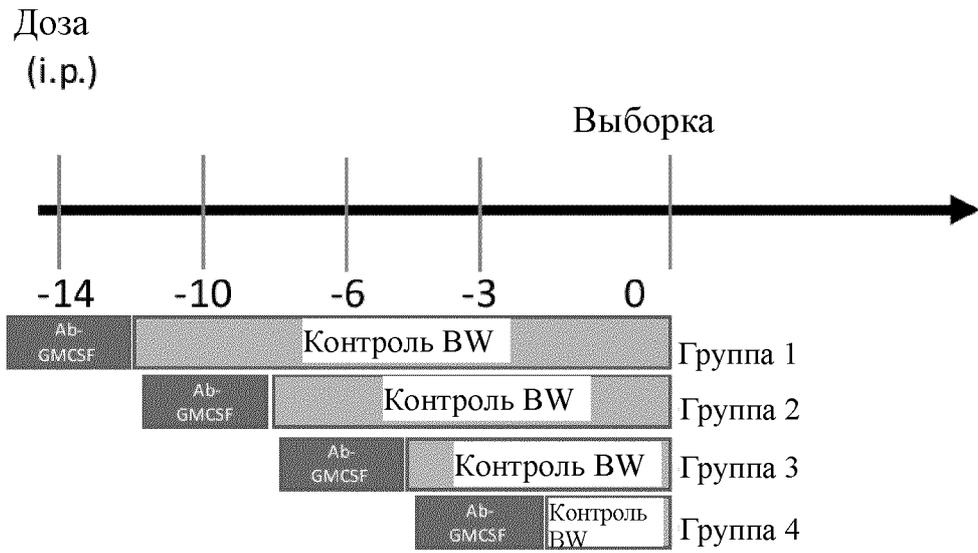
Фиг. 8В



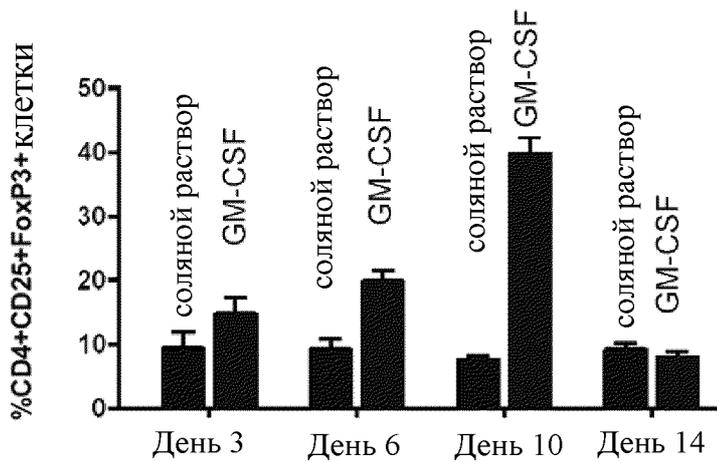
Фиг. 9



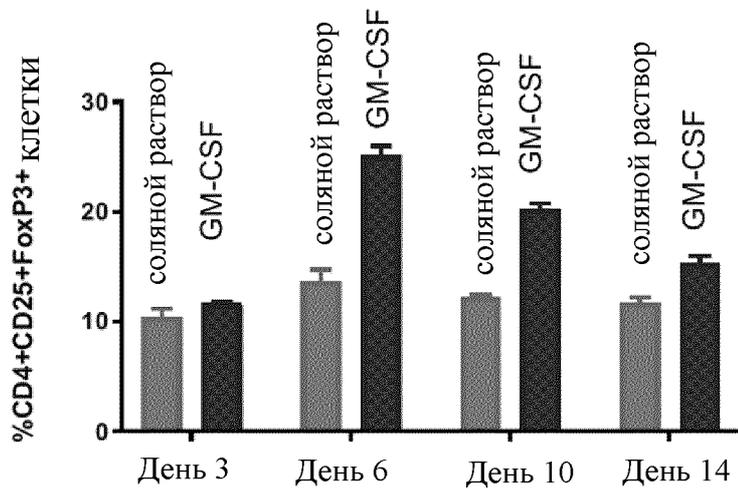
Фиг. 10



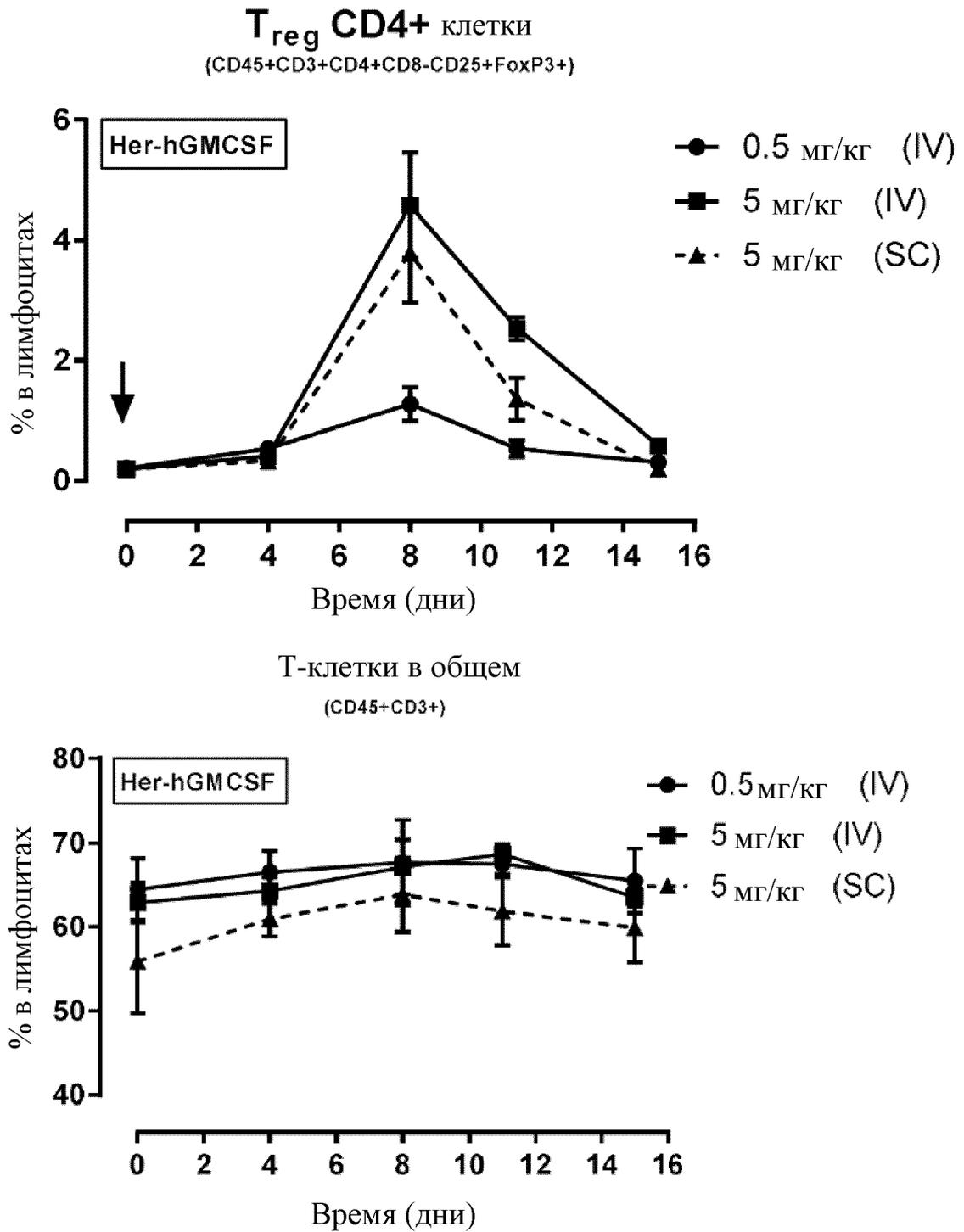
Клетки Трег в крови в общем



Клетки Трег в лимфатических узлах в общем



Фиг. 11



Фиг. 12

