(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202392665 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.28

(22) Дата подачи заявки
2022.03.23

(51) Int. Cl. ***C07K 16/28*** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА uPAR И СЛИТЫЕ С НИМИ БЕЛКИ

(31) **63/165,313**
(32) **2021.03.24**
(33) **US**
(86) **PCT/US2022/021522**
(87) **WO 2022/204267 2022.09.29**

(71) Заявитель:
АЛКЕРМЕС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Дун Цзицзюнь, Гюрель Пинар, Хейбер Джошуа, Ху Юань (US)

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

(57) В настоящем изобретении предлагаются полипептиды, связывающие рецептор урокиназного активатора плазминогена (uPAR) (например, антигенсвязывающие белки uPAR), а также слитые белки, содержащие указанные полипептиды, связывающие uPAR, и цитокин или его вариант. В настоящем изобретении дополнительно предлагаются фармацевтические композиции, полипептиды, связывающие uPAR и слитые белки по настоящему изобретению, а также способы лечения рака с их помощью. В настоящем изобретении дополнительно предлагаются сконструированные полипептиды p35 и p40 IL-12.

202392665 A1

202392665 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579119EA/025

АНТИТЕЛА UPAR И СЛИТЫЕ С НИМИ БЕЛКИ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/165,313, поданной 24 марта 2021 г., полное описание которой включено в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Иммунотерапия представляет собой быстро развивающийся метод лечения рака. Иммунотерапия подразделяется на общие категории: (i) модуляторы молекул иммунных контрольных точек, способные агонизировать или антагонизировать регуляторные молекулы, в зависимости от ситуации, для усиления желаемого иммунного ответа (например, способные агонизировать иммуностимулирующие рецепторы) или для ингибирования нежелательного иммунного ответа (например, способные антагонизировать ингибирующие молекулы иммунных контрольных точек); (ii) цитокины, белковые молекулы, которые помогают регулировать и направлять иммунную систему; и (iii) противораковые вакцины, молекулы (или комбинации), которые генерируют ответы иммунологической памяти на специфические антигены/патогены. Хотя многообещающие иммунотерапевтические средства сейчас уже применяются в клинических условиях, и на этапе разработки находится обнадеживающий портфель новых лекарственных средств/агентов, было бы желательно разработать новые иммунотерапевтические средства для применения отдельно или в комбинации с другими категориями иммунотерапевтических средств, таргетной терапией и традиционной цитотоксической терапией.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антигенсвязывающему белку, который специфически связывается с рецептором урокиназного активатора плазминогена (uPAR), содержащему:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий:

i) аминокислотную последовательность HCDR1 GFNIKDEY (SEQ ID NO: 3), GFSLTNYG (SEQ ID NO: 11), GNTFTDYG (SEQ ID NO: 19), GTTFTDYG (SEQ ID NO: 41), или GYTFTSYG (SEQ ID NO: 27);

ii) аминокислотную последовательность HCDR2 IDPENGDT (SEQ ID NO: 4), IWSDGGT (SEQ ID NO: 12), INTNTGEP (SEQ ID NO: 20), или IYPRSGNT (SEQ ID NO: 28); и

iii) аминокислотную последовательность HCDR3 TGGNYVGWFPY (SEQ ID NO: 5), ARGGRSDLFAY (SEQ ID NO: 13), AHYSFDY (SEQ ID NO: 21), или AGKDYGSTYADY (SEQ ID NO: 29); и

(b) вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий:

iv) аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSY (SEQ ID NO: 6),

QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 14), ENIYSN (SEQ ID NO: 22), SSVSSRY (SEQ ID NO: 30);

v) аминокислотную последовательность LCDR2 DTS (SEQ ID NO: 7), KVS (SEQ ID NO: 15), AAT (SEQ ID NO: 23), или GTS (SEQ ID NO: 31); и

vi) аминокислотную последовательность LCDR3 QQWSSNPPY (SEQ ID NO: 8), FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 16), QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 24), QQYHSDPLT (SEQ ID NO: 32).

В определенных вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42, или SEQ ID NO: 43, а домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 44.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GFNIKDEY (SEQ ID NO: 3), аминокислотную последовательность HCDR2 IDPENGDT (SEQ ID NO: 4), аминокислотную последовательность HCDR3 TGGNYVGWFPY (SEQ ID NO: 5); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSY (SEQ ID NO: 6), аминокислотную последовательность LCDR2 DTS (SEQ ID NO: 7) и аминокислотную последовательность LCDR3 QQWSSNPPY (SEQ ID NO: 8).

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GFSLTNYG (SEQ ID NO: 11), аминокислотную последовательность HCDR2 IWSDGGT (SEQ ID NO: 12), аминокислотную последовательность HCDR3 ARGGRSDLFAY (SEQ ID NO: 13); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 14), аминокислотную последовательность LCDR2 KVS (SEQ ID NO: 15) и аминокислотную последовательность LCDR3 FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 16).

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GNTFTDYG (SEQ ID NO: 19) или GTTFTDYG (SEQ ID NO: 41), аминокислотную последовательность HCDR2 INTNTGEP (SEQ ID NO: 20), аминокислотную последовательность HCDR3 AHYSFDY (SEQ ID NO: 21); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 ENIYSN (SEQ ID NO: 22), аминокислотную последовательность LCDR2 AAT (SEQ ID NO: 23) и аминокислотную последовательность LCDR3 QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 24).

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GYTFTSYG (SEQ ID NO: 27), аминокислотную последовательность HCDR2 IYPRSGNT (SEQ ID NO: 28), аминокислотную последовательность HCDR3 AGKDYGSTYADY (SEQ ID NO: 29); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSSRY (SEQ ID NO: 30), аминокислотную последовательность LCDR2 GTS (SEQ ID NO: 31), и аминокислотную последовательность LCDR3 QQYHSDPLT (SEQ ID NO: 32).

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35;

b) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

c) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

d) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

e) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38;

f) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39;

g) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40;

h) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; или

i) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

В определенных вариантах осуществления домен VH и домен VL соединены аминокислотным линкером.

В определенных вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит (GGGGS)n (SEQ ID NO: 148), где n представляет собой целое число от 1 до 5.

В определенных вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 149), GGSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 150), или GGGSGGGGSG (SEQ ID NO: 246).

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит фрагмент Fab, фрагмент F(ab')2, фрагмент Fd, фрагмент Fv, одноцепочечный Fv (scFv), фрагмент dAb, однодоменное антитело или нанотело.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 56-71.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок дополнительно содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 72-78.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи (HC) антитела SEQ ID NO: 45, 46, 49,

53 или 54 и аминокислотную последовательность легкой цепи (LC) антитела SEQ ID NO: 47, 48, 50, 51, 52 и 55.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит:

a) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47;

b) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48;

c) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47;

d) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48;

e) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50;

f) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51;

g) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52;

h) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; или

i) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 189.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит: первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 178; и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит: первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит: первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 179, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит: первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 162.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит: первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 238; вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159; и третью полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 239.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека с KD меньше чем около 5×10^{-8} M, меньше чем около 1×10^{-8} M, меньше чем около 5×10^{-9} M, меньше чем около 1×10^{-9} M, меньше чем около 5×10^{-10} M или меньше чем около 1×10^{-10} M.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека в присутствии лиганда uPAR.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает uPAR, связанный с лигандом uPAR человека.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека на клетках, экспрессирующих uPAR человека, тем самым создавая флуоресцентный сигнал, детектируемый флуоресцентно меченным антителом, которое связывается с антигенсвязывающим белком, со значением EC50 от около 0,1 нМ до около 3,0 нМ.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека на клетках, экспрессирующих uPAR человека, в присутствии лиганда uPAR.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает домен DII-DIII uPAR человека или домен DIII uPAR человека.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антигенсвязывающему белку, который конкурирует за связывание с антигенсвязывающим белком, указанным выше.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антигенсвязывающему белку, который связывает тот же эпитоп, что и антигенсвязывающий белок, указанный выше.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающий белок, указанный выше, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотидную последовательность, которая кодирует антигенсвязывающий белок, указанный выше.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность, указанную выше.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор экспрессии, указанный выше.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего белка, описанного выше, включающего культивирование указанной выше клетки-хозяина в условиях экспрессии антигенсвязывающего белка.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение антигенсвязывающего белка из клетки-хозяина.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению антигенсвязывающего белка, который специфически связывается с uPAR, для лечения или предотвращения заболевания или нарушения, ассоциированного с активностью или экспрессией uPAR, при этом указанное применение включает введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, указанной выше, субъекту, нуждающемуся в таком лечении.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, указанной выше.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему: (i) антигенсвязывающий белок, указанный выше; и (ii) цитокин или его вариант.

В определенных вариантах осуществления слитого белка, антигенсвязывающий белок и цитокин или его вариант связаны аминокислотным линкером.

В определенных вариантах осуществления слитого белка цитокин или его вариант выбран из группы, состоящей из IL-2, IL-2 с циркулярной перестановкой (cpIL-2), IL-15, IL-15 с циркулярной перестановкой (cpIL-15), IL-6, IL-6 с циркулярной перестановкой (cpIL-6), IL-10 или IL-12.

В определенных вариантах осуществления слитого белка цитокин или его вариант содержит по меньшей мере одну субъединицу интерлейкина-12 (IL-12).

В определенных вариантах осуществления слитого белка субъединица IL-12 содержит одну или обе из p35 и p40.

В определенных вариантах осуществления слитого белка p35 содержит одну или большее количество аминокислотных замен в положениях M12, S27, N28, Q35, F39, S44, C74, M111, V114, M119, M145, F150, L161 и D188 последовательности SEQ ID NO: 81.

В определенных вариантах осуществления слитого белка аминокислотная замена содержит M12S; S27D; N28R; Q35E; F39D или F39H; S44K; C74K, C74D, C74W, C74Y, или C74Q; M111F или M111W; V114I; M119L; M145L; F150Y; L161D или L161Q; D188N; или их комбинацию.

В определенных вариантах осуществления слитого белка аминокислотная замена содержит N28R и Q35E.

В определенных вариантах осуществления слитого белка аминокислотная замена содержит S27D и D188N.

В определенных вариантах осуществления слитого белка аминокислотная замена содержит C74K.

В определенных вариантах осуществления слитого белка аминокислотная замена

содержит S27D, C74K, и D188N.

В определенных вариантах осуществления слитого белка p35 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, или SEQ ID NO: 83.

В определенных вариантах осуществления слитого белка p40 содержит одну или большее количество аминокислотных замен в положениях C177 и C252 последовательности SEQ ID NO: 84.

В определенных вариантах осуществления слитого белка аминокислотная замена C177 выбрана из группы, состоящей из C177S, C177F, C177M, C177H, C177I или C177Q.

В определенных вариантах осуществления слитого белка аминокислотная замена C252 представляет собой C252S.

В определенных вариантах осуществления слитого белка p40 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87.

В определенных вариантах осуществления слитого белка цитокин или его вариант содержит одноцепочечный IL-12 (scIL-12), содержащий субъединицу p35 и p40, присоединенную аминокислотным линкером.

В определенных вариантах осуществления слитого белка аминокислотный линкер содержит последовательность GGSGGGGSGG (SEQ ID NO: 156).

В определенных вариантах осуществления слитого белка scIL-12 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей слитый белок, указанный выше, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотидную последовательность, которая кодирует слитый белок, указанный выше.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность, указанную выше.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор экспрессии, указанный выше.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения указанного выше слитого белка, включающему культивирование указанной выше клетки-хозяина в условиях экспрессии слитого белка.

В определенных вариантах осуществления указанный способ дополнительно включает выделение слитого белка из клетки-хозяина.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению слитого белка, который специфически связывается с uPAR, для лечения или предотвращения заболевания или нарушения, ассоциированного с активностью или экспрессией uPAR, при этом указанное применение включает введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, указанной выше, или слитого белка указанного выше,

субъекту, нуждающемуся в таком лечении.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, указанной выше, или слитого белка, указанного выше.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию или слитый белок вводят одновременно с цитокином или его вариантом или вторым слитым белком, при этом второй слитый белок содержит цитокин или его вариант, отличный от первого слитого белка.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию или слитый белок вводят последовательно с цитокином или его вариантом или вторым слитым белком, при этом второй слитый белок содержит цитокин или его вариант, отличный от первого слитого белка.

В определенных вариантах осуществления цитокин или его вариант содержит субъединицу p35 IL-12 или субъединицу p40 IL-12.

В определенных вариантах осуществления скорость клиренса слитого белка из опухоли пациента ниже, чем скорость клиренса слитого белка из сыворотки пациента.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка и неслитой субъединицы IL-12, при этом:

(a) слитый белок содержит:

(i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с рецептором урокиназного активатора плазминогена (uPAR); и

(ii) субъединицу p35 IL-12 или ее вариант, или субъединицу p40 IL-12 или ее вариант; и

(b) неслитую субъединицу IL-12, содержащую субъединицу p35 IL-12 или ее вариант, или субъединицу p40 IL-12 или ее вариант,

при этом, когда слитый белок содержит субъединицу p35 IL-12 или ее вариант, неслитая субъединица IL-12 содержит субъединицу p40 IL-12 или ее вариант, и когда слитый белок содержит субъединицу p40 IL-12 или ее вариант, неслитая субъединица IL-12 содержит субъединицу p35 IL-12 или ее вариант.

В определенных вариантах осуществления слитый белок и неслитую субъединицу IL-12 вводят последовательно.

В определенных вариантах осуществления один или оба из указанных агентов: слитый белок и неслитая субъединица IL-12, вводят последовательно.

В определенных вариантах осуществления сначала вводят слитый белок, а затем вводят неслитую субъединицу IL-12 после того, как пройдет достаточно времени для накопления слитого белка в опухоли пациента.

В определенных вариантах осуществления сначала вводят слитый белок, а затем вводят неслитую субъединицу IL-12 после того, как пройдет достаточно времени для

существенного снижения концентрации слитого белка в сыворотке пациента.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества первого слитого белка и второго слитого белка, при этом:

(a) первый слитый белок содержит:

(i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с первым эпитопом рецептора урокиназного активатора плазминогена (uPAR); и

(ii) субъединицу p35 IL-12 или ее вариант; и

(b) второй слитый белок содержит:

(i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается со вторым эпитопом uPAR; и

(ii) субъединицу p40 IL-12 или ее вариант.

В определенных вариантах осуществления первый эпитоп и второй эпитоп являются одинаковыми.

В определенных вариантах осуществления первый эпитоп и второй эпитоп отличаются.

В определенных вариантах осуществления первый слитый белок и второй слитый белок вводят последовательно.

В определенных вариантах осуществления один или оба из указанных агентов: первый слитый белок и второй слитый белок, вводят внутривенно.

В определенных вариантах осуществления сначала вводят первый слитый белок, а затем вводят второй слитый белок после того, как пройдет достаточно времени для накопления первого слитого белка в опухоли пациента.

В определенных вариантах осуществления сначала вводят первый слитый белок, а затем вводят второй слитый белок после того, как пройдет достаточно времени для существенного снижения концентрации первого слитого белка в сыворотке пациента.

В определенных вариантах осуществления сначала вводят второй слитый белок, а затем вводят первый слитый белок после того, как пройдет достаточно времени для накопления второго слитого белка в опухоли пациента.

В определенных вариантах осуществления сначала вводят второй слитый белок, а затем вводят первый слитый белок после того, как пройдет достаточно времени для существенного снижения концентрации второго слитого белка в сыворотке пациента.

В определенных вариантах осуществления один или оба из указанных агентов: первый слитый белок и второй слитый белок, содержит антигенсвязывающий белок, содержащий:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GFNIKDEY (SEQ ID NO: 3), аминокислотную последовательность HCDR2 IDPENGDT (SEQ ID NO: 4), аминокислотную последовательность HCDR3 TGGNYVGWFPY (SEQ ID NO: 5); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSY

(SEQ ID NO: 6), аминокислотную последовательность LCDR2 DTS (SEQ ID NO: 7), и аминокислотную последовательность LCDR3 QQWSSNPPY (SEQ ID NO: 8).

В определенных вариантах осуществления один или оба из указанных агентов: первый слитый белок и второй слитый белок, содержит антигенсвязывающий белок, содержащий:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GNTFTDYG (SEQ ID NO: 19), или GTTFTDYG (SEQ ID NO: 41), аминокислотную последовательность HCDR2 INTNTGEP (SEQ ID NO: 20), аминокислотную последовательность HCDR3 AHYSFDY (SEQ ID NO: 21); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 ENIYSN (SEQ ID NO: 22), аминокислотную последовательность LCDR2 AAT (SEQ ID NO: 23), и аминокислотную последовательность LCDR3 QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 24).

В определенных вариантах осуществления один или оба из указанных агентов: первый слитый белок и второй слитый белок, содержит антигенсвязывающий белок, содержащий:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GYTFTSYG (SEQ ID NO: 27), аминокислотную последовательность HCDR2 IYPRSGNT (SEQ ID NO: 28), аминокислотную последовательность HCDR3 AGKDYGSTYADY (SEQ ID NO: 29); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSSRY (SEQ ID NO: 30), аминокислотную последовательность LCDR2 GTS (SEQ ID NO: 31), и аминокислотную последовательность LCDR3 QQYHSDPLT (SEQ ID NO: 32).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к комбинации, содержащей первый слитый белок и второй слитый белок, при этом:

(a) первый слитый белок содержит:

(i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с первым эпитопом рецептора урокиназного активатора плазминогена (uPAR); и

(ii) субъединицу p35 IL-12 или ее вариант; и

(b) второй слитый белок содержит:

(i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается со вторым эпитопом uPAR; и

(ii) субъединицу p40 IL-12 или ее вариант.

В определенных вариантах осуществления первый эпитоп и второй эпитоп являются одинаковыми.

В определенных вариантах осуществления первый эпитоп и второй эпитоп отличаются.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему: (i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с рецептором урокиназного активатора плазминогена (uPAR); и (ii) цитокин или его вариант.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок и цитокин

или его вариант связаны аминокислотным линкером.

В определенных вариантах осуществления цитокин или его вариант выбран из группы, состоящей из IL-2, IL-2 с циркулярной перестановкой (cpIL-2), IL-15, IL15 с циркулярной перестановкой (cpIL-15), IL-6, IL-6 с циркулярной перестановкой (cpIL-6), IL-10 или IL-12.

В определенных вариантах осуществления цитокин или его вариант содержит по меньшей мере одну субъединицу интерлейкина-12 (IL-12).

В определенных вариантах осуществления субъединица IL-12 содержит одну или обе из p35 и p40.

В определенных вариантах осуществления p35 содержит одну или большее количество аминокислотных замен в положениях M12, S27, N28, Q35, F39, S44, C74, M111, V114, M119, M145, F150, L161 и D188 последовательности SEQ ID NO: 81.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит M12S; S27D; N28R; Q35E; F39D или F39H; S44K; C74K, C74D, C74W, C74Y, или C74Q; M111F или M111W; V114I; M119L; M145L; F150Y; L161D или L161Q; D188N; или их комбинацию.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит N28R и Q35E.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит S27D и D188N.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит C74K.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит S27D, C74K, и D188N.

В определенных вариантах осуществления p35 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 или SEQ ID NO: 83.

В определенных вариантах осуществления p40 содержит одну или большее количество аминокислотных замен в положениях C177 и C252 последовательности SEQ ID NO: 84.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена C177 выбрана из группы, состоящей из C177S, C177F, C177M, C177H, C177I или C177Q.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена C252 представляет собой C252S.

В определенных вариантах осуществления p40 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87.

В определенных вариантах осуществления цитокин или его вариант содержит одноцепочечный IL-12 (scIL-12), содержащий субъединицу p35 и p40, присоединенную аминокислотным линкером.

В определенных вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит последовательность GGSGGGGSGG (SEQ ID NO: 156).

В определенных вариантах осуществления scIL-12 содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий:

i) аминокислотную последовательность HCDR1 GFNIKDEY (SEQ ID NO: 3), GFSLTNYG (SEQ ID NO: 11), GNTFTDYG (SEQ ID NO: 19), GTTFTDYG (SEQ ID NO: 41), или GYTFTSYG (SEQ ID NO: 27);

ii) аминокислотную последовательность HCDR2 IDPENGDT (SEQ ID NO: 4), IWSDGGT (SEQ ID NO: 12), INTNTGEP (SEQ ID NO: 20), или IYPRSGNT (SEQ ID NO: 28); и

iii) аминокислотную последовательность HCDR3 TGGNYVGWFPY (SEQ ID NO: 5), ARGGRSDLFAY (SEQ ID NO: 13), AHYSFDY (SEQ ID NO: 21), или AGKDYGSTYADY (SEQ ID NO: 29); и

(b) вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий:

iv) аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSY (SEQ ID NO: 6), QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 14), ENIYSN (SEQ ID NO: 22), SSVSSRY (SEQ ID NO: 30);

v) аминокислотную последовательность LCDR2 DTS (SEQ ID NO: 7), KVS (SEQ ID NO: 15), AAT (SEQ ID NO: 23), или GTS (SEQ ID NO: 31); и

vi) аминокислотную последовательность LCDR3 QQWSSNPPY (SEQ ID NO: 8), FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 16), QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 24), QQYHSDPLT (SEQ ID NO: 32).

В определенных вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42, или SEQ ID NO: 43, а домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 44.

В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GFNIKDEY (SEQ ID NO: 3), аминокислотную последовательность HCDR2 IDPENGDT (SEQ ID NO: 4), аминокислотную последовательность HCDR3 TGGNYVGWFPY (SEQ ID NO: 5); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSY (SEQ ID NO: 6), аминокислотную последовательность LCDR2 DTS (SEQ ID NO: 7) и аминокислотную последовательность LCDR3 QQWSSNPPY (SEQ ID NO: 8).

В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GFSLTNYG (SEQ ID NO: 11), аминокислотную последовательность HCDR2 IWSDGGT (SEQ ID NO: 12), аминокислотную последовательность HCDR3 ARGGRSDLFAY (SEQ ID NO: 13); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 14), аминокислотную последовательность LCDR2 KVS (SEQ ID NO: 15) и аминокислотную последовательность LCDR3 FQGSHVPYT (SEQ ID

NO: 16).

В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GNTFTDYG (SEQ ID NO: 19) или GTTFTDYG (SEQ ID NO: 41), аминокислотную последовательность HCDR2 INTNTGEP (SEQ ID NO: 20), аминокислотную последовательность HCDR3 AHYSFDY (SEQ ID NO: 21); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 ENIYSN (SEQ ID NO: 22), аминокислотную последовательность LCDR2 AAT (SEQ ID NO: 23) и аминокислотную последовательность LCDR3 QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 24).

В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GYTFTSYG (SEQ ID NO: 27), аминокислотную последовательность HCDR2 IYPRSGNT (SEQ ID NO: 28), аминокислотную последовательность HCDR3 AGKDYGSTYADY (SEQ ID NO: 29); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSSRY (SEQ ID NO: 30), аминокислотную последовательность LCDR2 GTS (SEQ ID NO: 31), и аминокислотную последовательность LCDR3 QQYHSDPLT (SEQ ID NO: 32).

В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35;

b) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

c) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

d) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

e) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38;

f) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39;

g) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40;

h) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; или

i) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

В определенных вариантах осуществления домен VH и домен VL соединены аминокислотным линкером.

В определенных вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит (GGGGS)n (SEQ ID NO: 148), где n представляет собой целое число от 1 до 5.

В определенных вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 149), GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 150), или GGGSGGGGSG (SEQ ID NO: 246).

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит фрагмент Fab, фрагмент F(ab')2, фрагмент Fd, фрагмент Fv, одноцепочечный Fv (scFv), фрагмент dAb, однодоменное антитело или нанотело.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 56-71.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок дополнительно содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 72-78.

В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи (HC) антитела SEQ ID NO: 45, 46, 49, 53 или 54, и аминокислотную последовательность легкой цепи антитела (LC) SEQ ID NO: 47, 48, 50, 51, 52 и 55.

В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит:

a) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47;

b) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48;

c) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47;

d) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48;

e) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50;

f) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51;

g) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52;

h) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; или

i) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55.

В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 189.

В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213.

В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит: первую

полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 178, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159.

В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит: первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161.

В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит: первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 179, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159.

В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит: первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162.

В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит: первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 238, вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159, и третью полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 239.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека с KD меньше чем около 5×10^{-8} M, меньше чем около 1×10^{-8} M, меньше чем около 5×10^{-9} M, меньше чем около 1×10^{-9} M, меньше чем около 5×10^{-10} M или меньше чем около 1×10^{-10} M.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека в присутствии лиганда uPAR.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает uPAR, связанный с лигандом uPAR человека.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека на клетках, экспрессирующих uPAR человека, тем самым создавая флуоресцентный сигнал, детектируемый флуоресцентно меченным антителом, которое связывается с антителом или его фрагментом, со значением EC50 от около 0,1 нМ до около 3,0. нМ.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека на клетках, экспрессирующих uPAR человека, в присутствии лиганда uPAR.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает домен DII-DIII uPAR человека или домен DIII uPAR человека.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к сконструированному полипептиду p35 IL-12, содержащему одну или большее количество аминокислотных

замен в положениях S27, N28, Q35, F39, S44, C74, M111, V114, M119, M145, F150, и L161 последовательности SEQ ID NO: 81.

В определенных вариантах осуществления сконструированный полипептид p35 IL-12 дополнительно содержит одну или обе аминокислотные замены S27 и D188.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит M12S; S27D; N28R; Q35E; F39D или F39H; S44K; C74K, C74D, C74W, C74Y, или C74Q; M111F или M111W; V114I; M119L; M145L; F150Y; L161D или L161Q; D188N; или их комбинацию.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит N28R и Q35E.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит C74K.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит S27D, C74K, и D188N.

В определенных вариантах осуществления сконструированный полипептид p35 IL-12 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 или SEQ ID NO: 83.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему: (i) сконструированный полипептид p35 IL-12, описанный выше; и (ii) один или большее количество партнеров по слиянию.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который снижает агрегацию сконструированного полипептида p35 IL-12.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который увеличивает экспрессию сконструированного полипептида p35 IL-12.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который увеличивает период полужизни сконструированного полипептида p35 IL-12 в сыворотке.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат нацеливающийся фрагмент.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат сывороточный альбумин, полиэтиленгликоль (PEG) или антигенсвязывающий белок.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с рецептором урокиназного активатора плазминогена (uPAR).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к сконструированному полипептиду p40 IL-12, содержащему одну или большее количество аминокислотных замен в положениях C177 и C252 последовательности SEQ ID NO: 84.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена C177 выбрана из группы, состоящей из C177S, C177F, C177M, C177H, C177I или C177Q.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена C252 представляет собой C252S.

В определенных вариантах осуществления p40 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему: (i) сконструированный полипептид p40 IL-12, указанный выше; и (ii) один или большее количество партнеров по слиянию.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который снижает агрегацию сконструированного полипептида p40 IL-12.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который увеличивает экспрессию сконструированного полипептида p40 IL-12.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который увеличивает период полужизни сконструированного полипептида p40 IL-12 в сыворотке.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат нацеливающийся фрагмент.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат сывороточный альбумин, полиэтиленгликоль (PEG) или антигенсвязывающий белок.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с рецептором урокиназного активатора плазминогена (uPAR).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему: (i) полипептид, связывающий рецептор урокиназного активатора плазминогена (uPAR); и (ii) цитокин или его вариант.

В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий uPAR, связан с цитокином с помощью аминокислотного линкера.

В определенных вариантах осуществления цитокин содержит функциональный фрагмент, его функциональный вариант или его вариант с циркулярной перестановкой.

В определенных вариантах осуществления цитокин связан через один или большее количество необязательных аминокислотных линкеров со всем или частью рецептора, в отношении которого этот цитокин обладает специфичностью связывания.

В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий uPAR, содержит полипептид урокиназного активатора плазминогена (uPA) или его вариант, способный специфически связывать uPAR.

В определенных вариантах осуществления вариант uPA представляет собой аминокислотный концевой фрагмент (ATF) uPA.

В определенных вариантах осуществления ATF имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 91, или аминокислотную

последовательность по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 91.

В определенных вариантах осуществления ATF uPA содержит одну или большее количество аминокислотных замен или делеций.

В определенных вариантах осуществления uPA имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 90, или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 90.

В определенных вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-2 с циркулярной перестановкой, а рецептор представляет собой IL-2Rα.

В определенных вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-15 с циркулярной перестановкой, а рецептор представляет собой IL-15Rα.

В определенных вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-1 с циркулярной перестановкой, а рецептор представляет собой IL-1RI, IL-1RII.

В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий uPAR, представляет собой антигенсвязывающий белок анти-uPAR.

В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий uPAR, представляет собой фрагмент scFv антитела анти-uPAR.

В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 98, 99, 100, 106, 107, 111 и 113.

В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 98, 99, 111 и 112.

В определенных вариантах осуществления агент, связывающий uPAR, цитокин и рецептор имеют человеческое происхождение.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка, указанного выше.

В определенных вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из: меланомы, карциномы, бластомы и лимфомы.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка, указанного выше.

В определенных вариантах осуществления воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из IBD и RA.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один слитый белок, указанный выше, и необязательно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему:

полипептид, связывающий рецептор урокиназного активатора плазминогена (uPAR), связанный через один или большее количество необязательных аминокислотных линкеров с:

(i) цитокином или его вариантом; или

(ii) модулятором молекулы контрольной точки.

В определенных вариантах осуществления цитокин содержит функциональный фрагмент, его функциональный вариант или его вариант с циркулярной перестановкой.

В определенных вариантах осуществления цитокин связан через один или большее количество необязательных аминокислотных линкеров со всем или частью рецептора, в отношении которого этот цитокин обладает специфичностью связывания.

В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий uPAR, содержит полипептид урокиназного активатора плазминогена (uPA) или его вариант, способный специфически связывать uPAR.

В определенных вариантах осуществления вариант uPA представляет собой аминокислотный концевой фрагмент (ATF) uPA.

В определенных вариантах осуществления ATF имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 91, или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 91.

В определенных вариантах осуществления ATF uPA содержит одну или большее количество аминокислотных замен или делеций.

В определенных вариантах осуществления цитокин или модулятор молекулы контрольной точки выбраны из группы, состоящей из: IL-2, IL-2 с циркулярной перестановкой (cpIL-2), IL-15, IL15 с циркулярной перестановкой (cpIL-15), IL-6, IL-6 с циркулярной перестановкой (cpIL-6), IL-10, IL-12, IL-15, GM-CSF, IFNγ, IFNα, 4-1BBB (CD131) или его лиганда, OX40 или его лиганда, PD-1, PD-L1, антитела анти-PD-1, CTLA-4, антитела анти-CTLA4, GITR или его лиганда, ICOS или его лиганда, CD27, CD70, CD40 или его лиганда.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка, указанного выше.

В определенных вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы и лимфомы.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка, указанного выше.

В определенных вариантах осуществления воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из IBD и RA.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один слитый белок, указанный выше, и

необязательно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу иммунотерапии для лечения рака у пациента, включающий введение слитого белка, указанного выше, пациенту, нуждающемуся в этом.

В определенных вариантах осуществления указанный способ дополнительно включает введение пациенту таргетной терапии рака.

В определенных вариантах осуществления указанный способ дополнительно включает введение пациенту традиционной цитотоксической терапии, выбранной из химиотерапии, лучевой терапии или того и другого.

В определенных вариантах осуществления указанный способ дополнительно включает введение иммунотерапии, выбранной из противораковой вакцины, ингибитора контрольной точки или моноклонального антитела.

В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий uPAR, содержит M25 или гомологичную ему аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности на аминокислотном уровне.

В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий uPAR, содержит P25 или гомологичную ему аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности на аминокислотном уровне.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

ФИГ. 1A - ФИГ. 1B представляют данные по связыванию антитела анти-uPAR против домена DII-DIII (**ФИГ. 1A**) или домена DIII отдельно (**ФИГ. 1B**) uPAR человека.

ФИГ. 2A - ФИГ. 2B представляют данные по связыванию антитела анти-uPAR против uPAR человека (**ФИГ. 2A**) и мыши (**ФИГ. 2B**), экспрессируемого на поверхности клеток HEK 293, сконструированных для экспрессии uPAR человека или uPAR мыши. Антитела анти-uPAR инкубировали с клетками в ходе титрования и определяли средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для тестируемых концентраций антител.

ФИГ. 3 представляет данные связывания Octet между вариантами p35 C74 и вариантами p40 C177. Вдоль оси X первая аминокислота, указанная для каждой точки данных, соответствует замене p35 C74, а вторая аминокислота, указанная для каждой точки данных, соответствует замене p40 C177 (т. е. точка данных «K-S» представляет собой аффинность связывания между вариантом p35 C74K и вариантом p40 C177S).

ФИГ. 4A - ФИГ. 4H представляют схемы нескольких типовых слитых белков субъединиц IL-12. **ФИГ. 4A** представляет одноцепочечный слитый белок p35/p40 IL-12 человека. **ФИГ. 4B** представляет слитый белок «p35/сывороточный альбумин» (например, сывороточный альбумин человека или сывороточный альбумин мыши). **ФИГ. 4C** представляет слитый белок «p35/домен Fc CH2-CH3», соединенный со слитым белком «Fab/домен Fc CH2-CH3». Каждый домен Fc содержит мутацию «Knob-in-Hole (выступ-во-впадину)» (KiH), облегчающую гетеродимеризацию. **ФИГ. 4D** представляет слитый белок «p40/scFv». **ФИГ. 4E** представляет слитый белок«p35/тандемный scFv» (scFv2). **ФИГ. 4F** представляет слитый белок «p35/домен Fc CH2-CH3», соединенный со слитым

белком «scFv/домен Fc CH2-CH3». Каждый домен Fc содержит мутацию KiH, облегчающую гетеродимеризацию. **ФИГ. 4G** представляет слитый белок «p40/домен Fab». **ФИГ. 4H** представляет слитый белок «p40/IgG». Белок p40 связан с C-концом каждого домена CH3 IgG.

ФИГ. 5A - ФИГ. 5B представляют данные фармакокинетики в опухоли и сыворотке, полученные при PET/CT-визуализации радиоактивно меченных субъединиц p40 IL-12, нацеленных на опухоль (**ФИГ. 5A**) и p35 (**ФИГ. 5B**). Субъединицы, нацеленные на опухоль, измеряли в опухоли и крови мышей с течением времени и определяли % максимального воздействия. Нацеленная на опухоль субъединица p40 представляла собой слияние антитела анти-uPAR M37 в формате Fab с p40. Нацеленная на опухоль субъединица p35 представляла собой слияние антитела анти-uPAR M37 в формате KiH с p35.

ФИГ. 6A - ФИГ 6B представляют данные активности IL-12 in vitro на основе клеток, измеренные по % фосфорилирования Stat4 в CD8+ (**ФИГ. 6A**) и CD4+ (**ФИГ. 6B**) T-клетках. Субъединицы IL-12 добавляли к T-клеткам в соотношении 1:1 в указанных концентрациях.

ФИГ. 7 представляет данные активности IL-12 in vitro на основе клеток, измеренные по секреции гамма-интерферона (IFN) T-клетками. Субъединицы IL-12 добавляли к T-клеткам в соотношении 1:1 в указанных концентрациях.

ФИГ. 8A - ФИГ. 8B представляют накопление субъединиц IL-12 в опухоли (**ФИГ. 8A**) и печени (**ФИГ. 8B**) моделей опухолей мышей. Молекулы субъединицы IL-12 представляли собой нетаргетный scIL12, таргетный Fab-p40, нетаргетный p35-MSA, таргетный IgG-p40 и таргетный p35-KiH. «%ID/g» соответствует проценту введенной дозы на грамм ткани.

ФИГ. 9 представляет концентрацию гамма-интерферона (IFN) в сыворотке мышей, получавших scIL-12 или комбинацию p35-MSA и p40-Fab в двух дозах.

ФИГ. 10 представляет данные активности IL-12 in vitro на основе клеток измеренные по % фосфорилирования Stat4 в CD8+ T-клетках в совместной культуре «uPAR-экспрессирующие клетки HEK/T-клетки». Субъединицы IL-12 добавляли к клеткам HEK, экспрессирующим uPAR, в соотношении 1:1 к указанным концентрациям перед совместной инкубацией с CD8+ T-клетками.

ФИГ. 11 представляет накопление выбранных слитых белков в опухолевой ткани на мышиной модели опухоли с ксенотрансплантатом RKO.

ФИГ. 12 представляет накопление выбранных слитых белков в сыворотке на мышиной модели опухоли с ксенотрансплантатом RKO.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к полипептидам, связывающим рецептор урокиназного активатора плазминогена (uPAR) (например, антигенсвязывающие белки uPAR), и слитым белкам, содержащим указанные полипептиды, связывающие uPAR и цитокин или его вариант. Настоящее изобретение дополнительно относится к

фармацевтическим композициям, содержащим полипептиды, связывающие uPAR и слитые белки по настоящему изобретению, а также к способам лечения рака с их помощью. Настоящее изобретение дополнительно относится к сконструированным полипептидам p35 и p40 IL-12.

В общем, номенклатура, применяемая в связи с культурой клеток и тканей, молекулярной биологией, иммунологией, микробиологией, генетикой и химией белков и нуклеиновых кислот, а также гибридизацией, описанной в данном документе, хорошо известна и широко применяется в данной области техники. Способы и методики, представленные в данном документе, обычно выполняются в соответствии с традиционными способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании, если не указано иное. Методики ферментативных реакций и очищения осуществляются в соответствии со спецификациями производителя, как принято в данной области техники или как описано в настоящем документе. Номенклатура, применяемая в связи с описанными в данном документе лабораторными процедурами и методиками аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии, хорошо известна и широко применяется в данной области техники. Для химического синтеза, химического анализа, фармацевтического приготовления, составления и доставки, а также лечения пациентов применяются стандартные методики.

Если в данном документе не указано иное, научные и технические термины, применяемые в данном документе, имеют значения, которые обычно понятны для специалистов в данной области техники. В случае любой скрытой двусмысленности определения, представленные в данном документе, имеют приоритет над любым словарным или посторонним определением. Если иное не требует контекст, термины в единственном числе включают множественное число, а термины во множественном числе включают единственное число. Применение термина «или» означает «и/или», если не указано иное. Применение термина «в том числе», а также других форм, например, «включает» и «включительно», является неограничивающим.

Чтобы изобретение было более понятным, сначала представлены определения некоторых терминов.

Антигенсвязывающие белки

В контексте данного документа термин «антитело» или «антигенсвязывающий белок» относится к молекуле иммуноглобулина или молекуле, полученной из иммуноглобулина, которая специфически связывается или является иммунологически реактивной с антигеном или эпитопом, и включает как поликлональные, так и моноклональные антитела, а также функциональные фрагменты антител, включая, помимо прочего, фрагменты антигенсвязывающих фрагментов (Fab), фрагменты $F(ab')_2$, фрагменты Fab', фрагменты Fv, фрагменты рекомбинантного IgG (rIgG), одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv) и фрагменты однодоменных антител (например, sdAb,

sdFv, нанотела, VHH). Таким образом, антитело может представлять собой однодоменное антитело или содержать по меньшей мере одну вариабельную область легкой и по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна вариабельная легкая и по меньшей мере одна вариабельная тяжелая цепь связаны в одну полипептидную цепь. Термин «антитело» или «антигенсвязывающий белок» включает антитела, полученные из зародышевой линии. Термин «антитело» или «антигенсвязывающий белок» включает генетически сконструированные или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интратела, пептидитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела, гетероконъюгатные антитела (например, биспецифические антитела, диатела, триатела, тетратела, тандемный di-scFv, тандемный tri-scFv) и тому подобное. Если не указано иное, термин «антитело» или «антигенсвязывающий белок» следует понимать как охватывающий функциональные фрагменты антитела.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок является мультиспецифичным (т.е. связывается с двумя или большим количеством различных целевых молекул или с двумя или большим количеством эпитопов на одной и той же целевой молекуле). В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок является биспецифичным и, например, связывается с двумя разными целевыми молекулами или с двумя эпитопами одной и той же целевой молекулы. В определенных вариантах осуществления антитело является триспецифичным и, например, связывается по меньшей мере с тремя различными целевыми молекулами.

Антигенсвязывающий белок может быть моновалентным или поливалентным, т.е. иметь один или большее количество антигенсвязывающих сайтов. Неограничивающие примеры одновалентных антигенсвязывающих белков включают scFv, Fab, scFab, dAb, VHH, V(NAR), DARPins, аффилины и нанотела. Поливалентный антигенсвязывающий белок может иметь два, три, четыре или большее количество антигенсвязывающих сайтов. Неограничивающие примеры поливалентных антигенсвязывающих белков включают полноразмерные иммуноглобулины, фрагменты F(ab')2, bis-scFv (или тандемный scFv или BiTE), DART, диатела, scDb, DVD-Ig, IgG-scFab, scFab-Fc-scFab, IgG-scFv, scFv-Fc, scFv-fc-scFv, Fv2-Fc, FynomABs, квадрому, CrossMab, DuoBody, триатела и тетратела. В некоторых вариантах осуществления поливалентный антигенсвязывающий белок является бивалентным, т.е. присутствует два сайта связывания. В некоторых вариантах осуществления поливалентный антигенсвязывающий белок является биспецифичным, т.е. антигенсвязывающий белок направлен против двух разных мишеней или двух разных целевых сайтов на одной целевой молекуле. В некоторых вариантах осуществления поливалентный антигенсвязывающий белок включает больше двух, например, три или четыре различных сайта связывания для трех или четырех, соответственно, разных антигенов. Такой антигенсвязывающий белок является поливалентным и мультиспецифичным, в частности три- или тетраспецифичным соответственно.

В контексте данного документа «одноцепочечный вариабельный фрагмент» (scFv)

представляет собой антигенсвязывающий белок, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи (VH), связанный с вариабельным доменом легкой цепи (VL). Домены VH и VL scFv связаны посредством любого подходящего линкера, известного в данной области техники. Такие линкеры включают, помимо прочего, повторяющиеся аминокислотные последовательности GGGGS или их варианты. scFv обычно не содержит областей константного домена антитела, хотя scFv по настоящему изобретению может быть связан или присоединен к областям константного домена антитела (например, домену Fc антитела) для изменения различных свойств scFv, включая, помимо прочего, удлинение периода полужизни в сыворотке или ткани. scFv обычно имеет молекулярную массу около 25 кДа и гидродинамический радиус около 2,5 нм. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит тандемный scFv, т.е. первый scFv, связанный со вторым scFv. Первый и второй scFv могут иметь одинаковую аминокислотную последовательность и/или связываться с одним и тем же эпитопом. В альтернативном варианте первый и второй scFv могут иметь разные аминокислотные последовательности и/или связываться с разными эпитопами.

В контексте данного документа «фрагмент Fab» или «Fab» представляет собой фрагмент антитела, содержащий фрагмент легкой цепи, содержащий вариабельный домен легкой цепи (VL) и константный домен легкой цепи (CL), а также вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи.

В контексте данного документа «VHH», «нанотело» или «антитело только с тяжелой цепью» представляет собой антигенсвязывающий белок, содержащий один вариабельный домен тяжелой цепи, полученный из видов семейства Camelidae, которые включают верблюдов, лам, альпак. VHH обычно имеет молекулярную массу около 15 кДа.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок содержит домен Fc. Присутствие домена Fc может быть полезным для индукции цитотоксических иммунных ответов и/или активации комплемента (например, эффекторной функции ADCC/ADCP или CDC). Типовыми форматами антител, включающими домен Fc, помимо прочего, являются полноразмерные иммуноглобулины, DVD-Ig, scFv-Fc и scFv-Fc. слияния scFv, слияния IgG-scFab, scFab-dsscFv, Fv2-Fc, слияния IgG-scFv (такие как, например, bsAb, Bs1Ab, Bs2Ab, Bs3Ab, Ts1Ab, Ts2Ab, Knob-into-Holes (выступ-во-впадину) (KiHs)), DuoBody и/или CrossMabs. Активный домен Fc может повышать вероятность высвобождения провоспалительных цитокинов Т-клетками и другими эффекторными клетками в микроокружении опухоли, что считается частью терапевтического механизма действия. Домен Fc может быть полностью активным или частично подавленным, чтобы избежать чрезмерной стимуляции иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления домен Fc неактивен и не стимулирует высвобождение провоспалительных цитокинов, но все же улучшает период полужизни и/или стабильность антигенсвязывающего белка. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит константную область, выбранную из группы, состоящей из изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В других вариантах

осуществления антигенсвязывающий белок содержит константную область, выбранную из группы, состоящей из изотипа IgG1, IgG2A, IgG2B или IgG3 мыши.

Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению могут содержать один или большее количество линкеров для связывания доменов антигенсвязывающего белка (например, связывания VH и VL с образованием scFv или связывания множества связывающих доменов с образованием мультиспецифического антигенсвязывающего белка).

Иллюстративные примеры линкеров включают глициновые полимеры $(Gly)_n$; глицин-сериновые полимеры $(Gly_nSer)_n$, где n представляет собой целое число, по меньшей мере, один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь; глицин-аланиновые полимеры; аланин-сериновые полимеры; и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники.

Глициновые полимеры и Глицин-сериновые полимеры относительно неструктурированы и, следовательно, могут служить нейтральной связью между доменами слитых белков, таких как описанные в данном документе антигенсвязывающие белки. Глицин имеет доступ к значительно большему пространству phi-psi, чем другие аминокислоты с малой боковой цепью, и гораздо менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (Scheraga, Rev. Computational Chem. 1: 1173-142 (1992)). Специалист в данной области техники поймет, что конструкция антигенсвязывающего белка в конкретных вариантах осуществления может включать линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, так что линкер может включать гибкие участки линкера, а также один или большее количество участков, которые придают меньшую гибкость для обеспечения желаемой структуры.

Однако линкерные последовательности могут быть выбраны так, чтобы они напоминали природные линкерные последовательности, например, с применением аминокислотных участков, соответствующих началу последовательностей CH1 и Cк человека, или аминокислотных участков, соответствующих нижней части шарнирной области IgG человека.

Конструкция пептидных линкеров, соединяющих домены VL и VH в фрагментах scFv, представляет собой гибкие линкеры, обычно состоящие из небольших, неполярных или полярных остатков, таких как, например, Gly, Ser и Thr. Особенно показательным линкером, соединяющим вариабельные домены фрагментов scFv, является линкер $(Gly_4Ser)_4$, где 4 представляет собой примерное количество повторов мотива. В определенных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность GGSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGSGG, GGGGSGGGGSGGGGS или GGGSGGGGSG (SEQ ID NO: 246).

В определенных вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит (GGGGS)n (SEQ ID NO: 148), где n представляет собой целое число от 1 до 5. В определенных вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит (GGGS)n (SEQ ID NO: 247), где n представляет собой целое число от 1 до 5.

Другие типовые линкеры включают, помимо прочего, следующие аминокислотные последовательности: GGG; DGGGS; TGEKP (Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci.94: 5525-5530 (1997)); GGRR; $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 148), где n=1, 2, 3, 4 или 5 (Kim et al, Proc. Natl. Acad. Sci.93: 1156-1160 (1996)); EGKSSGSGSESKVD (Chaudhary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 1066-1070 (1990)); KESGSVSSEQLAQFRSLD (Bird et al., Science 242:423- 426 (1988)), GGRRGGGS; LRQRDGERP; LRQKDGGGSERP; и GSTSGSGKPGSGEGSTKG (Cooper et al., Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)). В альтернативном варианте гибкие линкеры могут быть рационально разработаны с применением компьютерной программы, способной моделировать трехмерную структуру белков и пептидов, или с помощью методов фагового дисплея.

Антитела могут содержать вариабельного домена легкой цепи (VL) и вариабельного домена тяжелой цепи (VH). Каждый домен VL и VH дополнительно содержит набор из трех CDR.

В контексте данного документа термин «область, определяющая комплементарность» или «CDR» относится к несмежным последовательностям аминокислот в вариабельных областях антитела, которые придают антигенную специфичность и аффинность связывания. В основном, имеется три CDR в каждом вариабельном домене тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три CDR в каждом вариабельном домене легкой цепи (LCDR1, LCDR2, LCDR3). В данной области техники известно, что «каркасные области» или «FR» относятся к не-CDR частям вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей. В основном, имеется четыре FR в каждом вариабельном домене тяжелой цепи (HFR1, HFR2, HFR3 и HFR4) и четыре FR в каждом вариабельном домене легкой цепи (LFR1, LFR2, LFR3 и LFR4). Соответственно, аминокислотная последовательность вариабельной области антитела может быть представлена формулой FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Каждый сегмент формулы, то есть FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4, представляет собой дискретную аминокислотную последовательность (или полинуклеотидную последовательность, кодирующую ее), которая может быть мутирована, включая одну или большее количество аминокислотных замен, делеций и вставок. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела может быть представлена формулой LFR1-LCDR1-LFR2-LCDR2-LFR3-LCDR3-LFR4. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела может быть представлена формулой HFR1-HCDR1-HFR2-HCDR2-HFR3-HCDR3-HFR4.

Точные границы аминокислотных последовательностей данной CDR или FR можно легко определить с применением 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 M P et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev Comp Immunol, 2003 January; 27(1):55-77 (схема нумерации «IMGT»), а также Honegger A и Pluckthun 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»).

Границы заданных CDR или FR могут варьироваться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например, схема Kabat основана на структурных выравниваниях, тогда как схема Chothia основана на структурной информации. Нумерация для обеих схем, по Kabat и по Chothia, основана на наиболее распространенных длинах последовательностей областей антител со вставками, обозначаемыми вставленными буквами, например, «30a», и делециями, присутствующими в некоторых антителах. В этих двух схемах некоторые вставки и делеции («индели») помещены в разных положениях, что приводит к разнице в нумерации. Схема Contact основана на анализе комплексных кристаллических структур и во многих отношениях является аналогичной схеме нумерации Chothia.

Таким образом, если не указано иное, следует понимать, что «CDR» или «область, определяющая комплементарность» или отдельные указанные CDR (например, HCDR1, HCDR2) данного антитела или его фрагмента, такого как его вариабельный домен, охватывают (или являются специфичными) область, определяющая комплементарность, как определено любой из известных схем. Аналогичным образом, если не указано иное, следует понимать, что «FR» или «каркасная область» или отдельные указанные FR (например, «HFR1», «HFR2») данного антитела или его фрагмента, такого как его вариабельный домен, охватывают (или являются специфичными) каркасную область, как определено любой из известных схем. В некоторых случаях указана схема идентификации конкретной CDR или FR, например, CDR, как определено методом Kabat, Chothia или Contact. В других случаях приводится конкретная аминокислотная последовательность CDR или FR.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, являются гуманизированными. В контексте данного документа термин «гуманизированный» или «гуманизация» относится к антигенсвязывающему белку, который был изменен, чтобы сделать его более похожим на антитело человека. Нечеловеческие антигенсвязывающие белки, такие как антигенсвязывающие белки мыши, описанные в данном документе, могут вызывать отрицательную иммунную реакцию при введении человеку для терапии. Поэтому выгодно гуманизировать нечеловеческие (например, мышиные) антигенсвязывающие белки для последующего терапевтического применения.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки гуманизируются посредством обновления поверхности (т.е. ремоделируют доступные для растворителей остатки нечеловеческого каркаса так, что они становятся более похожими

на человеческие). Стратегии обновления поверхности описаны более подробно в WO2004/016740, WO2008/144757 и WO2005/016950, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки гуманизируют посредством прививки CDR (т.е. встраивания CDR антигенсвязывающего белка мыши в акцепторный каркас антитела человека).

В контексте данного документа термин «аффинность» относится к силе взаимодействия между антигенсвязывающим сайтом антитела и эпитопом, с которым оно связывается. Как нетрудно понять специалистам в данной области техники, аффинность антитела или антигенсвязывающего белка может быть указана как константа диссоциации (KD) в молярном отношении (M). Антитела по настоящему изобретению могут иметь значения KD в диапазоне от 10^{-8} до 10^{-14} M. Высокоаффинные антитела имеют значения KD 10^{-9} M (1 наномоль, нМ) и ниже. Например, высокоаффинное антитело может иметь значение KD в диапазоне от около 1 нМ до около 0,01 нМ. Антитело с высокой аффинностью может иметь значение KD около 1 нМ, около 0,9 нМ, около 0,8 нМ, около 0,7 нМ, около 0,6 нМ, около 0,5 нМ, около 0,4 нМ, около 0,3 нМ, около 0,2 нМ или около 0,1 нМ. Антитела с очень высокой аффинностью имеют значения KD 10^{-12} M (1 пикомоль, пМ) и ниже. Антитела со слабой или низкой аффинностью могут иметь значения KD в диапазоне от 10^{-1} до 10^{-4} M. Антитела с низкой аффинностью могут иметь значения KD 10^{-4} M и выше, например, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, или 10^{-1} M.

Способность антитела связываться со специфической антигенной детерминантой (например, uPAR) может быть измерена либо с помощью иммуноферментного анализа (ELISA), либо с помощью других методов, известных специалисту в данной области техники, например, методика поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (анализируется на приборе BIAcore) (Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)) и традиционные анализы связывания (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)).

Различные аминокислотные последовательности константного домена антитела, применяемые в настоящем изобретении, указаны ниже в **Таблице 1**.

Таблица 1 - Аминокислотные последовательности константного домена антитела

ID последовательности	Последовательность
IgG1 CH1-шарнир-CH2-CH3 (WT)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS

	LSLSPGK (SEQ ID NO: 72)
IgG1 CH1-шарнир-CH2-CH3 (LALA)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 73)
IgG1 CH1-шарнир-CH2-CH3 (LALA-PG)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKAL**G**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
IgG1 CH2-CH3 (T366W мутация - Выступ)	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 75)
IgG1 CH2-CH3 (мутации T366S, L368A, Y407V - Hole)	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 76)
IgG1 CH2-CH3 (Выступ T366W; LALA-PG)	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY

	NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 77)
IgG1 CH2-CH3 (Hole T366S, L368A, Y407V; LALA-PG; H435R; Y436F)	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 78)
IgG1 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKS**C** (SEQ ID NO: 79)
Каппа CL1	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 80)

Гетеродимеризация антигенсвязывающего белка

В одном аспекте настоящего изобретения антигенсвязывающие белки, содержащие два домена Fc, гетеродимеризуются посредством сопряжения «выступы-во-впадины» (KiH). В этом методе димеризации используются протрузии («выступы») и полости («впадины»), встроенные в границу раздела доменов CH3. Если на границе раздела первого или второго домена CH3 имеется выступ или впадина подходящего размера и расположения, необходимо только создать соответствующую впадину или выступ, соответственно, на соседней границе раздела, что тем самым будет способствовать и усиливать сопряжение доменов Fc на границе раздела доменов CH3/CH3. «Выступ» относится к по меньшей мере одной боковой цепи аминокислоты, обычно к более крупной боковой цепи, которая выступает из границы раздела части CH3 первого домена Fc. Протрузия создает «выступ», который является комплементарным «впадине» в части CH3 второго домена Fc и принимается этой «впадиной». «Впадина» представляет собой по меньшей мере одну боковую цепь аминокислоты, обычно меньшую боковую цепь, которая отступает от границы раздела части CH3 второго домена Fc. Эта технология описана, например, в патенте США № 5,821,333; Ridgway et al., Protein Engineering 9:617-621 (1996); и публикации Carter P., J. Immunol. Methods 248: 7-15 (2001).

Типовые аминокислотные остатки, которые могут действовать как выступ, включают аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y) и триптофан (W). Существующий

аминокислотный остаток в домене CH3 может быть заменен или замещен аминокислотным остатком «выступом». Предпочтительные замещаемые аминокислоты могут включать любую аминокислоту с небольшой боковой цепью, такую как аланин (A), аспарагин (N), аспарагиновая кислота (D), глицин (G), серин (S), треонин (T), или валин (V).

Типовые аминокислотные остатки, которые могут действовать как впадина, включают аланин (A), серин (S), треонин (T) и валин (V). Существующий аминокислотный остаток в домене CH3 может быть заменен или замещен аминокислотным остатком «впадиной». Предпочтительные замещаемые аминокислоты могут включать любую аминокислоту с большой или объемистой боковой цепью, такую как аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y) или триптофан (W).

Домен CH3 может быть получен из антитела IgG1 человека. Типовые аминокислотные замены в домене CH3 включают T366Y, T366W, F405A, F405W, Y407T, Y407A, Y407V, T394S и их комбинации. Определенной типовой комбинацией является T366Y или T366W для мутации по типу выступа в первом домене CH3 и Y407T или Y407V для мутации по типу впадины во втором домене CH3.

В определенных вариантах осуществления Fc домен KiH содержит часть Fc с выступом, содержащую аминокислотную замену T366W, и часть Fc с впадиной, содержащую аминокислотные замены T366S, L368A, Y407V, в соответствии с нумерацией Eu. В определенных вариантах осуществления часть Fc с впадиной дополнительно содержит аминокислотные замены H435R и Y436F в соответствии с нумерацией Eu.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающие белки, содержащие два домена Fc, гетеродимеризуются посредством обмена Fab arm (FAE). IgG1 человека, обладающее шарнирной мутацией P228S, может содержать мутацию домена CH3 F405L или K409R. Смешение двух антител с восстановителем приводит к FAE. Эта технология описана в патенте США № 9,212,230 и Labrijn A.F., Proc Natl Acad Sci USA 110(13): 5145-5150 (2013).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающие белки, содержащие два домена Fc, гетеродимеризуются посредством эффектов электростатического управления. В этом методе димеризации используются эффекты электростатического управления для стимулирования и усиления сопряжения доменов Fc на границе раздела доменов CH3/CH3. Комплементарность зарядов между двумя доменами CH3 изменяется в пользу гетеродимеризации (сопряжение противоположных зарядов) по сравнению с гомодимеризацией (сопряжение одинаковых зарядов). В этом способе электростатические силы отталкивания предотвращают гомодимеризацию. Типовые замены аминокислотных остатков могут включать K409D, K392D и/или K370D в первом домене CH3 и D399K, E356K и/или E357K во втором домене CH3. Эта технология описана в публикации заявки на патент США № 2014/0154254 A1 и Gunasekaran K., J Biol Chem 285(25): 19637-19646 (2010).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающие белки, содержащие два домена Fc, гетеродимеризуются посредством эффектов гидрофобного взаимодействия. В этом методе димеризации используются гидрофобные взаимодействия вместо электростатического управления для стимулирования и усиления сопряжения доменов Fc на границе раздела доменов CH3/CH3. Типовая замена аминокислотного остатка может включать K409W, K360E, Q347E, Y349S и/или S354C в первом домене CH3 и D399V, F405T, Q347R, E357W и/или Y349C во втором домене CH3. Предпочтительные пары замен аминокислотных остатков между первым доменом CH3 и вторым доменом CH3 включают K409W:D399V, K409W:F405T, K360E:Q347R, Y349S:E357W, и S354C:Y349C. Эта технология описана в публикации заявки на патент США № 2015/0307628 A1.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающие белки, содержащие два домена Fc, гетеродимеризуются посредством применения слияний с лейциновой молнией. Домены-лейциновые молнии, слитые с C-концом каждого домена CH3 цепей антител, вызывают гетеродимеризацию. Эта технология описана в Wranik B., J Biol Chem 287(52): 43331-43339 (2012).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающие белки, содержащие два домена Fc, гетеродимеризуются посредством применения тела сконструированного домена с обменом цепей (Strand Exchange Engineered Domain, SEED). Домены CH3, полученные из формата IgG и IgA, вызывают гетеродимеризацию. Эта технология описана в публикации Muda M., Protein Eng. Des. Sel. 24(5): 447-454 (2011).

Если не указано иное, вся нумерация константных областей антитела, применяемая в данном документе, соответствует схеме нумерации Eu, как описано в Edelman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1): 78-85 (1969).

В данной области техники известны дополнительные способы гетеродимеризации тяжелых и/или легких цепей, а также получения и очистки асимметричных антител. См., например, публикацию Klein C., mABs 4(6): 653-663 (2012) и патент США № 9,499,634, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

Предполагается, что дополнительные мутации домена Fc изменят функцию Fc, включая, помимо прочего, измененную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит константный домен IgG1 с аминокислотной заменой L234A и L235A в соответствии с нумерацией Eu.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит константный домен IgG1 с аминокислотной заменой P329G в соответствии с нумерацией Eu.

Полипептиды, связывающие рецептор урокиназного активатора плазминогена (uPAR)

В контексте данного документа термин «uPAR», или «рецептор урокиназного активатора плазминогена», или «рецептор урокиназы», или «рецептор uPA», или «CD87», или «кластер дифференцировки 87» относится к цели антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе. uPAR состоит из трех различных доменов семейства Ly-6/uPAR/альфа-нейротоксинов. Все три домена участвуют в высокоаффинном связывании первичного лиганда урокиназы. Помимо первичного лиганда урокиназы , uPAR взаимодействует с несколькими другими белками, включая витронектин, uPAR-ассоциированный белок (uPARAP) и семейство мембранных белков интегринов.

В контексте данного документа термин «связывающий полипептид» или «связывающий белок» соответствует полипептиду, который специфически связывается с целевым белком (например, uPAR). Связывающие полипептиды включают, помимо прочего, антигенсвязывающие белки, как описано выше, а также лиганды целевого белка. В определенных вариантах осуществления связывающий полипептид представляет собой полипептид урокиназного активатора плазминогена (uPA) или его вариант, способный специфически связывать uPAR. В определенных вариантах осуществления вариант uPA представляет собой аминокислотный концевой фрагмент (ATF) uPA. В определенных вариантах осуществления ATF имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 91, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 91. В определенных вариантах осуществления ATF uPA содержит одну или большее количество аминокислотных замен или делеций. В определенных вариантах осуществления uPA имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 90, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 90.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антигенсвязывающему белку, который специфически связывается с рецептором урокиназного активатора плазминогена (uPAR), содержащему:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий:

i) аминокислотную последовательность HCDR1 GFNIKDEY (SEQ ID NO: 3), GFSLTNYG (SEQ ID NO: 11), GNTFTDYG (SEQ ID NO: 19), GTTFTDYG (SEQ ID NO: 41), или GYTFTSYG (SEQ ID NO: 27);

ii) аминокислотную последовательность HCDR2 IDPENGDT (SEQ ID NO: 4), IWSDGGT (SEQ ID NO: 12), INTNTGEP (SEQ ID NO: 20), или IYPRSGNT (SEQ ID NO: 28); и

iii) аминокислотную последовательность HCDR3 TGGNYVGWFPY (SEQ ID NO: 5), ARGGRSDLFAY (SEQ ID NO: 13), AHYSFDY (SEQ ID NO: 21), или AGKDYGSTYADY (SEQ ID NO: 29); и

(b) вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий:

iv) аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSY (SEQ ID NO: 6), QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 14), ENIYSN (SEQ ID NO: 22), SSVSSRY (SEQ ID NO: 30);

v) аминокислотную последовательность LCDR2 DTS (SEQ ID NO: 7), KVS (SEQ ID NO: 15), AAT (SEQ ID NO: 23), или GTS (SEQ ID NO: 31); и

vi) аминокислотную последовательность LCDR3 QQWSSNPPY (SEQ ID NO: 8), FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 16), QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 24), QQYHSDPLT (SEQ ID NO: 32).

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению имеют по меньшей мере около 80% (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99%) сходство или идентичность последовательности с любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3, как указано выше, а также в **Таблице 3** и **Таблице 8**.

В определенных вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42, или SEQ ID NO: 43, а домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 44.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению имеют по меньшей мере около 80% (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99%) сходство или идентичность последовательности с любой аминокислотной последовательностью VH или VL, как указано выше, а также в **Таблице 3** и **Таблице 8**.

В определенных вариантах осуществления:

a) домен VH содержит аминокислотную последовательность HCDR1 GFNIKDEY (SEQ ID NO: 3), аминокислотную последовательность HCDR2 IDPENGDT (SEQ ID NO: 4), аминокислотную последовательность HCDR3 TGGNYVGWFPY (SEQ ID NO: 5); и

b) домен VL содержит аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSY (SEQ ID NO: 6), аминокислотную последовательность LCDR2 DTS (SEQ ID NO: 7) и аминокислотную последовательность LCDR3 QQWSSNPPY (SEQ ID NO: 8).

В определенных вариантах осуществления:

a) домен VH содержит аминокислотную последовательность HCDR1 GFSLTNYG (SEQ ID NO: 11), аминокислотную последовательность HCDR2 IWSDGGT (SEQ ID NO: 12), аминокислотную последовательность HCDR3 ARGGRSDLFAY (SEQ ID NO: 13) ; и

b) домен VL содержит аминокислотную последовательность LCDR1 QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 14), аминокислотную последовательность LCDR2 KVS (SEQ ID NO: 15) и аминокислотную последовательность LCDR3 FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 16).

В определенных вариантах осуществления:

a) домен VH содержит аминокислотную последовательность HCDR1 GNTFTDYG (SEQ ID NO: 19) или GTTFTDYG (SEQ ID NO: 41), аминокислотную последовательность

HCDR2 INTNTGEP (SEQ ID NO: 20), аминокислотную последовательность HCDR3 AHYSFDY (SEQ ID NO: 21); и

b) домен VL содержит аминокислотную последовательность LCDR1 ENIYSN (SEQ ID NO: 22), аминокислотную последовательность LCDR2 AAT (SEQ ID NO: 23) и аминокислотную последовательность LCDR3 QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 24).

В определенных вариантах осуществления:

a) домен VH содержит аминокислотную последовательность HCDR1 GYTFTSYG (SEQ ID NO: 27), аминокислотную последовательность HCDR2 IYPRSGNT (SEQ ID NO: 28), аминокислотную последовательность HCDR3 AGKDYGSTYADY (SEQ ID NO: 29) ; и

b) домен VL содержит аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSSRY (SEQ ID NO: 30), аминокислотную последовательность LCDR2 GTS (SEQ ID NO: 31), и аминокислотную последовательность LCDR3 QQYHSDPLT (SEQ ID NO: 32).

В определенных вариантах осуществления:

a) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35;

b) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

c) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

d) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

e) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38;

f) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39;

g) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40;

h) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; или

i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

В определенных вариантах осуществления домен VH и домен VL соединены аминокислотным линкером.

В определенных вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит (GGGGS)n (SEQ ID NO: 148), где n представляет собой целое число от 1 до 5.

В определенных вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 149) или GGSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 150).

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит фрагмент Fab, фрагмент F(ab')2, фрагмент Fd, фрагмент Fv, одноцепочечный Fv (scFv),

фрагмент dAb, однодоменное антитело или нанотело.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 56-71.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок дополнительно содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 72-78.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи (HC) антитела SEQ ID NO: 45, 46, 49, 53 или 54 и аминокислотную последовательность легкой цепи (LC) антитела SEQ ID NO: 47, 48, 50, 51, 52 и 55.

В определенных вариантах осуществления:

a) антитело HC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и антитело LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47;

b) антитело HC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и антитело LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48;

c) антитело HC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и антитело LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47;

d) антитело HC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и антитело LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48;

e) антитело HC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и антитело LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50;

f) антитело HC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и антитело LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51;

g) антитело HC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и антитело LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52;

h) антитело HC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и антитело LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; или

i) антитело HC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и антитело LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека с KD меньше чем около 5×10^{-8} M, меньше чем около 1×10^{-8} M, меньше чем около 5×10^{-9} M, меньше чем около 1×10^{-9} M, меньше чем около 5×10^{-10} M или меньше чем около 1×10^{-10} M.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека в присутствии лиганда uPAR.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает uPAR, связанный с лигандом uPAR человека.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека на клетках, экспрессирующих uPAR человека, тем самым создавая флуоресцентный сигнал, детектируемый флуоресцентно меченным антителом, которое

связывается с антигенсвязывающим белком, со значением EC50 от около 0,1 нМ до около 3,0 нМ.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека на клетках, экспрессирующих uPAR человека, в присутствии лиганда uPAR.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывает домен DII-DIII uPAR человека или домен DIII uPAR человека.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антигенсвязывающему белку, который конкурирует за связывание с антигенсвязывающим белком, описанным выше.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антигенсвязывающему белку, который связывает тот же эпитоп, что и антигенсвязывающий белок, описанный выше.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающий белок, описанный выше, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотидную последовательность, которая кодирует антигенсвязывающий белок, описанный выше.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность, описанную выше.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор экспрессии, описанный выше.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу изготовления антигенсвязывающего белка, описанного выше, включаающему следующие этапы:

(i) культивирование указанной выше клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих экспрессию антигенсвязывающего белка;

(ii) выделение антигенсвязывающего белка; и необязательно

(iii) дальнейшая очистка и/или модификация и/или составление антигенсвязывающего белка.

Цитокины и их варианты

В контексте данного документа «цитокин» представляет собой общий термин, который включает «лимфокин» (цитокины, вырабатываемые лимфоцитами), «монокин» (цитокины, вырабатываемые моноцитами), «хемокин» (цитокины с хемотаксической активностью) и «интерлейкин» (цитокины, вырабатываемые одним лейкоцитом и действующие на другие лейкоциты). Цитокины могут действовать на клетки, которые их секретируют (аутокринное действие), на близлежащие клетки (паракринное действие) или, в некоторых случаях, на удаленные клетки (эндокринное действие). Провоспалительные цитокины продуцируются преимущественно активированными макрофагами и дендритными клетками и участвуют в усилении воспалительных реакций

и включают, помимо прочего, IL-1β, IL-6 и TNF-α. Хемокины обычно подразделяют на 4 группы в зависимости от расстояния между первыми двумя цистеиновыми остатками: хемокины C-C (например, RANTES, моноцитарный хемоаттрактантный белок или MCP-1, моноцитарный воспалительный белок или MIP-1α и MIP-1β), хемокины C-X-C (например, IL-8 также называют онкогеном, связанным с ростом или GRO/KC), хемокины C (например, лимфотактин) и хемокины CXXXC (например, фракталкин). Противовоспалительные цитокины представляют собой серию иммунорегуляторных молекул, которые ослабляют или контролируют провоспалительную реакцию. Цитокины действуют совместно со специфическими ингибиторами цитокинов и растворимыми рецепторами цитокинов, регулируя иммунные реакции. Основные противовоспалительные цитокины включают, помимо прочего: антагонист рецептора интерлейкина (IL)-1, IL-4, IL-10, IL-11 и IL-13. Лейкемический ингибирующий фактор, интерферон-альфа, IL-6, IL-10 и трансформирующий фактор роста (TGF)-β при различных обстоятельствах классифицируются как противовоспалительные или провоспалительные цитокины. Специфические цитокиновые рецепторы IL-1, TNF-α и IL-18 также действуют как ингибиторы провоспалительных цитокинов.

Цитокиновый полипептид слитых белков, описанных в данном документе, может представлять собой любой цитокин, включая его варианты, такие как его функциональный фрагмент или его вариант с циркулярной перестановкой. Пригодные цитокины включают, помимо прочего: IL-1α, IL-1β, IL-1Ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-12p35, IL-12p40, IL-13, IL-15, представители семейства IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-23p19, IL-30 (IL-27p28), IL-33, IL-34, IL-35, IL-35p35, IL-36Ra, IL-36a, IL-36b, IL-36g, IL-37, IL-38, LIF, CNTF, онкостатин M, CLCF-1, GM-CSF, оксферритин, аполипопротеин e, фактор некроза опухоли α (TNFα), интерферон-альфа (IFNα), интерферон-бета (IFNβ), или интерферон-гамма (IFNγ). В определенных вариантах осуществления цитокин или его вариант выбран из группы, состоящей из IL-2, IL-2 с циркулярной перестановкой (cpIL-2), IL-15, IL-15 с циркулярной перестановкой (cpIL-15), IL-6, IL-6 с циркулярной перестановкой (cpIL-6), IL-10 или IL-12. В определенных вариантах осуществления цитокин или его вариант содержит по меньшей мере одну субъединицу интерлейкина-12 (IL-12) (например, p35 и p40). В определенных вариантах осуществления субъединица IL-12 содержит одну или обе из p35 и p40. В определенных вариантах осуществления цитокин или его вариант содержит одноцепочечный IL-12 (scIL-12), содержащий полипептид p35 и полипептид p40, присоединенный аминокислотным линкером.

В контексте данного документа термин «вариант» относится к полипептиду, который отличается от эталонного полипептида, но сохраняет существенные его свойства. Типовый вариант полипептида отличается своей первичной аминокислотной последовательностью от другого эталонного полипептида. В общем, различия являются ограниченными, так что последовательности эталонного полипептида и варианта в целом очень схожи и во многих областях идентичны. Вариант и эталонный полипептид могут

отличаться по аминокислотной последовательности одной или большим количеством модификаций (например, заменами, добавлениями и/или делециями). Замещенный или вставленный аминокислотный остаток может кодироваться или не кодироваться генетическим кодом. Вариант полипептида может встречаться в природе, например, это может аллельный вариант, или это может быть вариант, о котором не известно, что он встречается в природе. Кроме того, в контексте этого документа термин «вариант» включает циркулярные перестановки белков и пептидов.

В контексте данного документа термины «циркулярная перестановка» и «вариант с циркулярной перестановкой» «(CP или cp)» относятся к концептуальному процессу взятия линейного белка или родственной ему последовательности нуклеиновой кислоты и слияния нативных N- и C-концов (непосредственно или через линкер, с помощью протеомных методик или методик рекомбинантной ДНК) с образованием циркулярной молекулы, а затем разрезания (разрыва) полученной циркулярной молекулы в другом месте с образованием нового линейного белка или родственной молекулы нуклеиновой кислоты с концами, отличными от концов исходной молекулы. Таким образом, циркулярная перестановка сохраняет последовательность, структуру и функцию белка (кроме необязательного линкера), одновременно создавая новые C- и N-концы в разных местах, что, в соответствии с одним аспектом изобретения, приводит к улучшенной ориентации для слияния желаемого полипептидного партнера по слиянию по сравнению с исходным лигандом. Циркулярная перестановка также включает любой процесс, который приводит к образованию молекулы с прямой цепью, имеющей циркулярную перестановку, как определено в данном документе. В общем, молекула с циркулярной перестановкой de novo экспрессируется как линейная молекула и формально не проходит этапы циркуляризации и разрыва. Конкретная циркулярная перестановка молекулы в данном документе обозначена скобками, содержащими, в случае белка с циркулярной перестановкой, аминокислотные остатки, между которыми удалена пептидная связь. Например, обозначение IL6(Q182/Q180) обозначает фактор роста IL6 с циркулярной перестановкой, в котором сайт разрыва (положение, в котором удаляется пептидная связь) находится между остатками Q182 и Q180 немодифицированного нативного IL6 или IL6 без перестановок, и, таким образом, вновь созданный N-конец представляет собой глютамин, который ранее представлял собой остаток 182, а вновь созданный C-конец представляет собой глутамин, который ранее представлял собой остаток 180. Белки с циркулярной перестановкой и способы их получения более подробно описаны в патенте США 9,359,415, включенном в данный документ посредством ссылки.

Термины «не имеющий перестановок», «нативный», «дикого типа» или «немодифицированный» лиганд, полипептид, белок, цитокин, например, применяются в данном документе для для обозначения цитокина до его перегруппировки в молекулу с циркулярной перестановкой, как описано выше. Обычно немодифицированный цитокин имеет амино- и карбокси- концы и аминокислотную последовательность, которые по существу соответствуют амино- и карбокси- концам и аминокислотной

последовательности цитокина или независимому домену белка, как это обычно происходит in vivo. Немодифицированный цитокин может быть полностью зрелой формой или предшественником зрелой формы (например, пробелком).

В контексте данного документа «фрагмент» относится к сегменту полипептида, который короче эталонного белка. Фрагменты белка могут иметь концевые (карбокси- или амино-концевые) и/или внутренние делеции. Обычно фрагменты белка будут иметь по меньшей мере четыре (например, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять, по меньшей мере 10, по меньшей мере 12, по меньшей мере 15, по меньшей мере 18, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 или более) аминокислоты в длину. Биологически активные фрагменты или биологически активные варианты любого из белков, слитых белков или фрагментов, описанных в данном документе, обладают по меньшей мере 25% (например, по меньшей мере: 30%; 40%; 50%; 60%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 97%; 98%; 99%; 99,5% или 100% или более) активности полноразмерного эталонного белка дикого типа. В случае полипептида, связывающего uPAR, релевантной активностью является способность полипептида, связывающего uPAR, связываться с целевым рецептором uPAR. В случае цитокинового полипептида релевантной активностью является способность связывать его рецептор и соответствующим образом агонизировать или антагонизировать. В зависимости от предполагаемого применения полипептиды, биологически активные фрагменты или их биологически активные варианты могут принадлежать любому виду, но предпочтительно млекопитающему (например, мышь, крыса, кролик, хомяк, песчанка, собака, кошка, коза, свинья, корова, лошадь, кит, обезьяна или человек) и наиболее предпочтительно - человеку.

Таким образом, понятно, что настоящее изобретение относится к (i) биологически активным вариантам и (ii) биологически активным фрагментам или их биологически активным вариантам полноразмерных полипептидов (например, различных полипептидов слитых белков по настоящему изобретению, включая полипептид, связывающий uPAR, цитокин и соответствующий рецептор или фрагмент рецептора, как описано в данном документе. Биологически активные варианты полноразмерных, предпочтительно зрелых белков дикого типа или фрагментов белков могут содержать добавления, делеции или замены, такие как одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 50 консервативных аминокислотных замен. Консервативная замена - это замена одной аминокислоты на другую с аналогичными характеристиками. Консервативные замены включают замены внутри следующих групп: валин, аланин и глицин; лейцин, валин и изолейцин; аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; аспарагин и глутамин; серин, цистеин и треонин; лизин и аргинин; и фенилаланин и тирозин. Неполярные гидрофобные аминокислоты включают аланин, лейцин, изолейцин,

валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин. Полярные нейтральные аминокислоты включают глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин. Положительно заряженные (основные) аминокислоты включают аргинин, лизин и гистидин. Отрицательно заряженные (кислые) аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту. Любая замена одного представителя вышеупомянутой полярной, основной или кислотной группы другим представителем той же группы может считаться консервативной заменой. Напротив, неконсервативная замена представляет собой замену одной аминокислоты на другую с несходными характеристиками. В вариантах с делецией может отсутствовать один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных сегментов (из двух или больше аминокислот) или несмежных отдельных аминокислот. Добавления (варианты с добавлением) включают слитые белки, содержащие: (a) полноразмерные полипептиды дикого типа или их фрагменты, содержащие по меньшей мере пять аминокислот; и (b) внутренние или концевые (C или N) нерелевантные или гетерологичные аминокислотные последовательности. В контексте таких слитых белков термин «гетерологичные аминокислотные последовательности» относится к аминокислотной последовательности, отличной от (a). Таким образом, слитый белок, содержащий описанный в данном документе пептид и гетерологичную аминокислотную последовательность, не соответствует по последовательности всему или части встречающегося в природе белка. Гетерологичная последовательность может представлять собой, например, последовательность, применяемую для очистки рекомбинантного белка (например, FLAG или полигистидин (гексагистидин или 6xHis)).

Сконструированные субъединицы интерлейкина 12

IL-12 представляет собой гетеродимер, состоящий из субъединицы p35 (т.е. p35 IL-12) и субъединицы p40 (т.е. p40 IL-12). Оптимальная активность IL-12 достигается, когда гетеродимер образуется и связывается с рецептором IL-12 (например, гетеродимер IL-12Rβ1/IL-12Rβ2). Эти две субъединицы (p35 и p40) могут быть связаны вместе с образованием одноцепочечного IL-12 (scIL-12), тем самым устраняя необходимость сборки гетеродимера и повышая активность IL-12. Однако scIL-12 очень токсичен при системном введении. Поэтому целесообразно поставлять каждую субъединицу IL-12 отдельно.

К сожалению, субъединицы IL-12 трудно экспрессировать и очищать для терапевтических целей. p35 практически не экспрессируется. Экспрессия может быть улучшена путем связывания p35 с партнером по слиянию, таким как антитело или его фрагмент, или человеческий сывороточный альбумин (HSA). P35 также подвержена агрегации. p40 демонстрирует схожие проблемы. p40 может экспрессироваться без партнера по слиянию, однако в очищенной композиции часто присутствует гомодимер p40 (около 15-20%). p40 также подвержена димеризации и агрегации с течением времени при 37 °C. Настоящее изобретение относится к сконструированным субъединицам IL-12 (т.е. варианты p35 и p40), которые могут преодолеть эти проблемы, сохраняя при этом

аффинность связывания друг с другом.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к сконструированному полипептиду p35 IL-12, содержащему одну или большее количество аминокислотных замен в положениях S27, N28, Q35, F39, S44, C74, M111, V114, M119, M145, F150, и L161 последовательности SEQ ID NO: 81.

В определенных вариантах осуществления сконструированный полипептид p35 IL-12 дополнительно содержит одну или обе аминокислотные замены S27 и D188.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит M12S; S27D; N28R; Q35E; F39D или F39H; S44K; C74K, C74D, C74W, C74Y, или C74Q; M111F или M111W; V114I; M119L; M145L; F150Y; L161D или L161Q; D188N; или их комбинацию.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит N28R и Q35E.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит C74K.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит S27D, C74K, и D188N.

В определенных вариантах осуществления сконструированный полипептид p35 IL-12 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 или SEQ ID NO: 83, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80% (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) сходства или идентичности последовательности с аминокислотными последовательностями, как указано в SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 или SEQ ID NO: 83.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему: (i) сконструированный полипептид p35 IL-12, описанный выше; и (ii) один или большее количество партнеров по слиянию (например, функциональный фрагмент или антигенсвязывающий белок анти-uPAR).

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который снижает агрегацию сконструированного полипептида p35 IL-12.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который увеличивает экспрессию сконструированного полипептида p35 IL-12.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который увеличивает период полужизни в сыворотке сконструированного полипептида p35 IL-12.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат нацеливающийся фрагмент.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат сывороточный альбумин, полиэтиленгликоль (PEG) или антигенсвязывающий белок.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с рецептором урокиназного активатора плазминогена (uPAR).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к сконструированному полипептиду p40 IL-12, содержащему одну или большее количество аминокислотных замен в положениях C177 и C252 последовательности SEQ ID NO: 84.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена C177 выбрана из группы, состоящей из C177S, C177F, C177M, C177H, C177I или C177Q.

В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена C252 представляет собой C252S.

В определенных вариантах осуществления p40 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80% (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) сходства или идентичности последовательности с аминокислотными последовательностями, как указано в SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему: (i) сконструированный полипептид p40 IL-12, описанный выше; и (ii) один или большее количество партнеров по слиянию (например, функциональный фрагмент или антигенсвязывающий белок анти-uPAR).

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который снижает агрегацию сконструированного полипептида p40 IL-12.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который увеличивает экспрессию сконструированного полипептида p40 IL-12.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который увеличивает период полужизни в сыворотке сконструированного полипептида p40 IL-12.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат нацеливающийся фрагмент.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество партнеров по слиянию содержат сывороточный альбумин, полиэтиленгликоль (PEG) или антигенсвязывающий белок.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с рецептором урокиназного активатора плазминогена (uPAR).

Типовые аминокислотные последовательности IL-12 приведены ниже в **Таблице 2**.

Таблица 2 - Аминокислотные последовательности IL-12

ID последовательности	Последовательность

p35 (WT)	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPC TSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGS CLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO: 81)
p35 (мутация C74K)	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPC TSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNES**K**LNSRETSFITNGS CLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO: 82)
p35 (мутации S27D, C74K и D188N)	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAV**D**NMLQKARQTLEFYP CTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNES**K**LNSRETSFITN GSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMD PKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKT KIKLCILLHAFRIRAVTI**N**RVMSYLNAS (SEQ ID NO: 83)
p40 (WT)	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTT ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYS VECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIK PDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQ VQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCS (SEQ ID NO: 84)
p40 (мутация C177S)	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTT ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYS VECQEDSA**S**PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIK PDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQ VQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCS (SEQ ID NO: 85)
p40 (мутация C252S)	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTT ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYS

	VECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIK PDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQ VQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCS (SEQ ID NO: 86)
p40 (мутация C177S/C252S)	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTT ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYS VECQEDSASPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIK PDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQ VQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCS (SEQ ID NO: 87)
scIL-12 (WT p40 - WT p35)	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTT ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYS VECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIK PDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQ VQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCSGGSGGGGSGGRNLPVATPDPGMFPCLHHSQN LLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACL PLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQAL NFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMS YLNAS (SEQ ID NO: 88)
scIL-12 (WT p35 - WT p40)	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPC TSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGS CLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGSGGGGSGGIWELKK DVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVL GSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLT FSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQE DSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPK

	NLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKS KREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWA SVPCS (SEQ ID NO: 89)

Слитые белки

Описанные в данном изобретении полипептиды, связывающие рецептор урокиназного активатора плазминогена (uPAR), включая описанные выше антигенсвязывающие белки uPAR, могут быть связаны (т.е. присоединены или слиты) с одним или обоими из следующих элементов: 1) цитокин или его вариант и 2) модулятор молекулы контрольной точки. Антигенсвязывающие белки uPAR пригодны для нацеливания связанного белка (т.е. цитокина или модулятора молекулы контрольной точки) на опухоль, экспрессирующую uPAR.

Фраза «модулятор молекулы контрольной точки» относится к белкам или пептидам, которые способны агонизировать или антагонизировать молекулы контрольной точки, в зависимости от ситуации, для усиления желательного иммунного ответа (например, агонизирующие молекулы иммуностимулирующих контрольных точек или антагонизирующие молекулы иммуноингибирующих контрольных точек) или способны ингибировать нежелательный иммунный ответ (например, антагонизирующие молекулы иммуностимулирующих контрольных точек в случае неадекватного ответа). Стимулирующие или костимулирующие молекулы контрольных точек включают, помимо прочего: CD27, CD70, CD28, CD40, лиганд CD40, CD122, CD137, OX40, GITR и его лиганды, ICOS, CD131 (4-1BBB и его лиганды). Ингибирующие молекулы контрольной точки включают, помимо прочего: аденозиновый рецептор A2A (A2AR), B7-H3, B7-H4, BTLA (аттенюатор B- и T-лимфоцитов), CTLA-4 (цитотоксический белок 4, ассоциированный с T-лимфоцитами), IDO (индоламин 2,3, диоксигеназа), KIR (иммуноглобулиноподобный рецептор клеток-киллеров), LAG3 (ген активации лимфоцитов-3), PD-1 (рецептор запрограммированной гибели клеток 1) и его лиганды PD-L1 (лиганд запрограммированной гибели 1) и PD-L2 (лиганд запрограммированной смерти 2), TIM-3 (белок 3, содержащий T-клеточный иммуноглобулин и муциновый домен), VISTA (супрессор v-домена Ig активации T-клеток). Модуляторы молекул контрольной точки, используемые в слитых белках по настоящему изобретению, могут включать ингибирующую или стимулирующую молекулу контрольной точки, ее функциональный фрагмент, ее функциональное производное или ее вариант с циркулярной перестановкой.

В дополнение к антигенсвязывающим белкам uPAR-связывающий полипептид может содержать пептид, полученный из интегринов, которые блокируют интеграционные взаимодействия uPAR. Одним из таких пептидов является M25, имеющий аминокислотную последовательность PRYQHIGLVAMFRQNTG (SEQ ID NO: 157), пептид, полученный из субъединицы β_2 Mac-1, ингибирующей адгезию лейкоцитов к фибриногену, витронектину и цитокин-стимулированным эндотелиальным клеткам. M25

также блокировал связь uPAR с β1 и нарушал β1-интегрин-зависимое распространение и миграцию гладкомышечных клеток сосудов человека на фибронектин и коллаген (Simon DI, et al. (2000) J Biol Chem. **275**:10228-34). Второй пептид, ингибирующий образование комплекса uPAR-интегрин, P25, имеющий аминокислотную последовательностьAESTYHHLSLGYMYTLN (SEQ ID NO: 158), был способен уменьшать прикрепление опухолевых клеток к витронектину и увеличивать прикрепление опухолевых клеток к фибронектину (van der Pluijm G, et al. (2001) Am J Pathol. **159**:971-82).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему: (i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с рецептором урокиназного активатора плазминогена (uPAR); и (ii) цитокин или его вариант.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок и цитокин или его вариант связаны аминокислотным линкером.

В определенных вариантах осуществления цитокин или его вариант выбран из группы, состоящей из IL-2, IL-2 с циркулярной перестановкой (cpIL-2), IL-15, IL15 с циркулярной перестановкой (cpIL-15), IL-6, IL-6 с циркулярной перестановкой (cpIL-6), IL-10 или IL-12.

В определенных вариантах осуществления цитокин или его вариант содержит по меньшей мере одну субъединицу интерлейкина-12 (IL-12) (например, p35 и p40). В определенных вариантах осуществления субъединица IL-12 содержит одну или обе из p35 и p40. Например, но не ограничиваясь этим, слитый белок содержит: (i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с uPAR; и (ii) полипептид p35. В альтернативном варианте слитый белок содержит: (i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с uPAR; и (ii) полипептид p40.

В определенных вариантах осуществления полипептид p35 содержит одну или большее количество аминокислотных замен в положениях M12, S27, N28, Q35, F39, S44, C74, M111, V114, M119, M145, F150, L161 и D188 последовательности SEQ ID NO: 81. В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит M12S; S27D; N28R; Q35E; F39D или F39H; S44K; C74K, C74D, C74W, C74Y, или C74Q; M111F или M111W; V114I; M119L; M145L; F150Y; L161D или L161Q; D188N; или их комбинацию. В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит N28R и Q35E. В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит S27D и D188N. В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит C74K. В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена содержит S27D, C74K, и D188N. В определенных вариантах осуществления p35 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 или SEQ ID NO: 83, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80% (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) сходство или идентичность последовательности с аминокислотными последовательностями,

указанными в SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 или SEQ ID NO: 83.

В определенных вариантах осуществления полипептид p40 содержит одну или большее количество аминокислотных замен в положениях C177 и C252 последовательности SEQ ID NO: 84. В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена C177 выбрана из группы, состоящей из C177S, C177F, C177M, C177H, C177I или C177Q. В определенных вариантах осуществления аминокислотная замена C252 представляет собой C252S. В определенных вариантах осуществления полипептид p40 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80% (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) сходство или идентичность последовательности с аминокислотными последовательностями, указанными в SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87.

В определенных вариантах осуществления цитокин или его вариант содержит одноцепочечный IL-12 (scIL-12), содержащий полипептид p35 и полипептид p40, присоединенный аминокислотным линкером. В определенных вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит последовательность GGSGGGGSGG (SEQ ID NO: 156). В определенных вариантах осуществления scIL-12 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80% (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) сходство или идентичность последовательности с аминокислотными последовательностями, указанными в SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок слитого белка содержит:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GFNIKDEY (SEQ ID NO: 3), аминокислотную последовательность HCDR2 IDPENGDT (SEQ ID NO: 4), аминокислотную последовательность HCDR3 TGGNYVGWFPY (SEQ ID NO: 5); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSY (SEQ ID NO: 6), аминокислотную последовательность LCDR2 DTS (SEQ ID NO: 7), и аминокислотную последовательность LCDR3 QQWSSNPPY (SEQ ID NO: 8).

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок слитого белка содержит:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GFSLTNYG (SEQ ID NO: 11), аминокислотную последовательность HCDR2 IWSDGGT (SEQ ID NO: 12), аминокислотную последовательность HCDR3 ARGGRSDLFAY (SEQ ID NO: 13); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 14), аминокислотную последовательность LCDR2 KVS

(SEQ ID NO: 15), и аминокислотную последовательность LCDR3 FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 16).

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок слитого белка содержит:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GNTFTDYG (SEQ ID NO: 19), или GTTFTDYG (SEQ ID NO: 41), аминокислотную последовательность HCDR2 INTNTGEP (SEQ ID NO: 20), аминокислотную последовательность HCDR3 AHYSFDY (SEQ ID NO: 21); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 ENIYSN (SEQ ID NO: 22), аминокислотную последовательность LCDR2 AAT (SEQ ID NO: 23), и аминокислотную последовательность LCDR3 QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 24).

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок слитого белка содержит:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GYTFTSYG (SEQ ID NO: 27), аминокислотную последовательность HCDR2 IYPRSGNT (SEQ ID NO: 28), аминокислотную последовательность HCDR3 AGKDYGSTYADY (SEQ ID NO: 29); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSSRY (SEQ ID NO: 30), аминокислотную последовательность LCDR2 GTS (SEQ ID NO: 31), и аминокислотную последовательность LCDR3 QQYHSDPLT (SEQ ID NO: 32).

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок слитого белка содержит:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

b) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

c) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

d) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

e) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38;

f) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39;

g) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40;

h) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; или

i) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

В определенных вариантах осуществления домен VH и домен VL соединены аминокислотным линкером. В определенных вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит (GGGGS)n (SEQ ID NO: 148), где n представляет собой целое число от 1 до 5. В определенных вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 149) или GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 150).

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит фрагмент Fab, фрагмент F(ab')2, фрагмент Fd, фрагмент Fv, одноцепочечный Fv (scFv), фрагмент dAb, однодоменное антитело или нанотело.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 56-71.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок дополнительно содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 72-78.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи (HC) антитела SEQ ID NO: 45, 46, 49, 53 или 54, и аминокислотную последовательность легкой цепи антитела (LC) SEQ ID NO: 47, 48, 50, 51, 52 и 55.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит:

a) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47;

b) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48;

c) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47;

d) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48;

e) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50;

f) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51;

g) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52;

h) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; или

i) антитело HC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и антитело LC, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к комбинации, содержащей первый слитый белок и второй слитый белок, при этом:

(a) первый слитый белок содержит:

(i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с первым эпитопом рецептора урокиназного активатора плазминогена (uPAR); и

(ii) субъединицу p35 IL-12 или ее вариант; и

(b) второй слитый белок содержит:

(i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается со вторым эпитопом uPAR; и

(ii) субъединицу p40 IL-12 или ее вариант.

В определенных вариантах осуществления первый эпитоп и второй эпитоп являются одинаковыми.

В определенных вариантах осуществления первый эпитоп и второй эпитоп отличаются.

Функциональные фрагменты

Белки по настоящему изобретению (например, белки, связывающие uPAR, цитокины и слитые белки) могут быть дополнительно конъюгированы (т.е. связаны, прикреплены или слиты) с функциональными фрагментами, которые придают желаемую биологическую активность белкам по настоящему изобретению. Функциональные фрагменты включают как белковые функциональные фрагменты, так и небелковые функциональные фрагменты (например, PEG или полисахариды). Например, но не ограничиваясь этим, цитокин или его вариант можно конъюгировать через необязательный линкер с областью Fc иммуноглобулина или с сывороточным альбумином человека (HSA) с целью продления периода полужизни цитокина или его варианта (например, конъюгата IL-12 p35-HSA или конъюгата IL-12 p40-HSA).

В определенных вариантах осуществления функциональный фрагмент представляет собой область Fc (т.е. домен Fc) иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления область Fc может быть связана с белками по настоящему изобретению (например, белками, связывающими uPAR, цитокинами и слитыми белками) через одноцепочечный линкер, как описано в публикации WO 2016/100788, включенной в данный документ посредством ссылки. Эти линкеры содержат константную область легкой цепи иммуноглобулина (CL), связанную с константной областью CH1 тяжелой цепи иммуноглобулина (линкеры scCLCH1 или scCH1CL), слитую с областью Fc иммуноглобулина. Например, слитый белок по настоящему изобретению (например, цитокин, связанный с антигенсвязывающим белком анти-uPAR) может быть дополнительно связан с областью Fc иммуноглобулина через линкеры scCLCH1 или scCH1CL. Этот тип линкера придает благоприятные свойства слитому белку по настоящему изобретению, такие как улучшенная биологическая активность и увеличенный период полужизни слитых белков по настоящему изобретению.

Слитые белки по настоящему изобретению могут быть дополнительно стабилизированы in vivo, а период их полужизни увеличен за счет связывания с молекулами сывороточного альбумина, например, сывороточного альбумина человека (HSA), который устойчив к деградации и/или клиренсу или секвестрации. Эти молекулы

сывороточного альбумина представляют собой природные белки, которые сами по себе имеют длительный период полужизни in vivo.

Линкеры

Любой из белков, описанных в данном документе (например, белки, связывающие uPAR, цитокиновые белки и слитые белки) может включать один или большее количество (например, два или большее количество, три или большее количество, четыре или большее количество, пять или большее количество, шесть или большее количество или семь или большее количество) линкерных фрагментов, которые связывают один или большее количество (или все) полипептидов слитого белка, связывают один или большее количество цитокиновых белков или связывают один или большее количество белков, связывающих uPAR (например, связывают домены VH и VL антигенсвязывающего белка uPAR). В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой аминокислотный линкер, длина которого может составлять одну аминокислоту, но может быть и больше. Например, линкерный пептид может иметь по меньшей мере две (например, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50 или по меньшей мере 55 или более) аминокислоты в длину. Линкерные пептиды могут содержать любые аминокислоты.

В определенных вариантах осуществления один или большее количество любых линкеров, представленных в белках по настоящему изобретению, выбраны из искусственных гибких полипептидов, содержащих аминокислоты, выбранные из Gly (G) и/или Ser (S). В определенных вариантах осуществления линкер состоит из полипептида общей формулы (GGGS (SEQ ID NO: 151))n или (GGGGS (SEQ ID NO: 152))n или $(SGGSGGG (SEQ ID NO: 153))_n$ или $(GGSGGSG (SEQ ID NO: 154))_n$, где n представляет собой целое число от 1 до 10. В определенных вариантах осуществления каждый линкер представляет собой полипептид, содержащий от около 1 до около 100 аминокислот, например, около 1-50 аминокислот, около 1-25 аминокислот, около 1-15 аминокислот, около 1-10 аминокислот, около 4-24 аминокислоты, около 5-20 аминокислот, около 5-15 аминокислот и около 5-10 аминокислот. В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой (GGGGS (SEQ ID NO: 155)) n, где n представляет собой 2 или 4. Любой линкер может дополнительно содержать аминокислоты, такие как, например, Lys (K), Thr (T), Glu (E), или Asp (D).

В определенных вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит (GGGGS)n (SEQ ID NO: 148), где n представляет собой целое число от 1 до 5. В определенных вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 149) или

GGSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 150). В определенных вариантах осуществления аминокислотный линкер содержит аминокислотную последовательность GGS.

В определенных вариантах осуществления линкер может содержать один или большее количество муциновых белков или муциновых доменов белков (например, любой белок, кодируемый геном MUC (например, MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC9, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC19, MUC20, MUC21). Белки и полипептиды муцинового домена обладают высокой степенью гликозилирования, что структурно позволяет муциновым белкам и другим полипептидам, содержащим муциновые домены, вести себя как жесткие статистические спирали. Палочкообразная природа муциновых доменов может жестко отделять биоактивный белок (например, цитокин) от партнера по слиянию (например, белка, связывающего uPAR) и, таким образом, быть менее восприимчивым к потере активности любого партнера по слиянию.

Такие полипептиды с муциновым доменом, являющиеся пригодными для применения в соответствии с настоящим изобретением, описаны в публикациях WO 2013/184939 и WO 2013/184938, включенных в данный документ посредством ссылки. Эти линкеры пригодны для обеспечения оптимального расстояния между полипептидами слитых белков по настоящему изобретению (например, между полипептидом ATF и полипептидом цитокина) или, например, для обеспечения увеличения периода полужизни слитого белка в целом, независимо от расположения муцинового домена в слитом белке. Например, муциновый домен может быть представлен на N-конце или C-конце слитого белка. Полипептидные линкеры муцинового домена могут дополнительно быть связаны с областью Fc полипептида иммуноглобулина, который также может действовать для увеличения периода полужизни слитого белка по настоящему изобретению, как описано в публикации WO 2013/184938.

Метки очистки

Любой из белков, описанных в настоящем документе (например, белки, связывающие uPAR, цитокиновые белки и слитые белки) может включать одну или большее количество (например, две или большее количество, три или большее количество, четыре или большее количество, пять или большее количество, шесть или большее количество или семь или большее количество) меток очистки, которые облегчают очистку белков, описанных в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления метка очистки представляет собой метку avi (GLNDIFEAQKIEWHE; SEQ ID NO: 240). В определенных вариантах осуществления метка очистки представляет собой метку 6xHis (HHHHHH; SEQ ID NO: 241). Одна или обе метки: avi и 6xHis могут быть представлены на одном белке и в любом порядке. В определенных вариантах осуществления метка очистки связана с белком, описанным в данном документе, с помощью линкера gly-ser. В определенных вариантах осуществления линкер gly-ser содержит GGS и/или GGSGGG (SEQ ID NO: 242). В определенных вариантах

осуществления очистка представляет собой любой из GGSHHHHHHGGSGLNDIFEAQKIEWHE (SEQ ID NO: 243), GGSGGHHHHHHGGSGLNDIFEAQKIEWHE (SEQ ID NO: 244) и GGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 245).

Экспрессия антигенсвязывающих белков, цитокинов и слитых белков

В одном аспекте полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенсвязывающие белки (например, антигенсвязывающие белки анти-uPAR), цитокины или их варианты (например, сконструированный p35 IL-12 или сконструированный p40 IL-12) или слитые белки (например, слитые белки «антигенсвязывающий белок анти-uPAR - цитокин»), описанные в данном документе. Также предложены способы получения антигенсвязывающего белка, цитокина или слитого белка, содержащие экспрессию этих полинуклеотидов.

Полинуклеотиды, кодирующие антигенсвязывающие белки, цитокины или слитые белки, описанные в данном документе, обычно вставляют в вектор экспрессии для введения в клетки-хозяева, которые можно применять для продуцирования желаемого количества антигенсвязывающих белков или слитых белков. Соответственно, в определенных аспектах настоящее изобретение относится к векторам экспрессии, содержащим полинуклеотиды, описанные в данном документе, и клетки-хозяева, содержащие эти векторы и полинуклеотиды.

В контексте данного документа термин «вектор» или «вектор экспрессии» применяется для обозначения векторов, используемых в соответствии с настоящим изобретением в качестве носителя для введения и экспрессии желаемого гена в клетке. Как известно специалистам в данной области техники, такие векторы можно нетрудно выбрать из группы, состоящей из плазмид, фагов, вирусов и ретровирусов. В основном, векторы, совместимые с настоящим изобретением, будут содержать селективный маркер, соответствующие сайты рестрикции для облегчения клонирования желаемого гена и способности проникать и/или реплицироваться в эукариотических или прокариотических клетках.

Для целей настоящего изобретения можно применять многочисленные системы векторов экспрессии. Например, в одном классе векторов используются элементы ДНК, полученные из вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус коровьей оспы, бакуловирус, ретровирусы (например, RSV, MMTV, MOMLV или подобные) или вирус SV40. Другие классы включают участие полицистронных систем с внутренними сайтами связывания рибосом. Кроме того, клетки, которые интегрировали ДНК в свои хромосомы, можно выбирать путем введения одного или большего количества маркеров, которые позволяют выбирать трансфицированные клетки-хозяева. Маркер может обеспечивать прототрофию по отношению к ауксотрофному хозяину, устойчивость к биоцидам (например, антибиотикам) или устойчивость к тяжелым металлам, таким как медь. Ген селектируемого маркера может быть либо непосредственно связан с последовательностями ДНК, которые подлежат

экспрессии, либо введен в ту же клетку путем совместной трансформации. Дополнительные элементы также могут быть необходимы для оптимального синтеза мРНК. Эти элементы могут включать сигнальные последовательности, сигналы сплайсинга, а также промоторы транскрипции, энхансеры и сигналы терминации. В определенных вариантах осуществления клонированные гены вариабельной области вставляют в вектор экспрессии вместе с генами константной области тяжелой и легкой цепи (например, генами константной области человека), синтезированными, как обсуждалось выше.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающие белки можно экспрессировать с применением полицистронных конструкций. В таких экспрессионных системах представляющие интерес множественные генные продукты, такие как тяжелые и легкие цепи антител, могут быть продуцированы из одной полицистронной конструкции. Эти системы преимущественно используют сайт внутренней посадки рибосомы (IRES) для обеспечения относительно высоких уровней полипептидов в эукариотических клетках-хозяевах. Совместимые последовательности IRES описаны в патенте США № 6,193,980, который полностью включен в данный документ посредством ссылки для всех целей. Специалистам в данной области техники будет понятно, что такие экспрессионные системы можно применять для эффективного продуцирования всего спектра полипептидов, описанных в настоящей заявке.

В более общем смысле, после получения вектора или последовательности ДНК, кодирующей антитело или его фрагмент, вектор экспрессии можно ввести в соответствующую клетку-хозяина. То есть клетки-хозяева могут быть трансформированы. Введение плазмиды в клетку-хозяина можно осуществить различными методами, хорошо известными специалистам в данной области техники. К ним относятся, помимо прочего, трансфекция (включая электрофорез и электропорацию), слияние протопластов, осаждение фосфатом кальция, слияние клеток с оболочкой ДНК, микроинъекция и инфицирование интактным вирусом. См. публикацию Ridgway, A. A. G. “Mammalian Expression Vectors” Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Введение плазмиды в хозяина может осуществляться путем электропорации. Трансформированные клетки выращивают в условиях, соответствующих продукции легких и тяжелых цепей, и анализируют синтез белков тяжелых и/или легких цепей. Типовые методики анализа включают иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA), анализ клеточного сортирования с активацией флуоресценции (FACS), иммуногистохимию и т.п.

В данном документе термин «трансформация» следует применять в широком смысле для обозначения введения ДНК в клетку-хозяина реципиента, которое изменяет генотип и, следовательно, приводит к изменению клетки-реципиента.

В том же смысле «клетки-хозяева» относятся к клеткам, которые были трансформированы векторами, сконструированными с применением методов рекомбинантной ДНК и кодирующими по меньшей мере один гетерологичный ген. В

описаниях способов выделения полипептидов из рекомбинантных хозяев термины «клетка» и «клеточная культура» применяются взаимозаменяемо для обозначения источника антитела, если не указано иное. Другими словами, извлечение полипептида из «клеток» может означать либо из центрифугированных целых клеток, либо из клеточной культуры, содержащей как среду, так и суспендированные клетки.

В одном варианте осуществления линия клеток-хозяев, применяемая для экспрессии антител или экспрессии слитого белка, имеет происхождение от млекопитающих. Специалисты в данной области техники могут определить конкретные линии клеток-хозяев, которые лучше всего подходят для экспрессии в них желаемого генного продукта. Типовые линии клеток-хозяев включают, помимо прочего, DG44 и DUXB11 (линии яичников китайского хомяка, DHFR minus), HELA (карцинома шейки матки человека), CV-1 (линия почек обезьяны), COS (производное CV-1 с Т-антигеном SV40), R1610 (фибробласт китайского хомяка), BALBC/3T3 (фибробласт мыши), HAK (линия почек хомяка), SP2/O (миелома мыши), BFA-1c1BPT (бычьи эндотелиальные клетки), RAJI (лимфоциты человека), 293 (почка человека) и тому подобное. В одном варианте осуществления клеточная линия обеспечивает измененное гликозилирование, например, афукозилирование антитела, экспрессируемого из нее (например, PER.C6® (Crucell) или клеточные линии CHO с нокаутом FUT8 (клетки Potelligent®) (Biowa, Принстон, штат Нью-Джерси)). Линии клеток-хозяев обычно доступны в коммерческих структурах, например, в Американской коллекции тканевых культур, или известны из опубликованной литературы.

Продуцирование in vitro позволяет масштабировать изготовление для получения больших количеств желаемых полипептидов. Методы культивирования клеток млекопитающих в условиях культуры тканей известны в данной области техники и включают гомогенную суспензионную культуру, например, в реакторе с воздушным потоком или в реакторе с непрерывной мешалкой, или иммобилизованную или захваченную культуру клеток, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на агарозных микрогранулах или керамических картриджах. При необходимости и/или желании растворы полипептидов можно очистить обычными методами хроматографии, например, гель-фильтрацией, ионообменной хроматографией, хроматографией на DEAE-целлюлозе и/или (иммуно-)аффинной хроматографией.

Гены, кодирующие антигенсвязывающие белки, представленные в настоящем изобретении, также могут экспрессироваться в клетках немлекопитающих, таких как бактерии, дрожжи или клетки растений. В этом отношении следует понимать, что различные одноклеточные микроорганизмы, не относящиеся к млекопитающим, такие как бактерии, также могут быть трансформированы, т.е. микроорганизмы, способные выращиваться в культурах или ферментироваться. Бактерии, которые способны к трансформации, включают представителей рода энтеробактерий, таких как штаммы Escherichia coli или Salmonella; Bacillaceae, такие как Bacillus subtilis; Pneumococcus; Streptococcus и Haemophilus influenzae. Кроме того, следует понимать, что при экспрессии

в бактериях белки могут стать частью телец включения. Белки необходимо выделить, очистить, а затем собрать в функциональные молекулы.

Помимо прокариотов, также можно применять эукариотические микробы. Saccharomyces cerevisiae, или обычные пекарские дрожжи, наиболее часто применяются среди эукариотических микроорганизмов, хотя широко доступен ряд других штаммов. Для экспрессии в Saccharomyces обычно применяют, например, плазмиду YRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)). Эта плазмида уже содержит ген TRP1, который обеспечивает селективный маркер для мутантного штамма дрожжей, лишенного способности расти в триптофане, например ATCC № 44076 или PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)). Наличие поражения trp1 как характеристики генома дрожжевой клетки-хозяина обеспечивает эффективную среду для обнаружения трансформации путем роста в отсутствие триптофана.

Способы введения антигенсвязывающих белков, цитокинов и слитых белков

Способы получения и введения антигенсвязывающих белков, цитокинов или слитых белков по настоящему изобретению, а также описанных в данном документе нуклеиновых кислот, описанных в данном документе векторов, описанных в данном документе клеток-хозяев или описанных в данном документе композиций субъекту хорошо известны или легко определяются специалистами в данной области техники. Путь введения антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению может быть, например, пероральным, парентеральным, ингаляционным или местным. В контексте данного документа термин «парентеральный», включает внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки или слитые белки вводят внутривенно. В контексте данного документа термин «интраокулярный», включает, помимо прочего, субконъюнктивальный, интравитреальный, ретробульбарный или внутрикамерный путь. В контексте данного документа термин «местное введение», включает, помимо прочего, введение глазных капель в виде жидкости или раствора, эмульсий (например, эмульсий масло в воде), суспензий и мазей.

Хотя все эти формы введения явно рассматриваются как входящие в объем настоящего изобретения, форма введения будет представлять собой раствор для инъекции. Обычно подходящая фармацевтическая композиция для инъекции может содержать буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное вещество (например, полисорбат), необязательно стабилизирующий агент (например, человеческий альбумин) и т.д. Однако в других совместимых способах согласно идеям настоящего изобретения, модифицированные антитела могут быть доставлены непосредственно к сайту расположения нежелательной клеточной популяции, тем самым увеличивая воздействие терапевтического агента на пораженную ткань.

Эффективные дозы композиций по настоящему изобретению для лечения

связанных состояний варьируются в зависимости от многих различных факторов, включая способы введения, целевое место , физиологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, вводятся ли другие лекарственные препараты, и является ли воздействие профилактическим или терапевтическим. Обычно пациентом является человек, но можно лечить и млекопитающих, не относящихся к человеку, включая трансгенных млекопитающих. Лечебные дозы можно титровать с применением обычных способов, известных специалистам в данной области техники, для оптимизации безопасности и эффективности.

Как обсуждалось ранее, антигенсвязывающие белки или слитые белки по настоящему изобретению, их конъюгаты или рекомбинанты можно вводить в фармацевтически эффективном количестве для лечения нарушений млекопитающих in vivo. В этом отношении следует понимать, что описанные антигенсвязывающие белки будут составлены таким образом, чтобы облегчить введение и повысить стабильность активного агента.

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением обычно включают фармацевтически приемлемый, нетоксичный, стерильный носитель, такой как физиологический солевой раствор, нетоксичные буферы, консерванты и тому подобное. Для целей настоящей заявки под фармацевтически эффективным количеством антигенсвязывающих белков следует понимать количество, достаточное для достижения эффективного связывания с антигеном и достижения пользы, например, для облегчения симптомов заболевания или нарушения или для обнаружения вещества или клетки. В случае опухолевых клеток антигенсвязывающие белки обычно будут способны взаимодействовать с выбранными иммунореактивными антигенами на неопластических или иммунореактивных клетках и обеспечивать увеличение гибели этих клеток. Конечно, фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в виде одной или большего количества доз для обеспечения фармацевтически эффективного количества модифицированного связывающего полипептида.

В соответствии с объемом настоящего изобретения антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению можно вводить человеку или другому животному в соответствии с вышеупомянутыми способами лечения в количестве, достаточном для оказания терапевтического или профилактического эффекта. Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению можно вводить такому человеку или другому животному в традиционной лекарственной форме, приготовленной путем объединения антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению с традиционным фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем в соответствии с известными методами. Специалисту в данной области техники будет понятно, что форма и характер фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя диктуются количеством активного ингредиента, с которым его следует комбинировать, способом введения и другими хорошо известными переменными. Специалисты в данной области техники также поймут, что смесь, содержащая один или большее количество видов

антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем описании, может оказаться особенно эффективной. Аналогично, нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе, векторы, описанные в данном документе, клетки-хозяева, описанные в данном документе (в частности, иммунные клетки, несущие CAR) или композиции, описанные в данном документе, можно вводить человеку или другому животному в соответствии со способами лечения описанными выше, в количестве, достаточном для оказания терапевтического или профилактического эффекта.

В контексте данного документа термины «эффективность» или «эффективность in vivo» относятся к ответу на терапию фармацевтической композицией по настоящему изобретению с применением, например, стандартизированных критериев ответа, таких как стандартные офтальмологические критерии ответа. Успех или эффективность in vivo терапии с применением фармацевтической композиции по настоящему изобретению относится к эффективности композиции по ее прямому назначению, т.е. способности композиции вызывать желаемый эффект. Эффективность in vivo можно контролировать с помощью установленных стандартных способов для конкретных заболеваний. Кроме того, можно применять различные параметры клинической химии, специфичные для заболевания, и другие установленные стандартные способы.

В некоторых вариантах осуществления соединения и клетки, описанные в данном документе, вводят в комбинации с одним или большим количеством различных фармацевтических соединений. Как правило, терапевтическое применение соединений и клеток, описанных в данном документе, может быть в комбинации с одним или большим количеством видов терапии, выбранных из группы терапии антителами, химиотерапии, цитокиновой терапии, терапии дендритными клетками, генной терапии, гормональной терапии, лазерной светотерапии, лучевой терапии или вакцинотерапии.

Способы лечения

В данном документе описаны способы лечения заболеваний или нарушений, ассоциированных с экспрессией uPAR у пациента, путем введения антигенсвязывающих белков, цитокинов или слитых белков по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение, ассоциированное с экспрессией uPAR, представляет собой рак (например, рак, экспрессирующий uPAR, или опухоль, экспрессирующую uPAR).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций, белков, связывающих uPAR, или слитых белков, описанных в данном документе.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию или слитый белок вводят одновременно с цитокином или его вариантом или вторым слитым белком, при этом второй слитый белок содержит цитокин или его вариант, отличный от первого слитого белка.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию или

слитый белок вводят последовательно с цитокином или его вариантом или вторым слитым белком, при этом второй слитый белок содержит цитокин или его вариант, отличный от первого слитого белка.

В определенных вариантах осуществления цитокин или его вариант содержит субъединицу p35 IL-12 или субъединицу p40 IL-12.

В определенных вариантах осуществления скорость клиренса слитого белка из опухоли пациента ниже, чем скорость клиренса слитого белка из сыворотки пациента.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка и неслитой субъединицы IL-12, при этом:

(a) слитый белок содержит:

(i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с рецептором урокиназного активатора плазминогена (uPAR); и

(ii) субъединицу p35 IL-12 или ее вариант, или субъединицу p40 IL-12 или ее вариант; и

(b) неслитую субъединицу IL-12, содержащую субъединицу p35 IL-12 или ее вариант, или субъединицу p40 IL-12 или ее вариант,

при этом, когда слитый белок содержит субъединицу p35 IL-12 или ее вариант, неслитая субъединица IL-12 содержит субъединицу p40 IL-12 или ее вариант, и когда слитый белок содержит субъединицу p40 IL-12 или ее вариант, неслитая субъединица IL-12 содержит субъединицу p35 IL-12 или ее вариант.

В определенных вариантах осуществления слитый белок и неслитую субъединицу IL-12 вводят последовательно.

В определенных вариантах осуществления один или оба из указанных агентов: слитый белок и неслитая субъединица IL-12, вводят последовательно.

В определенных вариантах осуществления сначала вводят слитый белок, а затем вводят неслитую субъединицу IL-12 после того, как пройдет достаточно времени для накопления слитого белка в опухоли пациента.

В определенных вариантах осуществления сначала вводят слитый белок, а затем вводят неслитую субъединицу IL-12 после того, как пройдет достаточно времени для существенного снижения концентрации слитого белка в сыворотке пациента.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества первого слитого белка и второго слитого белка, при этом:

(a) первый слитый белок содержит:

(i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с первым эпитопом рецептора урокиназного активатора плазминогена (uPAR); и

(ii) субъединицу p35 IL-12 или ее вариант; и

(b) второй слитый белок содержит:

(i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается со вторым

эпитопом uPAR; и

(ii) субъединицу p40 IL-12 или ее вариант.

В определенных вариантах осуществления первый эпитоп и второй эпитоп являются одинаковыми.

В определенных вариантах осуществления первый эпитоп и второй эпитоп отличаются.

В определенных вариантах осуществления первый слитый белок и второй слитый белок вводят последовательно.

В определенных вариантах осуществления один или оба из указанных агентов: первый слитый белок и второй слитый белок, вводят внутривенно.

В определенных вариантах осуществления сначала вводят первый слитый белок, а затем вводят второй слитый белок после того, как пройдет достаточно времени для накопления первого слитого белка в опухоли пациента.

В определенных вариантах осуществления сначала вводят первый слитый белок, а затем вводят второй слитый белок после того, как пройдет достаточно времени для существенного снижения концентрации первого слитого белка в сыворотке пациента.

В определенных вариантах осуществления сначала вводят второй слитый белок, а затем вводят первый слитый белок после того, как пройдет достаточно времени для накопления второго слитого белка в опухоли пациента.

В определенных вариантах осуществления сначала вводят второй слитый белок, а затем вводят первый слитый белок после того, как пройдет достаточно времени для существенного снижения концентрации второго слитого белка в сыворотке пациента.

Для специалистов в данной области техники будет очевидно, что другие подходящие модификации и адаптации описанных в данном документе способов могут быть выполнены с использованием подходящих эквивалентов, не выходя за рамки описанных в данном документе вариантов осуществления изобретения. После подробного описания некоторых вариантов осуществления изобретения, они будут более понятны со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение и характеризация родительских антител анти-uPAR

Мышей NZBW иммунизировали попеременной инъекцией рекомбинантного uPAR человека и белка внеклеточного домена uPAR мыши. Гибридомы генерировали и подвергали скринингу относительно uPAR человека и мыши с помощью ELISA и в клетках HEK293, сверхэкспрессирующих uPAR, для идентификации антител со специфичностью связывания с uPAR человека и мыши. Лучшие клоны дополнительно подвергали скринингу с помощью ELISA на связывание с uPA-связанными вариантами лиганда uPAR, включая 1) uPAR человека с uPA человека и без него, 2) uPAR мыши с uPA мыши и без него и 3) uPAR человека с мутацией H47C/N259C (вариант uPAR человека, имитирующий лиганд-связанную конформацию). Для скрининга применяли следующие

аминокислотные последовательности:

Слитый белок uPAR-His-AviTag человека

LRCMQCKTNGDCRVEECALGQDLCRTTIVRLWEEGEELELVEKSCTHSEKTNRT
LSYRTGLKITSLTEVVCGLDLCNQGNSGRAVTYSRSRYLECISCGSSDMSCERGRHQSLQ
CRSPEEQCLDVVTHWIQEGEEGRPKDDRHLRGCGYLPGCPGSNGFHNNDTFHFLKCCN
TTKCNEGPILELENLPQNGRQCYSCKGNSTHGCSSEETFLIDCRGPMNQCLVATGTHEPK
NQSYMVRGCATASMCQHAHLGDAFSMNHIDVSCCTKSGCNHPDLDVQYRGGSHHHH
HHGGSGLNDIFEAQKIEWHE

Слитый белок uPAR-His-AviTag мыши

LQCMQCESNQSCLVEECALGQDLCRTTVLREWQDDRELEVVTRGCAHSEKTNR
TMSYRMGSMIISLTETVCATNLCNRPRPGARGRAFPQGRYLECASCTSLDQSCERGREQ
SLQCRYPTEHCIEVVTLQSTERSLKDEDYTRGCGSLPGCPGTAGFHSNQTFHFLKCCNYT
HCNGGPVLDLQSFPPNGFQCYSCEGNNTLGCSSEEASLINCRGPMNQCLVATGLDVLGN
RSYTVRGCATASWCQGSHVADSFPTHLNVSVSCCHGSGCNSPTGGSHHHHHHGGSGLN
DIFEAQKIEWHE

Слитый белок uPA-His-AviTag человека

MYRMQLLSCIALSLALVTNSSNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCP
KKFGGQHCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTYHAHRSDA
LQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCAGGSHHHHHHGGSGLN
DIFEAQKIEWHE

Слитый белок uPA-His-AviTag мыши

MYRMQLLSCIALSLALVTNSGSVLGAPDESNCGCQNGGVCVSYKYFSRIRRCSC
PRKFQGEHCEIDASKTCYHGNGDSYRGKANTDTKGRPCLAWNAPAVLQKPYNAHRPD
AISLGLGKHNYCRNPDNQKRPWCYVQIGLRQFVQECMVHDCGGSHHHHHHGGSGLND
IFEAQKIEWHE

Каждое из антител, обозначенных M1, M5, M8 и M43, связывало uPAR человека независимо от лиганда uPA, и их выбирали для дальнейшей характеризации.

Аминокислотные последовательности вариабельного домена тяжелой цепи (VH) и вариабельного домена легкой цепи (VL), а также аминокислотные последовательности HCDR1-3 и LCDR1-3 для M1, M5, M8 и M43 приведены ниже в **Таблице 3**.

Таблица 3 - Последовательности родительских антител

ID последовательности	Последовательность
M1 VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDEYINWVKQRPE QGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGKATITADTSSNTAYLQLSS LTSEDTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 1)
M1 VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTS PKRWLYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATY

	YCQQWSSNPPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 2)
M1 HCDR1	GFNIKDEY (SEQ ID NO: 3)
M1 HCDR2	IDPENGDT (SEQ ID NO: 4)
M1 HCDR3	TGGNYVGWFPY (SEQ ID NO: 5)
M1 LCDR1	SSVSY (SEQ ID NO: 6)
M1 LCDR2	DTS (SEQ ID NO: 7)
M1 LCDR3	QQWSSNPPY (SEQ ID NO: 8)
M5 VH	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQPPG KDLEWLVVIWSDGGTTYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNS LQTDDTAMYYCARGGRSDLFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 9)
M5 VL	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQ KPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 10)
M5 HCDR1	GFSLTNYG (SEQ ID NO: 11)
M5 HCDR2	IWSDGGT (SEQ ID NO: 12)
M5 HCDR3	ARGGRSDLFAY (SEQ ID NO: 13)
M5 LCDR1	QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 14)
M5 LCDR2	KVS (SEQ ID NO: 15)
M5 LCDR3	FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 16)
M8 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGNTFTDYGMNWVKQSPG KGLKWMGWINTNTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQIN NLKNEDMATYFCAHYSFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 17)
M8 VL	DIQMTQSPASLSVSVGQTVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKS PQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSY YCQHFWGTPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)
M8 HCDR1	GNTFTDYG (SEQ ID NO: 19)
M8 HCDR2	INTNTGEP (SEQ ID NO: 20)
M8 HCDR3	AHYSFDY (SEQ ID NO: 21)
M8 LCDR1	ENIYSN (SEQ ID NO: 22)
M8 LCDR2	AAT (SEQ ID NO: 23)
M8 LCDR3	QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 24)
M43 VH	QVQLQQSGAELARPGASVNLSCKASGYTFTSYGISWVKQRTG QGLEWIGEIYPRSGNTYYNEKFKGKATLTADKSSRTAYMELR

	SLTSEDSAVYFCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 25)
M43 VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSSRYLHWYQQKSG ASPKLWIYGTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTINSVEAEDAA TYYCQQYHSDPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 26)
M43 HCDR1	GYTFTSYG (SEQ ID NO: 27)
M43 HCDR2	IYPRSGNT (SEQ ID NO: 28)
M43 HCDR3	AGKDYGSTYADY (SEQ ID NO: 29)
M43 LCDR1	SSVSSRY (SEQ ID NO: 30)
M43 LCDR2	GTS (SEQ ID NO: 31)
M43 LCDR3	QQYHSDPLT (SEQ ID NO: 32)

Определяли аффинность связывания антител анти-uPAR: M1, M5, M8 и M43. Анализ аффинности связывания проводили с применением платформы Octet, основанной на технологии интерферометрии биослоя (BLI). Вкратце, антитела uPAR иммобилизовали с помощью сенсора против Fc мыши (AMC). Каждое антитело uPAR тестировали в концентрации 10 мкг/мл. Нагрузка представляла собой меченный гистидином uPAR человека (Sino#10925-H08H). В качестве контроля применяли «голый» датчик. Аффинность связывания каждого антитела против uPAR человека указана ниже в **Таблице 4**.

Таблица 4 - Данные аффинности связывания родительских антител

Антитело uPAR	KD (M)	k on (1/мс)	k dis (1/с)	Полный R^2
M8	1,08E-09	5,84E+05	6,30E-04	0,994079
M43	7,47E-09	1,18E+06	8,83E-03	0,998659
M1	5,11E-10	6,64E+05	3,40E-04	0,999416
M5	3,31E-08	2,91E+04	9,62E-04	0,983345

Дополнительный анализ аффинности связывания проводили с помощью платформы Octet с меченным гистидином uPAR человека, иммобилизованным на сенсоре в концентрации 10 мкг/мл. Нагрузкой было каждое из антитрел M1, M5, M8 и M43. В качестве контроля применяли «голый» датчик. Аффинность связывания каждого антитела против uPAR человека, когда uPAR человека был иммобилизован, указана ниже в **Таблице 5**. Каждое антитело демонстрировало аффинность связывания менее 1 пМ, что указывает на эффект авидности.

Таблица 5 - Данные аффинности связывания

Антитело uPAR	KD (M)	k on (1/мс)	k dis (1/с)	Полный R^2
M8	<1,0E-12	3,11E+05	<1,0E-07	0,985572

M43	<1,0E-12	5,54E+05	<1,0E-07	0,990357
M1	<1,0E-12	4,48E+05	<1,0E-07	0,982889
M5	<1,0E-12	2,83E+04	<1,0E-07	0,985581

Эпитопы, связывающие uPAR, для каждого антитела характеризовали с помощью платформы Octet, указанной выше. Биотинилированный вариант uPAR человека, домен uPAR DII-DIII или домен uPAR DIII захватывали сенсором SA при 10 мкг/мл в течение 180 секунд с последующим связыванием M1, M5, M8, M43 или ATN 568 в течение 150 секунд в концентрации 200 нМ. Следующие аминокислотные последовательности использовали для домена DII-DIII и домена DIII:

Домен DII-DIII uPAR человека HisAvi Tag

MYRMQLLSCIALSLALVTNSGNSGRAVTYSRSRYLECISCGSSDMSCERGRHQSL QCRSPEEQCLDVVTHWIQEGEEGRPKDDRHLRGCGYLPGCPGSNGFHNNDTFHFLKCC NTTKCNEGPILELENLPQNGRQCYSCKGNSTHGCSSEETFLIDCRGPMNQCLVATGTHEP KNQSYMVRGCATASMCQHAHLGDAFSMNHIDVSCCTKSGCNHPDLDVQYRGGSHHH HHHGGSGLNDIFEAQKIEWHE

Домен DIII uPAR человека HisAvi Tag

MYRMQLLSCIALSLALVTNSGPILELENLPQNGRQCYSCKGNSTHGCSSEETFLID CRGPMNQCLVATGTHEPKNQSYMVRGCATASMCQHAHLGDAFSMNHIDVSCCTKSGC NHPDLDVQYRGGSHHHHHHGGSGLNDIFEAQKIEWHE

M1, M5, M8 и M43 связываются с доменом DII-DIII uPAR человека, тогда как антитело M1 также способно связывать только DIII (**ФИГ. 1А, ФИГ. 1В**). Было обнаружено, что каждое из M1, M5, M8 и M43 связывается с uPAR независимо от связывания uPA с uPAR, лигандом uPAR. В качестве антитела сравнения использовали антитело анти-uPAR ATN-658.

Для тестирования конкурентного связывания антитела и лиганда uPA, uPA человека захватывали сенсором SA при концентрации 3,2 мкг/мл (200 нМ) в течение 45 секунд. Рекомбинантный белок человека uPAR-His загружали при 100 нМ в течение 180 секунд, а затем M1, M5, M8, M43 или ATN 568 в течение 150 секунд при концентрации 200 нМ.

Анализ конкурентного связывания антител проводили с помощью платформы Octet. Анализ конкурентного связывания антител проводили путем захвата биотинилированного uPAR человека на сенсорах SA. Затем M1, M5, M8, M43 и ATN-658 были загружены в качестве первого лиганда, связывающего uPAR человека в заранее определенной концентрации насыщения. После достижения насыщения первым лигандом M1, M5, M8, M43 и ATN-568 загружались в качестве второго лиганда, чтобы конкурировать с M1, M5, M8, M43 или ATN-658. Раствор связывания второго лиганда содержал такую же концентрацию первого предварительно загруженного лиганда, чтобы предотвратить его диссоциацию во время связывания второго лиганда. Было обнаружено, что M1 конкурирует только с антителом сравнения ATN-658. M5 конкурировал с M43. Ни

одно из M1, M8 или M43 не конкурировало за связывание друг с другом с uPAR человека, что указывает на то, что эти три антитела имеют уникальные эпитопы для uPAR человека (т.е. антитела неконкурентны). Данные матричного конкурентного анализа приведены ниже в **Таблице 6**.

Таблица 6 - Сводные данные конкуренции антител. Значения, демонстрирующие конкуренцию, выделены жирным шрифтом.

Антитело	M1	M5	M8	M43	ATN-368	Буфер
M1	**-0,0441**	0,1611	0,3019	0,3122	**-0,0144**	-0,0137
M5	0,3646	**-0,0173**	0,3211	**0,0175**	0,3865	-0,0149
ATN-368	**-0,0232**	0,1793	0,3104	0,3421	**-0,0274**	-0,0053
нет	0,3049	0,1809	0,2841	0,295	0,3304	-0,0009

Затем антитела тестировали на их способность связывать uPAR человека и мыши, экспрессируемый на поверхности клеток. Клетки HEK293 человека, сконструированные для экспрессии uPAR человека или uPAR мыши, помечали красителем и смешивали с немечеными родительскими клетками HEK293. Клетки инкубировали с 100 нМ uPA человека и мыши (лиганд uPAR) в течение 30 минут, а затем обрабатывали титрованием антител uPAR в течение 30 минут. Связывание антитела uPAR определяли с использованием вторичного антитела против IgG мыши, меченного фикоэритрином (PE). Медианные значения интенсивности флуоресценции (MFI) для тестируемых концентраций антител приведены на **ФИГ. 2А** и **ФИГ. 2В**. Значения EC50 приведены ниже в **Таблице 7**. Значения EC50 в экспериментах по связыванию клеток без лиганда uPA были аналогичны экспериментам с лигандом uPA. Значения связывания EC50 M1, M5, M8, M43 были выше, чем у антитела сравнения ATN-658.

Таблица 7 - Значения EC50 для антител анти-PAR в анализе связывания клеток

Антитела	EC50 (нМ)	
	Hu-uPAR	Ms-uPAR
M43	0,30	2,83
M8	0,54	31,35
M5	2,53	93,81
M1	0,66	-
ATN-658	3,99	-

Пример 2 - Гуманизация родительских антител анти-uPAR

Описанные выше родительские антитела анти-uPAR: M1, M8 и M43 перенесили для гуманизации. Сначала определяли различные параметры для каждого антитела, включая 1) процент естественной гуманизации каждого антитела мыши по отношению к последовательности антитела человека; 2) области иммуногенности (например, эпитопы антигенности Т-клеток, В-клеток и MHC-II); 3) проблемы, связянные с неправильным

сворачиванием антител (например, агрегация и термическая стабильность); и 4) посттрансляционные модификации (PTM). PTM включали сайты дезамидирования (например, Asn-Gly (NG), вызывающие превращение аспарагина в аспартат/изоаспартат), сайты изомеризации (например, Asp-Gly (DG), Asp/Asp (DD), вызывающие превращение аспартата в изоаспартат), сайты гликозилирования (например, аминокислотные мотивы Asn-X-Ser/Thr (NXS), где «X» представляет собой любую аминокислоту, такую как NLS), сайты окисления (например, аминокислоты Met и/или Trp, которые могут находиться на поверхности и/или в CDR антитела), сайты протеолиза (например, аминокислотные мотивы Asp-Ser (DS) и/или Asp-Pro (DP)).

Затем генерировали гуманизированные антитела. Аминокислотные последовательности вариабельного домена тяжелой цепи (VH) и вариабельного домена легкой цепи (VL), а также аминокислотные последовательности HCDR1-3 и LCDR1-3 приведены ниже в **Таблице 8**. Полноразмерные аминокислотные последовательности тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC), которые включают константную область антитела, приведены ниже в **Таблице 9**. Аминокислотные последовательности антитела в формате одноцепочечной вариабельной области (scFv) приведены ниже в **Таблице 10**.

Таблица 8 - Аминокислотные последовательности гуманизированного антитела VH/VL и HCDR1-3/LCDR1-3

ID последовательности	Последовательность
M1-H1 VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIKDEYINWVKQRPG KGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGRVTITADTSTDTAYLELSS LRSEDTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 33)
M1-H3 VH	EVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKDEYINWVKQRPG QGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGRATITADTSTDTAYLELSS LRSEDTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 34)
M1-L1 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPR RWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QWSSNPPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 35)
M1-L4 VL	QIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSP RRWLYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYY CQQWSSNPPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 36)
M1-H1 и M1-H3 HCDR1	GFNIKDEY (SEQ ID NO: 3)
M1-H1 и M1-H3	IDPENGDT (SEQ ID NO: 4)

HCDR2	
M1-H1 и M1-H3 HCDR3	TGGNYVGWFPY (SEQ ID NO: 5)
M1-L1 и M1-L4 LCDR1	SSVSY (SEQ ID NO: 6)
M1-L1 и M1-L4 LCDR2	DTS (SEQ ID NO: 7)
M1-L1 и M1-L4 LCDR3	QQWSSNPPY (SEQ ID NO: 8)
M8-H3 VH	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTDYGMNWVKQSPG KGLKWMGWINTNTGEPTYAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISS LKAEDTATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 37)
M8-L2B2 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKSP QLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYTLKISSLQPEDFATYY CQHFWGTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 38)
M8-L2B5 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKSP QLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYY CQHFWGTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 39)
M8-L2B10 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKSP QLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYY CQHFWGTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 40)
M8-H3 HCDR1	G**T**TFTDYG (SEQ ID NO: 41)
M8-H3 HCDR2	INTNTGEP (SEQ ID NO: 20)
M8-H3 HCDR3	AHYSFDY (SEQ ID NO: 21)
M8-L2B2, M8-L2B5, и M8-L2B10 LCDR1	ENIYSN (SEQ ID NO: 22)
M8-L2B2, M8-L2B5, и M8-L2B10 LCDR2	AAT (SEQ ID NO: 23)
M8-L2B2, M8-L2B5, и M8-L2B10 LCDR3	QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 24)
M43-H1bm5 VH	QVQLVQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFTSYGISWVRQRTG QGLEWIGEIYPRSGNTYYNEKFKGKVTLTTDKSTRTAYMELRS LTSEDTAVYYCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 42)

M43-H4bm5 VH	QVQLQQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFTSYGISWVRQRTG QGLEWIGEIYPRSGNTYYNEKFKGKATLTADKSTRTAYMELR SLTSEDTAVYFCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 43)
M43-L4 VL	QIVLTQSPATLSASPGERVTMTCSASSSVSSRYLHWYQQKSGA SPRLWIYGTSNLASGVPARFSGSGPGTSYTLTISSVEPEDAATY YCQQYHSDPLTFGQGTKLELK (SEQ ID NO: 44)
M43-H1bm5 и M43-H4bm5 HCDR1	GYTFTSYG (SEQ ID NO: 27)
M43-H1bm5 и M43-H4bm5 HCDR2	IYPRSGNT (SEQ ID NO: 28)
M43-H1bm5 и M43-H4bm5 HCDR3	AGKDYGSTYADY (SEQ ID NO: 29)
M43-L4 LCDR1	SSVSSRY (SEQ ID NO: 30)
M43-L4 LCDR2	GTS (SEQ ID NO: 31)
M43-L4 LCDR3	QQYHSDPLT (SEQ ID NO: 32)

Таблица 9 - Полноразмерные аминокислотные последовательности гуманизированного антитела

ID последовательности	Последовательность
M1-H1 HC	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIKDEYINWVKQRPG KGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGRVTITADTSTDTAYLELSS LRSEDTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 45)
M1-H3 HC	EVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKDEYINWVKQRPG QGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGRATITADTSTDTAYLELSS LRSEDTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

	TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 46)
M1-L1 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPR RWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QWSSNPPYTFGQGTKLEIKTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 47)
M1-L1 LC вариант	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPR RWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QWSSNPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 159)
M1-L4 LC	QIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSP RRWLYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYY CQQWSSNPPYTFGQGTKLEIKTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 48)
M1-L4 LC вариант	QIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSP RRWLYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYY CQQWSSNPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 160)
M8-H3 HC	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTDYGMNWVKQSPG KGLKWMGWINTNTGEPTYAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA

	VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 49)
M8-L2B2 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKSP QLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYTLKISSLQPEDFATYY CQHFWGTPWTFGGGTKVEIKTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 50)
M8-L2B2 LC вариант	DIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKSP QLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYTLKISSLQPEDFATYY CQHFWGTPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 161)
M8-L2B5 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKS PQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTY YCQHFWGTPWTFGGGTKVEIKTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 51)
M8-L2B5 LC вариант	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKS PQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTY YCQHFWGTPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO: 162)
M8-L2B10 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKSP QLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYY CQHFWGTPWTFGGGTKVEIKTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST

	YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 52)
M8-L2B10 LC вариант	DIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKSP QLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYY CQHFWGTPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 163)
M43-H1bm5 HC	QVQLVQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFTSYGISWVRQRTG QGLEWIGEIYPRSGNTYYNEKFKGKVTLTTDKSTRTAYMELR SLTSEDTAVYYCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 53)
M43-H4bm5 HC	QVQLQQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFTSYGISWVRQRTG QGLEWIGEIYPRSGNTYYNEKFKGKATLTADKSTRTAYMELR SLTSEDTAVYFCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 54)
M43-L4 LC	QIVLTQSPATLSASPGERVTMTCSASSSVSSRYLHWYQQKSGA SPRLWIYGTSNLASGVPARFSGSGPGTSYTLTISSVEPEDAATY YCQQYHSDPLTFGQGTKLELKTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

	(SEQ ID NO: 55)
M43-L4 LC вариант	QIVLTQSPATLSASPGERVTMTCSASSSVSSRYLHWYQQKSGA SPRLWIYGTSNLASGVPARFSGSGPGTSYTLTISSVEPEDAATY YCQQYHSDPLTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO: 164)

Таблица 10 - Аминокислотные последовательности антитела ScFv

ID последовательности	Последовательность
M1 ScFv (vH1-vL4)	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIKDEYINWVKQRPG KGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGRVTITADTSTDTAYLELSS LRSEDTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSQIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVSYMHW YQQKPGTSPRRWLYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSL EPEDFATYYCQQWSSNPPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 56)
M1 ScFv (vL4-vH1)	QIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKPGTS PRRWLYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATY YCQQWSSNPPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIKDEYINWVKQRPGKGLE WIGWIDPENGDTEYASKFQGRVTITADTSTDTAYLELSSLRSE DTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 57)
M1 ScFv (vH3-vL1)	EVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKDEYINWVKQRPG QGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGRATITADTSTDTAYLELSS LRSEDTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWY QQKPGTSPRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQWSSNPPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 58)
M1 ScFv (vL1-vH3)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSP RRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQWSSNPPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQ QSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKDEYINWVKQRPGQGLE WIGWIDPENGDTEYASKFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRSE DTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 59)
M1 ScFv (vH3-vL4)	EVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKDEYINWVKQRPG

	QGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGRATITADTSTDTAYLELSS LRSEDTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSQIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVSYMHW YQQKPGTSPRRWLYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSL EPEDFATYYCQQWSSNPPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 60)
M1 ScFv (vL4-vH3)	QIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKPGTS PRRWLYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATY YCQQWSSNPPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQL QQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKDEYINWVKQRPGQGLE WIGWIDPENGDTEYASKFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRSE DTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 61)
M8 ScFv (vH3-vL2B2)	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTDYGMNWVKQSPG KGLKWMGWINTNTGEPTYAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQQK PGKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYTLKISSLQPED FATYYCQHFWGTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 62)
M8 ScFv (vL2B2-vH3)	DIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKS PQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYTLKISSLQPEDFATY YCQHFWGTPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQIQLV QSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTDYGMNWVKQSPGKGLK WMGWINTNTGEPTYAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKA EDTATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 63)
M8 ScFv (vH3-vL2B5)	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTDYGMNWVKQSPG KGLKWMGWINTNTGEPTYAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSNLAWYQQK PGKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPED FGTYYCQHFWGTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 64)
M8 ScFv (vL2B5-vH3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKS PQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTY YCQHFWGTPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQIQLV QSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTDYGMNWVKQSPGKGLK WMGWINTNTGEPTYAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKA EDTATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 65)

M8 ScFv (vH3-vL2B10)	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTDYGMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYYCQHFWGTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 66)
M8 ScFv (vL2B10-vH3)	DIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYYCQHFWGTPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTDYGMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 67)
M43 ScFv (vH1-vL4)	QVQLVQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFTSYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYNEKFKGKVTLTTDKSTRTAYMELRSLTSEDTAVYYCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPATLSASPGERVTMTCSASSSVSSRYLHWYQQKSGASPRLWIYGTSNLASGVPARFSGSGPGTSYTLTISSVEPEDAATYYCQQYHSDPLTFGQGTKLELK (SEQ ID NO: 68)
M43 ScFv (vL4-vH1)	QIVLTQSPATLSASPGERVTMTCSASSSVSSRYLHWYQQKSGASPRLWIYGTSNLASGVPARFSGSGPGTSYTLTISSVEPEDAATYYCQQYHSDPLTFGQGTKLELKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFTSYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYNEKFKGKVTLTTDKSTRTAYMELRSLTSEDTAVYYCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 69)
M43 ScFv (vH4-vL4)	QVQLQQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFTSYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYNEKFKGKATLTADKSTRTAYMELRSLTSEDTAVYFCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPATLSASPGERVTMTCSASSSVSSRYLHWYQQKSGASPRLWIYGTSNLASGVPARFSGSGPGTSYTLTISSVEPEDAATYYCQQYHSDPLTFGQGTKLELK (SEQ ID NO: 70)
M43 ScFv (vL4-vH4)	QIVLTQSPATLSASPGERVTMTCSASSSVSSRYLHWYQQKSGASPRLWIYGTSNLASGVPARFSGSGPGTSYTLTISSVEPEDAAT

	YYCQQYHSDPLTFGQGTKLELKGGGGSGGGGSGGGGSQVQL QQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFTSYGISWVRQRTGQGL EWIGEIYPRSGNTYYNEKFKGKATLTADKSTRTAYMELRSLT SEDTAVYFCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 71)

Определяли аффинность связывания гуманизированных антител анти-uPAR: M1, M8 и M43. Анализ аффинности связывания проводили с применением платформы Octet, как описано выше. Вкратце, антитела uPAR иммобилизовали с помощью сенсора против Fc человека (AHC). Каждое антитело uPAR тестировали в концентрации 10 мкг/мл. Загрузка представляла собой меченный гистидином uPAR человека, вводимый в ходе титрования, начиная с 50 нМ, с последующими 2-кратными разведениями. Аффинность связывания протестированных гуманизированных антител против uPAR человека приведена ниже в **Таблице 11**. Примечательно, что гуманизированные антитела сохраняли аналогичную аффинность связывания с uPAR человека по сравнению с родительскими антителами.

Таблица 11 - Данные об аффинности связывания гуманизированных антител

Антитело	KD (M)	k on (1/мс)	k dis (1/с)
M1 - Химерный	1,11E-09	6,29E+05	7,01E-04
M1 - H1/L4	1,48E-09	6,65E+05	9,86E-04
M1 - H3/L1	1,64E-09	6,77E+05	1,11E-03
M1 - H3/L4	1,30E-09	6,86E+05	8,93E-04
M8 - Химерный	1,79E-09	2,73E+05	4,90E-04
M8 - H3/L2B2	1,74E-09	2,46E+05	4,27E-04
M8 - H3/L2B5	1,65E-09	2,13E+05	3,51E-04
M8 - H3/L2B10	2,35E-09	2,03E+05	4,77E-04
M43 - Химерный	1,51E-08	4,02E+05	6,06E-03
M43 - H1bm5/L4	1,59E-08	4,15E+05	6,58E-03
M43 - H4bm5/L4	1,47E-08	4,54E+05	6,66E-03

Пример 3 - Конструирование интерлейкина 12 (IL-12)

IL-12 представляет собой гетеродимерный цитокин, состоящий из субъединицы p35 и субъединицы p40, которые асоциируются с образованием IL-12p70. IL-12 экспрессируется антигенпрезентирующими клетками и играет множество ролей в иммуноонкологическом жизненном цикле. IL-12 является мощным стимулятором иммунного ответа, но проблемы токсичности ограничивают применение IL-12 в клинических условиях. Локальная доставка может снизить токсичность, но это исключает системную доставку.

Конструирование одной или обеих субъединиц p35 и p40 дает несколько преимуществ. В каждой субъединице можно использовать набор мутаций «замок и ключ» для модуляции аффинности и усиления специфичности между двумя субъединицами. Например, мутации, введенные в сконструированные субъединицы, могут снизить узнаваемость субъединиц дикого типа, что еще больше снижает токсичность. Парные остатки заряда на границе раздела между p35 и p40 могут быть сконструированы для введения дополнительной специфичности.

Конструирование остатков цистеина IL12p35/IL12p40

В рамках первоначальной стратегии оптимизации было идентифицировано несколько точечных мутаций в p35 и p40 для улучшения стабильности и экспрессии. Межмолекулярный дисульфидный мостик образуется между C74 p35 и C177 p40. Был проведен скрининг с аминокислотными заменами на C74 p35 и C177 p40 с целью устранения дисульфидного мостика при сохранении или повышении аффинности связывания между двумя субъединицами. Для p35 были сгенерированы замены C74S, S(SS1), D, K, R, Q, W и Y. Для p40 были сгенерированы замены C177S, H, M, F, Y, R, K, E, Q, I, W и N. S(SS1) соответствует замене C15S, C88S и C74S в p35. Пара C15S/C88S удаляет внутренний дисульфидный мостик. Затем каждый вариант p35 C74 тестировали против каждого из вариантов p40 C177. Аффинность связывания измеряли с применением платформы Octet, описанной выше. Вкратце, в сенсор загружали 5-10 мкг/мл либо p35, либо p40. Захватывающее соединение было представлено в диапазоне концентраций от 500 нМ до 7,8 нМ. Как продемонстрировано на **ФИГ. 3**, несколько пар вариантов p35/p40 продемонстрировали высокую аффинность связывания.

Выбранные пары вариантов p35/p40 были выбраны для дальнейшей характеризации аффинности связывания. В частности, вариант p35 C74D, K, W и Y был соединен либо с вариантом p40 C177S, либо с вариантом C177F. Полные данные по аффинности связывания приведены ниже в **Таблицах 12** и **13**. Как продемонстрировано ниже, каждая пара вариантов p35/p40 проявила высокую аффинность связывания.

Таблица 12 - Аффинность связывания p40 C177S с p35 C74D, K, W и Y

P35 C74 Sub.	KD (M)	KD ошибка	Kon (1/мс)	Kon ошибка	Kdis (1/c)	Kdis ошибка
D	5,71E-08	3,92E-10	1,76E+04	1,05E+02	1,00E-03	3,36E-06
K	1,96E-08	1,39E-10	2,59E+04	1,18E+02	5,08E-04	2,78E-06
W	2,70E-08	2,49E-10	1,60E+04	9,85E+01	4,32E-04	2,97E-06
Y	2,32E-08	2,13E-10	1,77E+04	1,03E+02	4,11E-04	2,91E-06

Таблица 13 - Аффинность связывания p40 C177F с p35 C74D, K, W и Y

P35 C74	KD (M)	KD ошибка	Kon (1/mc)	Kon	Kdis (1/c)	Kdis

Sub.				ошибка		ошибка
D	6,02E-08	5,34E-10	1,19E+04	9,13E+01	7,19E-04	3,23E-06
K	1,84E-08	1,34E-10	1,60E+04	6,15E+01	2,95E-04	1,82E-06
W	2,54E-08	2,15E-10	1,15E+04	5,85E+01	2,91E-04	1,96E-06
Y	2,38E-08	2,69E-10	1,25E+04	8,43E+01	2,98E-04	2,71E-06

В дополнение к приведенным выше заменам дисульфидного мостика в p40 (C252) был идентифицирован свободный тиол. Этот сайт также был сконструирован для замены C252S с целью удаления свободного тиола.

Конструирование IL12p35/IL12p40 - повышение стабильности

Хотя связывание p35 и p40 с партнерами по слиянию может улучшить стабильность и выход продукции (см. ниже), было бы выгодно сконструировать субъединицы для улучшения стабильности без партнера по слиянию. Частица p35, в частности, нестабильна сама по себе, и ей в значительной степени помогает партнер по слиянию или p40 для правильного сворачивания и экспрессии.

Вначале мутации S27D и D188N в p35 были идентифицированы с помощью подхода направленной молекулярной эволюции (см. публикацию Leong et al. PNAS. 100(3): 1163-1168. 2003). Замены p35 полезны для увеличения выхода продукции.

На p35 выявлено несколько гидрофобных областей и гибких участков, выходящих на поверхность. Симуляция и моделирование in silico применялись для идентификации потенциальных мутаций аминокислот (т.е. замен, делеций и/или вставок), которые могут улучшить стабильность p35. В качестве первого прохода 85 одноточечных мутаций были ранжированы по дельта-дельта G (ddG, т.е. разница между дельта G для WT и мутантного p35), растворимости, показателям позиционной весовой матрицы (pssm) и прогнозированию эпитопа. В процессе была предпринята попытка ввести полярные остатки вместо гидрофобных остатков, подвергшихся воздействию растворителя, для лучшей растворимости, а также ввести объемные гидрофобные остатки внутрь для лучшей упаковки ядра. Каждый отдельный мутант был протестирован на экспрессию и стабильность посредством вестерн-блоттинга. После анализа вестерн-блоттинга белки очищали и тестировали с помощью HPLC для определения % мономера и % агрегации. Точечные мутации, протестированные с помощью вестерн-блоттинга, приведены ниже в **Таблице 14**. Образцы с ID 70-90 представляли собой слитые образцы p35 сывороточного альбумина мыши (MSA). Образцы с ID выделенные жирным курсивом (ID 72, 75, 76, 80, 82, 83), демонстрировали лучшую экспрессию среди протестированных, хотя экспрессировались все слитые образцы p35-MSA.

Таблица 14 - Точечная мутация, экспрессия которой протестирована с помощью вестерн-блоттинга

ID образца	Точечная мутация(и)	ID образца	Точечная мутация(и)

1	M119L	49	R1D
2	M145L	50	N2D
3	M111L	51	A6E
4	M119Y	52	A6H
5	F150Y	53	A6Q
6	M111W	54	F39E
7	V114I	55	F39Y
8	M111F	56	F39H
9	M12R	57	F39K
10	M12S	58	F39N
11	S27D	59	S44E
12	Q35E/N28R	60	K117E
13	Q35E	61	E143R
14	S44K	62	N151D
15	V60E	63	S159Q
16	T80K	64	S159R
17	T80R	65	S81C/A99C
18	K117R	66	T59C/S104C
19	N120D	67	T80C/S103C
20	K128Q	68	M29C/N136C
21	N136R	69	WT
22	A139T	70	WT-MSA
23	L161D	71	M12R
24	L161E	**72**	***M12S***
25	L161K	73	V60E
26	L161N	74	M111L
27	L161Q	**75**	***M111F***
28	L161S	**76**	***M111W***
29	K172R	77	M119L
30	S192N	78	M119Y
31	A121K	79	V114I
32	M12Q	**80**	***M145L***
33	S27E	81	F150Y
34	N28R	**82**	***L161D***

35	T80N	**83**	***L161Q***
36	T80Q	84	L161S
37	A121N	85	F39D
38	K122R	86	F39H
39	A139Q	87	S27D
40	I171V	88	Q35E/N28R
41	N21D	89	T80K
42	R24E	90	S44K
43	S27H		
44	F39D		
45	S103N		
46	A139R		
47	F132Y		
48	S159E		

После анализа вестерн-блоттинга образцы с ID 69-90 (слияния p35-MSA) были протестированы с помощью HPLC для определения % мономера и % агрегата. Результаты представлены ниже в **Таблице 15**, которая демонстрирует, что несколько точковых мутантов p35 имели большее процентное содержание мономера по сравнению с p35 дикого типа.

Таблица 15 - Точечные мутации, протестированные на содержание % мономера и % агрегата

Мутант	Мономер %	Агрегат %
WT (без MSA)	0	100
WT-MSA	5,84	94,16
M12R	3,92	96,08
M12S	5,36	94,64
V60E	4,35	95,65
M111L	0	100
M111F	8,88	91,12
M111W	9,73	90,27
M119L	5,55	94,45

M119Y	0	100
V114I	5,57	94,43
M145L	7,98	92,02
F150Y	5,97	94,03
L161D	5,67	94,33
L161Q	5,25	94,75
L161S	4,65	95,35
F39D	7,43	92,57
F39H	6,2	93,8
S27D	6,47	93,53
Q35E/N28R	7,1	92,9
T80K	0	100
S44K	7,59	92,41

Результаты скрининга одноточечных мутантов выявили несколько точечных мутаций, которые улучшают экспрессию и стабильность p35. В частности, следующие одиночные мутанты p35 демонстрировали значения % мономера, которые были аналогичны или превышали значения для слияния p35-MSA дикого типа:

M12S, S27D, F39D, F39H, S44K, M111F, M111W, V114I, M119L, M145L, F150Y, L161D, L161Q.

Двойной мутант, Q35E/N28R, также демонстрировал значение % мономера, которое превышало значение для слияния WT p35-MSA.

Двойные мутации будут протестированы для дальнейшего улучшения этих параметров.

Слияния IL12p35/IL12p40

Субъединицы p35 и p40 IL-12 представляют несколько производственных проблем, которые необходимо решить, прежде чем IL-12 можно будет применять в качестве жизнеспособного терапевтического средства. p35 практически не демонстрирует экспрессии. Экспрессия может быть улучшена путем связывания p35 с партнером по слиянию, таким как антитело или его фрагмент, или человеческий сывороточный альбумин (HSA). P35 также подвержена агрегации. p40 демонстрирует схожие проблемы. p40 может экспрессироваться без партнера по слиянию, однако в очищенной композиции часто присутствует гомодимер p40 (около 15-20%). p40 также подвержена димеризации и

агрегации с течением времени при 37 °C.

Субъединицы p35 и p40 тестировали на стабильность при 37°C с различными партнерами по слиянию. p40 тестировали с партнером по слиянию - Fab антитела и партнером по слиянию - полноразмерным IgG, с двумя субъединицами p40, связанными с каждым доменом CH3 молекулы IgG. Антитела Fab и полноразмерные антитела были получены из антител анти-uPAR, описанных выше. p35 тестировали с партнером по слиянию - сывороточный альбумин мыши (MSA) и партнером по слиянию - фрагмент антитела CH1-шарнир-CH2-CH3. Также был протестирован одноцепочечный IL-12 (scIL-12), в котором субъединицы p35 и p40 связаны аминокислотным линкером. Типовые слитые белки субъединиц IL-12 представлены на **ФИГ. 4**. Каждый слитый белок тестировали с помощью HPLC анализа для измерения образования агрегатов и димеров при 37°C в моменты времени 0 часов, 24 часа, 48 часов, 1 неделя и 2 недели. Результаты для каждого слитого белка приведены ниже в **Таблицах с 16** по **21**. Полученные результаты демонстрируют, что связывание субъединиц p35 и p40 с различными партнерами по слиянию может уменьшить образование агрегатов и гомодимеров.

Таблица 16 - только субъединица p40. Прогнозируемая молекулярная масса (Da) - 37087. Значения, выделенные жирным шрифтом, указывают мономер. Другие значения представляют собой агрегаты и димеры. Различия в прогнозируемой и рассчитанной MW частично обусловлены гликозилированием белка.

Момент времени	Рассчитанная MW (Da)	интерполированное значение Y	Время элюирования (Vt)	% площади
0 часов	97198	4,988	4,601	19,1
	53816	**4,731**	**5,090**	**80,9**
24 часа	1091167	6,038	3,051	9
	94812	4,977	4,589	56
	52814	**4,723**	**5,070**	**35**
48 часов	1255456	6,099	3,017	13
	96647	4,985	4,603	58
	54541	**4,737**	**5,086**	**29**
1 неделя	1793115	6,254	2,909	6
	97156	4,987	4,607	61
	54692	**4,738**	**5,097**	**33**
2 неделя	95072	4,978	4,637	60
	52744	**4,722**	**5,134**	**40**

Таблица 17 - слияние p40-Fab. Прогнозируемая молекулярная масса (Da) - 62310. Значения, выделенные жирным шрифтом, указывают мономер. Другие значения представляют собой агрегаты и димеры. Различия в прогнозируемой и рассчитанной MW

частично обусловлены гликозилированием белка.

Момент времени	Рассчитанная MW (Da)	интерполированное значение Y	Время элюирования (Vt)	% площади
0 часов	171495	5,234	4,068	3,1
	94351	**4,975**	**4,629**	**96,9**
24 часа	908794	5,958	3,116	5
	165574	5,219	4,065	15
	91339	**4,961**	**4,624**	**80**
48 часов	1000083	6,000	3,095	57
	165168	5,218	4,089	14
	92123	**4,964**	**4,649**	**29**
1 неделя	1055017	6,023	3,080	81
	167051	5,223	4,084	6
	93333	**4,970**	**4,646**	**13**
2 неделя	1070333	6,030	3,087	93
	168418	5,226	4,085	2
	90472	**4,957**	**4,685**	**5**

Таблица 18 - слияние p40-IgG. Прогнозируемая молекулярная масса (Da) - 215845. Значения, выделенные жирным шрифтом, указывают мономер. Другие значения представляют собой агрегаты и димеры. Различия в прогнозируемой и рассчитанной MW частично обусловлены гликозилированием белка.

Момент времени	Рассчитанная MW (Da)	интерполированное значение Y	Время элюирования (Vt)	% площади
0 часов	**246412**	**5,392**	**3,787**	**100**
24 часа	803801	5,905	3,162	4
	239288	**5,379**	**3,779**	**96**
48 часов	912829	5,960	3,128	10
	240573	**5,381**	**3,793**	**90**
1 неделя	1114509	6,047	3,061	69
	242653	**5,385**	**3,791**	**31**
2 неделя	1179011	6,072	3,054	93
	237524	**5,376**	**3,815**	**7**

Таблица 19 - слияние p35-MSA. Прогнозируемая молекулярная масса (Da) - 92118. Значения, выделенные жирным шрифтом, указывают мономер. Другие значения представляют собой агрегаты и димеры. Различия в прогнозируемой и рассчитанной MW

частично обусловлены гликозилированием белка.

Момент времени	Рассчитанная MW (Da)	интерполированное значение Y	Время элюирования (Vt)	% площади
0 часов	**115158**	**5,061**	**4,438**	**100**
24 часа	**113407**	**5,055**	**4,417**	**100**
48 часов	757199	5,879	3,199	9
	253144	5,403	3,758	2
	113751	**5,056**	**4,443**	**90**
1 неделя	855333	5,932	3,156	21
	257674	5,411	3,750	4
	115312	**5,062**	**4,437**	**75**
2 неделя	870909	5,940	3,161	51
	116025	**5,065**	**4,439**	**49**

Таблица 20 - слияние фрагмента антитела p35-CH1-шарнир-CH2-CH3. Прогнозируемая молекулярная масса (Da) - 124339. Значения, выделенные жирным шрифтом, указывают мономер. Другие значения представляют собой агрегаты и димеры. Различия в прогнозируемой и рассчитанной MW частично обусловлены гликозилированием белка.

Момент времени	Рассчитанная MW (Da)	интерполированное значение Y	Время элюирования (Vt)	% площади
0 часов	**150142**	**5,177**	**4,186**	**100**
24 часа	791345	5,898	3,168	11
	145363	**5,162**	**4,181**	**89**
48 часов	842195	5,925	3,158	22
	145523	**5,163**	**4,204**	**78**
1 неделя	935179	5,971	3,123	44
	147343	**5,168**	**4,198**	**56**
2 неделя	924568	5,966	3,139	62
	143473	**5,157**	**4,231**	**38**

Таблица 21 - scIL-12. Прогнозируемая молекулярная масса (Da) - 61001. Значения, выделенные жирным шрифтом, указывают мономер. Другие значения представляют собой агрегаты и димеры. Различия в прогнозируемой и рассчитанной MW частично обусловлены гликозилированием белка.

Момент	Рассчитанная	интерполированное	Время элюирования	% площади

времени	MW (Da)	значение Y	(Vt)	
0 часов	**104159**	**5,018**	**4,535**	**100**
24 часа	**102149**	**5,009**	**4,518**	**100**
48 часов	**103206**	**5,014**	**4,539**	**100**
1 неделя	1013855	6,006	3,094	3
	105574	**5,024**	**4,525**	**97**
2 неделя	1013733	6,006	3,106	4
	102693	**5,012**	**4,561**	**96**

Затем слитый белок p35-MSA и слитый белок p40-fab тестировали на аффинность связывания друг с другом с течением времени и при 37 °C. Применяя описанную выше платформу Octet, биотинилированный p35-MSA иммобилизовали в диапазоне концентраций от 50 до 0,78 нМ с применением p40-fab в качестве загрузки в концентрации 10-20 мкг/мл. Данные по аффинности связывания в момент времени 0 часов, 4 часа, 24 часа и 47 часов указаны ниже в **Таблице 22**. Полученные результаты демонстрируют, что аффинность p35/p40 остается высокой даже через 47 часа при 37 °C.

Таблица 22 - Аффинность связывания p35-MSA/p40-fab при 37 °C

Время	KD (M)	KD ошибка	k on (1/мс)	k on ошибка	k dis (1/с)	k dis ошибка	Полный R^2
0hr	7,82E-09	4,78E-11	5,91E+04	2,15E+02	4,62E-04	2,27E-06	0,999
4ч	7,54E-09	5,34E-11	5,11E+04	1,94E+02	3,85E-04	2,30E-06	0,999
24ч	1,11E-08	6,70E-11	3,81E+04	1,32E+02	4,22E-04	2,10E-06	0,999
47ч	1,05E-08	8,68E-11	3,58E+04	1,60E+02	3,76E-04	2,61E-06	0,999

Пример 4 - Разделение активности IL-12

Терапевтический эффект IL-12, по меньшей мере частично, достигается, когда субъединица p35 и субъединица p40 способны гетеродимеризоваться с образованием IL-12p70. С этой целью была протестирована способность каждой субъединицы гетеродимеризировать с разными партнерами по слиянию. Протестированные комбинации слитых белков приведены ниже в **Таблице 23**.

Таблица 23 - Комбинации субъединиц IL-12

Номер комбинации	Описание
1	scIL-12 человека
2	p35-MSA+p40 без партнера по слиянию
3	p35-MSA+p40-Fab (анти-uPAR M37 Fab)
4	p35-MSA+p40-IgG (анти-uPAR M37 IgG)
5	p35-MSA+p40 с аминокислотной заменой E181R

6	Фрагмент антитела p35-CH1-шарнир-CH2-CH3 (пара анти-uPAR M37 KiH/p35 KiH) + p40 без партнера по слиянию
7	Фрагмент антитела p35-CH1-шарнир-CH2-CH3 (пара анти-uPAR M37 KiH/p35 KiH) + p40 с аминокислотной заменой E181R

Вышеприведенные комбинации были протестированы в клеточном анализе активности IL-12 in vitro . Вкратце, замороженные Т-клетки (культивированные с rhIL-2+CD3/CD28 в течение 9 дней до начала анализа) размораживали, высевали по 300 000 клеток на лунку и оставляли на 1 час при 37 °C. Субъединицы IL-12 добавляли к Т-клеткам в соотношении 1:1 (для конечной начальной концентрации каждой молекулы 250 нМ). Затем определяли фосфорилированные Stat4 (pStat4) и IFN-гамма. Для анализа определения pStat4, клетки и субъединицы IL-12 инкубировали в течение 45 минут при 37 °C. Для анализа определения IFN-гамма, клетки и субъединицы IL-12 инкубировали в течение 24 часов при 37 °C перед сбором супернатанта.

Каждую комбинацию тестировали на способность индуцировать фосфорилирование Stat4 в CD8+ (**ФИГ. 6А**) и CD4+ (**ФИГ. 6В**) Т-клетках. Вкратце, клетки из каждого образца фиксировали и инкубировали с антителом анти-pStat4, меченным флуорофором фикоэритрином (PE). Затем определяли флуоресценцию. Значения EC50 и кратное изменение EC50 относительно scIL-12 приведены ниже в **Таблице 24** для CD8+ Т-клеток и в **Таблице 25** для CD4+ Т-клеток.

Таблица 24 - Значения EC50 для % образования pStat4 в CD8+ Т-клетках

	scIL-12	p35-MSA+p40-Fab	p35-MSA+p40-IgG	p35 KIH+p40	p35-MSA+p40
EC50 (нМ)	0,0746	0,912	0,5714	1,419	1,060
Кратность изменения	1	12,23	7,66	19,02	14,21

Таблица 25 - Значения EC50 для % образования pStat4 в CD4+ Т-клетках

	scIL-12	p35-MSA+p40-Fab	p35-MSA+p40-IgG	p35 KIH+p40	p35-MSA+p40
EC50 (нМ)	,05115	0,7081	0,1726	1,159	0,8415
Кратность изменения	1	13,84	3,37	22,66	16,45

Каждую комбинацию также тестировали на способность индуцировать продукцию IFN-гамма в клетках (**ФИГ. 7**). Применяли систему для анализа цитокинов MSD T-Plex.

Анализ MSD представляет собой анализ на основе ELISA, при котором планшет MSD предварительно покрыт захватывающим антителом к IFN-гамма. После инкубации образца на планшете для хемилюминесцентного обнаружения применяли меченое детектирующее антитело, которое также связывает IFN-гамма. Значения EC50 и кратное изменение EC50 относительно scIL-12 приведены ниже в **Таблице 26**.

Таблица 26 - Значения EC50 для продукции IFN-гамма

	scIL-12	p35-MSA+p40-Fab	p35-MSA+p40-IgG	p35 KIH+p40	p35-MSA+p40
EC50 (нМ)	0,00515	0,5591	~0,4029	~0,4274	0,6572
Кратность изменения	1	108,54	78,23	82,99	127,61

Пример 5 - Слияния «субъединица IL-12/анти-uPAR»

Чтобы повысить терапевтическую эффективность IL-12 и одновременно уменьшить проблемы, связанные с токсичностью, субъединицы IL-12 (p35 и p40) связывали с родительскими антителами анти-uPAR, описанными выше. Слияния «субъединица IL-12 - антитело uPAR» могут доставлять субъединицы в целевую ткань или клетку, экспрессирующую uPAR (например, опухолевую ткань или клетку), тем самым гарантируя восстановление мощной активности IL-12 только в целевом сайте. С этой целью была протестирована способность каждой субъединицы антител uPAR гетеродимеризировать с разными партнерами по слиянию. Протестированные комбинации слитых белков и аффинности связывания между p35 и p40 приведены ниже в **Таблице 27**. Аффинность связывания между слитыми антителами uPAR с uPAR (uPAR-his и uPAR-Fc) также приведена ниже.

Таблица 27 - Аффинность связывания для слияний «субъединица IL-12 - антитело uPAR»

Комбинация	KD (M)	KD ошибка	kon(1/Mc)	kon ошибка	kdis(1/c)	kdis ошибка	Полный R^2
4376 (p35-M1-scFv-KiH) + 4339 (M8-Fab-p40)	6,98e-9	2,45e-10	1,95e+5	6,08e+3	1,36e-3	2,17e-5	0,934786
4379 (p35-M1-fab-KiH) + 4339 (M8-	6,84e-9	6,86e-11	8,56e+4	5,93e+2	5,85e-4	4,25e-6	0,995916

Fab-p40)							
4376 (p35-M1-scFv-KiH) + 4336 (M8-IgG-p40)	4,68e-9	8,43e-11	6,00e+4	4,58e+2	2,81e-4	4,58e-6	0,996298
4379 (p35-M1-fab-KiH) + 4336 (M8-IgG-p40)*	<1,0E-12						0,998201
4398 (p35-M1-scFv2) + 4269 (p40)	2,09e-8	2,21e-10	1,57e+4	1,22e+2	3,27e-4	2,34e-6	0,999902
4376 (p35-M1-scFv-KiH) + uPAR-his	1,49e-10	2,11e-12	2,66e+6	3,28e+4	3,96e-4	2,77e-6	0,98057
4379 (p35-M1-fab-KiH) + uPAR-his	2,29e-10	5,79e-12	3,68e+6	8,89e+4	8,45e-4	6,18e-6	0,944841
4339 (M8-Fab-p40) + uPAR-Fc	1,72e-10	1,38e-12	1,69e+6	1,06e+4	2,91e-4	1,45e-6	0,994733
4398 (p35-M1-scFv2) + uPAR-Fc	1,33e-10	1,94e-12	1,52e+6	1,48e+4	2,02e-4	2,19e-6	0,984586

*Значение аффинности не получено из-за авидности молекулы IgG.

Затем выбранные слитые белки были протестированы на моделях опухолей in vivo на мышах, чтобы продемонстрировать фармакокинетику в опухоли и сыворотке на основе PET/CT-визуализации радиоактивно меченных субъединиц p40 и p35 IL-12, нацеленных на опухоль (**ФИГ. 5A**) (**ФИГ. 5B**). Субъединицы, нацеленные на опухоль, измеряли в опухоли и крови мышей с течением времени и определяли % максимального воздействия. Нацеленная на опухоль субъединица p40 представляла собой слияние антитела анти-uPAR M37 в формате Fab с p40. Нацеленная на опухоль субъединица p35 представляла собой

слияние антитела анти-uPAR M37 в формате KiH с p35. Вкратце, мышам BALB/c опухолью CT26 вводили меченные цирконием-89 (^{89}Zr) слитые белки с молярной массой 15,5-16,9 нмоль/кг (целевой показатель: 16,4 нмоль/кг) и внутривенно (в хвостовую вену) вводили радиоактивную дозу от 182 до 192 μCi в 200 мкл. Впоследствии мышей визуализировали с помощью PET/CT через 4, 24, 48, 72 и 168 часов после инъекции. В каждый момент времени визуализации брали кровь для подсчета гамма-излучения.

Клиренс нацеленных субъединиц IL-12 из опухоли был медленнее, чем клиренс из сыворотки, что способствовало опухолеспецифической сборке.

Вышеприведенные слитые белки также тестировали на моделях опухолей мышей in vivo, чтобы продемонстрировать накопление в опухоли и печени. Три слитых белка антитела анти-uPAR применяли в качестве соединений, нацеленными на опухоль, и сравнивали с ненацеленным scIL-12 или слитым белком p35-MSA. Тремя нацеленными слитыми белками были Fab-p40), IgG-p40 и p35-KiH. Каждое соединение было радиоактивно помечено для отслеживания накопления в тканях мышей. Анализ проводили, как описано выше, с применением слитых белков, меченных ^{89}Zr. Как продемонстрировано на **ФИГ. 8A**, нацеленные соединения накапливаются в опухоли, а затем начинают рассеиваться с течением времени. Ненацеленные соединения не накапливались. **ФИГ. 8B** демонстрирует накопление в печени с течением времени, демонстрирующее прогрессирующий клиренс соединений. Нацеленные соединения выводятся медленнее, что указывает на лучшее удержание по сравнению с ненацеленными соединениями.

Затем слияния тестировали на гуманизированной мишиной модели для анализа активности in vivo последовательно вводимых субъединиц IL-12 человека. Мышей NCG с иммунодефицитом гуманизировали путем инъекции 1×10^7 PBMC человека. Через 14 дней мышам вводили PBS (носитель), scIL-12 или две дозы расщепленных молекул IL-12. Для расщепленных молекул IL-12, p35-MSA вводили с p40-Fab. scIL-12 вводили в дозе 0,24 мг/кг, тогда как расщепленные молекулы IL-12 вводили в дозе 0,6 мг/кг каждая (в 2,5 раза превышает дозу scIL-12) и 6 мг/кг каждая (в 25 раз превышает дозу scIL-12). Интервал между инъекциями составлял менее чем 5 минут. Затем у мышей брали образцы сыворотки в различные моменты времени для фармакокинетического и фармакодинамического анализа сыворотки (концентрация IFN-гамма в сыворотке). Полученные данные демонстрируют, что расщепленные слитые молекулы функционируют in vivo. Полученные данные также демонстрируют схожий фармакодинамический ответ между одноцепочечными и расщепленными молекулами, так что в следующих экспериментах можно будет различать активность этих способов лечения в сыворотке и опухоли (**ФИГ. 9**). Примечательно, что доза, в 2,5 раза превышающая дозу scIL-12, приводит к меньшей продукции IFN-гамма, что указывает на снижение нецелевой токсичности при применении слияний расщепленных молекул IL-12. Эти данные дополнительно демонстрируют способность расщепленных молекул IL-12 собираться in vivo.

Были протестированы дополнительные слитые белки, а также возможность двойного нацеливания (т.е. слияние антитело-p35 и слияние антитело-p40, в которых каждое антитело связывает разные эпитопы на одном и том же целевом белке). Субъединицы IL-12 были прикреплены к вариантам антител M1 и M8, которые связываются с uPAR человека. В этом анализе комплекс IL-12p70 создается путем последовательного добавления с последующей промывкой различных компонентов к uPAR-положительным клеткам HEK человека. Затем клетки HEK, экспрессирующие uPAR, инкубировали с CD8+ Т-клетками и определяли активность pSTAT4 на указанных Т-клетках. Антитело M37 применяли в качестве ненацеленного контроля, поскольку это антитело связывается с uPAR мыши и не вступает в перекрестную реакцию с uPAR человека. scIL-12 применяли в качестве ненацеленного отдельного соединения. Слияние scIL12-M8 Fab применяли в качестве нацеленного отдельного соединения. M37-p40-Fab и M37-p35-KiH применяли в комбинации в качестве ненацеленного отрицательного контроля. M8-p40-Fab и M37-p35-KiH применяли в комбинации как одиночную нацеленную комбинацию (т.е. только одна из субъединиц IL-12 нацелена на uPAR). M8-p40-Fab и M1-p35-KiH-Fab применяли в комбинации как двойную нацеленную комбинацию (т.е. обе субъединицы IL-12, p35 и p40, нацелены на uPAR). Вкратце, анализ проводили по следующему протоколу:

1) 50 000 клеток HEK, экспрессирующих uPAR, высевали на лунку в 96-луночные планшеты с U-образным дном и низким уровнем прикрепления/связывания (Corning Product # 4520).

2) Планшеты центрифугировали и клетки ресуспендировали с 100 мкл титрования первой молекулы.

3) Клетки и первую молекулу инкубировали в течение 30 минут при 4 °C.

4) Клетки центрифугировали и дважды промывали.

5) Клетки ресуспендировали с 100 мкл титрования первой молекулы.

6) Клетки и молекулы инкубировали в течение 30 минут при 4 °C.

7) Клетки центрифугировали и трижды промывали.

8) Ранее замороженные Т-клетки человека («отдохнувшие» в течение 1 часа при 37°C) добавляли в лунки по 100 000 клеток на лунку.

9) Планшеты помещали в инкубатор на 1 час (37 °C).

10) Планшеты центрифугировали, промывали и начинали последующие протоколы окрашивания.

После этапа инкубации Т-клеток определяли активность pSTAT4 на указанных Т-клетках.

Ненацеленные субъединицы или ненацеленная scIL-12 продемонстрировали сниженную активность по сравнению с нацеленными субъединицами. Одиночная нацеленная комбинация продемонстрировала повышенную активность по сравнению со всеми ненацеленными подходами. Наконец, комбинации с двумя нацеленными субъединицами обладают улучшенной активностью по сравнению с парой, содержащей

только одну нацеленную субъединицу, и восстанавливают большую часть активности по сравнению с нацеленной scIL-12, имея при этом сниженную системную токсичность (**ФИГ. 10**).

Вышеприведенные слитые белки были сгенерированы с применением родительских антител анти-uPAR. Были также сгенерированы аналогичные слитые белки с гуманизированными антителами анти-uPAR. Аминокислотные последовательности для слияний M1 приведены ниже в **Таблице 28**. Аминокислотные последовательности для слияний M8 приведены ниже в **Таблице 29**. Аминокислотные последовательности для слияний M43 приведены ниже в **Таблице 30**.

Таблица 28 - Аминокислотные последовательности слияний «гуманизированное антитело M1- субъединица IL-12»

Описание	**Последовательность**	**Примечания**
hM1-IgG1(H1)-scIL12	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIKDE YINWVKQRPGKGLEWIGWIDPENGDTEYASK FQGRVTITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVYY CTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS **C**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGD AGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTD ILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEV MVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTF CVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNA	гуманизированное M1, p40-p35 как scIL-12

	SISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGSGGGG SGGRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSN MLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTV EACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRK TSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETV PQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTID RVMSYLNAS (SEQ ID NO: 165)	
hM1-Fab(H1)-scIL12	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIKDE YINWVKQRPGKGLEWIGWIDPENGDTEYASK FQGRVTITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVYY CTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CGGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDWYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLL LHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAK NYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ GVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDS ACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFI RDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT WSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTD KTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWA SVPCSGGSGGGGSGGRNLPVATPDPGMFPCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEI DHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRE TSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKM YQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVI DELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKL CILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGSGGHHH HHHGGSGLNDIFEAQKIEWHE (SEQ ID NO: 166)	гуманизированное M1, p40-p35, 6his avi
hM1-IgG1(H3)-	EVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKD	гуманизированное

scIL12	EYINWVKQRPGQGLEWIGWIDPENGDTEYAS KFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVY YCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KS**C**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSIWELKKDVY VVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWT LDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHK GGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPK NKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHK LKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSR QVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKS KREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGSGGGGSGGRNLPV ATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQ TLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLEL TKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMAL CLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQI FLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLE EPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLN AS (SEQ ID NO: 167)	M1, p40-p35
hM1-Fab(H3)-scIL12	EVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKD EYINWVKQRPGQGLEWIGWIDPENGDTEYAS KFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVY YCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSASTKGP	гуманизированное M1, p40-p35, 6his avi

	SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCGGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDWYP DAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSL LLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCE AKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQE DSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSS FFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYP DTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVF TDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSE WASVPCSGGSGGGGSGGRNLPVATPDPGMFP CLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSR ETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLK MYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAV IDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIK LCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGSGGHH HHHHGGSGLNDIFEAQKIEWHE (SEQ ID NO: 168)	
hM1-IgG1(H1)-p40	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIKDE YINWVKQRPGKGLEWIGWIDPENGDTEYASK FQGRVTITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVYY CTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL	гуманизированное M1, p40 C177S

	YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGGSGGGGSIWELKKDVYV VELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKG GEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKN KTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEY EYSVECQEDSASPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQ VEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSK REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDR YYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO: 169)	
hM1-Fab(H1)-p40	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIKDE YINWVKQRPGKGLEWIGWIDPENGDTEYASK FQGRVTITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVYY CTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CGGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDWYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLL LHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAK NYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ GVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDS ASPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFI RDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT WSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTD KTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWA SVPCSGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHH H (SEQ ID NO: 170)	гуманизированное M1, p40 C177S
hM1-ScFv(vH1-vL4)-p40	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIKDE YINWVKQRPGKGLEWIGWIDPENGDTEYASK FQGRVTITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVYY CTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSGG	гуманизированное M1, p40 C177S

	GGSGGGGSQIVLTQSPATLSASPGERVTMSCS ASSSVSYMHWYQQKPGTSPRRWLYDTSKLA SGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYYC QQWSSNPPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGD AGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTD ILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECQEDSASPAAEESLPIEV MVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFS VQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNAS ISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGSGLNDIF EAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 171)	
hM1-ScFv(vL4-vH1)-p40	QIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVSYM HWYQQKPGTSPRRWLYDTSKLASGVPARFS GSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYYCQQWSSNP PYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIKDEYIN WVKQRPGKGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQ GRVTITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVYYCT GGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTC DTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWS TDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWW LTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS AERVRGDNKEYEYSVECQEDSASPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSL TFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRK NASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGSGL NDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 172)	гуманизированное M1, p40 C177S

hM1-Fab(H1)-Fc (выступ)	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIKDEYINWVKQRPGKGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGRVTITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 173)	гуманизированное M1, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая
hM1-ScFv(vH1-vL4)-Fc(выступ)	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIKDEYINWVKQRPGKGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGRVTITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSQIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPRRWLYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYYCQQWSSNPPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 174)	гуманизированное M1, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая
hM1-ScFv(vL4-vH1)-Fc (выступ)	QIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPRRWLYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYYCQQWSSNP	гуманизированное M1, выступ T366W, IgG1 человека,

	PYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIKDEYIN WVKQRPGKGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQ GRVTITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVYYCT GGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 175)	LALA-PG, эффекторная функция нулевая
p35-hM1-ScFv(vH1-vL4)2	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEA CLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCLASRKTS FMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTINR VMSYLNASGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVK KPGATVKISCTASGFNIKDEYINWVKQRPGK GLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGRVTITADTS TDTAYLELSSLRSEDTAVYYCTGGNYVGWFP YWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIV LTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVSYMHW YQQKPGTSPRRWLYDTSKLASGVPARFSGSG SGTDYTLTISSLEPEDFATYYCQQWSSNPPYT FGQGTKLEIKGGSGGGGSGGGSGGGGSGGG GSGGGSGGEVQLVQSGAEVKKPGATVKISCT ASGFNIKDEYINWVKQRPGKGLEWIGWIDPE NGDTEYASKFQGRVTITADTSTDTAYLELSSL RSEDTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPATLSAS PGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPRR WLYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSL	гуманизированное M1, p35 S27D, C74K, D188N

	EPEDFATYYCQQWSSNPPYTFGQGTKLEIKG GSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 176)	
p35-hM1-ScFv(vL4-vH1)2	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEA CLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCLASRKTS FMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTINR VMSYLNASGGGGSGGGGSQIVLTQSPATLSA SPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPR RWLYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISS LEPEDFATYYCQQWSSNPPYTFGQGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPG ATVKISCTASGFNIKDEYINWVKQRPGKGLE WIGWIDPENGDTEYASKFQGRVTITADTSTDT AYLELSSLRSEDTAVYYCTGGNYVGWFPYW GQGTLVTVSSGGSGGGGSGGGSGGGGSGGG GSGGGSGGQIVLTQSPATLSASPGERVTMSCS ASSSVSYMHWYQQKPGTSPRRWLYDTSKLA SGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYYC QQWSSNPPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSG GGGSEVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGF NIKDEYINWVKQRPGKGLEWIGWIDPENGDT EYASKFQGRVTITADTSTDTAYLELSSLRSED TAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSG GSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 177)	гуманизированное M1, p35 S27D, C74K, D188N
hM1-IgG1(H3)-p40	EVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKD EYINWVKQRPGQGLEWIGWIDPENGDTEYAS KFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVY YCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP	гуманизированное M1, p40 C177S

	KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSIWELKKDVY VVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWT LDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHK GGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPK NKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSASPAAEESLPIEVMVDAVHK LKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSR QVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKS KREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO: 178)	
hM1-Fab(H3)-p40	EVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKD EYINWVKQRPGQGLEWIGWIDPENGDTEYAS KFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVY YCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCGGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDWYP DAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSL LLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCE AKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQE DSASPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSF FIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYP DTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVF TDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSE	гуманизированное M1, p40 C177S

	WASVPCSGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHH HHH (SEQ ID NO: 179)	
hM1-ScFv(vH3-vL1)-p40	EVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKD EYINWVKQRPGQGLEWIGWIDPENGDTEYAS KFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVY YCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSC SASSSVSYMHWYQQKPGTSPRRWIYDTSKLA SGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQWSSNPPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGD AGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTD ILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECQEDSASPAAEESLPIEV MVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFS VQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNAS ISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGSGLNDIF EAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 180)	гуманизированное M1, p40 C177S
hM1-ScFv(vL1-vH3)-p40	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMH WYQQKPGTSPRRWIYDTSKLASGVPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPY TFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQ QSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKDEYINW VKQRPGQGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGR ATITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVYYCTGG NYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGD AGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTD ILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECQEDSASPAAEESLPIEV	гуманизированное M1, p40 C177S

	MVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFS VQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNAS ISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGSGLNDIF EAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 181)	
hM1-Fab(H3)-Fc (выступ)	EVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKD EYINWVKQRPGQGLEWIGWIDPENGDTEYAS KFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVY YCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 182)	гуманизированное M1, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая
hM1-ScFv(vL1-vH3)-Fc (выступ)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMH WYQQKPGTSPRRWIYDTSKLASGVPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPY TFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQ QSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKDEYINW VKQRPGQGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGR ATITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVYYCTGG NYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSE PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS	гуманизированное M1, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая

	FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 183)	
p35-hM1-ScFv(vL1-vH3)2	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEA CLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCLASRKTS FMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTINR VMSYLNASGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLS PGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPRR WIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLE PEDFAVYYCQQWSSNPPYTFGQGTKLEIKGG GGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGAEVKKPGAT VKLSCTASGFNIKDEYINWVKQRPGQGLEWI GWIDPENGDTEYASKFQGRATITADTSTDTA YLELSSLRSEDTAVYYCTGGNYVGWFPYWG QGTLVTVSSGGSGGGGSGGGSGGGGSGGGG SGGGSGGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSAS SSVSYMHWYQQKPGTSPRRWIYDTSKLASG VPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QWSSNPPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGG GGSEVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFN IKDEYINWVKQRPGQGLEWIGWIDPENGDTE YASKFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRSEDT AVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGS GLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 184)	гуманизированное M1, p35 S27D, C74K, D188N
hM1-ScFv(vH3-vL4)-p40	EVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKD EYINWVKQRPGQGLEWIGWIDPENGDTEYAS KFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVY YCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSQIVLTQSPATLSASPGERVTMSC SASSSVSYMHWYQQKPGTSPRRWLYDTSKL ASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATY YCQQWSSNPPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGG	гуманизированное M1, p40 C177S

	SIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCD TPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFG DAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWST DILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWL TTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSA ERVRGDNKEYEYSVECQEDSASPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNL QLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKN ASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGSGLN DIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 185)	
hM1-ScFv(vL4-vH3)-p40	QIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVSYM HWYQQKPGTSPRRWLYDTSKLASGVPARFS GSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYYCQQWSSNP PYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKDEYIN WVKQRPGQGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQ GRATITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVYYCT GGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTC DTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWS TDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWW LTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS AERVRGDNKEYEYSVECQEDSASPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSL TFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRK NASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGSGL NDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 186)	гуманизированное M1, p40 C177S
hM1-ScFv(vH3-vL4)-Fc(выступ)	EVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKD EYINWVKQRPGQGLEWIGWIDPENGDTEYAS KFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVY	гуманизированное M1, выступ T366W, IgG1 человека,

	YCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSQIVLTQSPATLSASPGERVTMSC SASSSVSYMHWYQQKPGTSPRRWLYDTSKL ASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATY YCQQWSSNPPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGG SEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 187)	LALA-PG, эффекторная функция нулевая
hM1-ScFv(vL4-vH3)-Fc (выступ)	QIVLTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVSYM HWYQQKPGTSPRRWLYDTSKLASGVPARFS GSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYYCQQWSSNP PYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKDEYIN WVKQRPGQGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQ GRATITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVYYCT GGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 188)	гуманизированное M1, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая
p35-hM1-ScFv(vH3-vL4)2	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEA CLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCLASRKTS FMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTINR	гуманизированное M1, p35 S27D, C74K, D188N

	VMSYLNASGGGGSGGGGSEVQLQQSGAEVK KPGATVKLSCTASGFNIKDEYINWVKQRPGQ GLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGRATITADTS TDTAYLELSSLRSEDTAVYYCTGGNYVGWFP YWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIV LTQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVSYMHW YQQKPGTSPRRWLYDTSKLASGVPARFSGSG SGTDYTLTISSLEPEDFATYYCQQWSSNPPYT FGQGTKLEIKGGSGGGGSGGGSGGGGSGGG GSGGGSGGEVQLQQSGAEVKKPGATVKLSC TASGFNIKDEYINWVKQRPGQGLEWIGWIDP ENGDTEYASKFQGRATITADTSTDTAYLELSS LRSEDTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPATLSAS PGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPRR WLYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSL EPEDFATYYCQQWSSNPPYTFGQGTKLEIKG GSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 189)	
p35-hM1-ScFv(vL4-vH3)2	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEA CLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCLASRKTS FMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTINR VMSYLNASGGGGSGGGGSQIVLTQSPATLSA SPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPR RWLYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISS LEPEDFATYYCQQWSSNPPYTFGQGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGAEVKKPG ATVKLSCTASGFNIKDEYINWVKQRPGQGLE WIGWIDPENGDTEYASKFQGRATITADTSTDT AYLELSSLRSEDTAVYYCTGGNYVGWFPYW GQGTLVTVSSGGSGGGGSGGGSGGGGSGGG GSGGGSGGQIVLTQSPATLSASPGERVTMSCS	гуманизированное M1, p35 S27D, C74K, D188N

	ASSSVSYMHWYQQKPGTSPRRWLYDTSKLA SGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYYC QQWSSNPPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSG GGGSEVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGF NIKDEYINWVKQRPGQGLEWIGWIDPENGDT EYASKFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRSED TAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSG GSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 190)	
P35-M1-ScFv (H3L1)2	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEA CLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCLASRKTS FMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTINR VMSYLNASGGGGSGGGGSEVQLQQSGAEVK KPGATVKLSCTASGFNIKDEYINWVKQRPGQ GLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGRATITADTS TDTAYLELSSLRSEDTAVYYCTGGNYVGWFP YWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIV LTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWY QQKPGTSPRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPYTFG QGTKLEIKGGSGGGGSGGGSGGGGSGGGGS GGGSGGEVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTA SGFNIKDEYINWVKQRPGQGLEWIGWIDPEN GDTEYASKFQGRATITADTSTDTAYLELSSLR SEDTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPRRWI YDTSKLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCQQWSSNPPYTFGQGTKLEIKGGSG LNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 191)	гуманизированное M1, p35 S27D, C74K, D188N
M1-ScFv	EVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKD	гуманизированное

(H3L1)-Fc (выступ)	EYINWVKQRPGQGLEWIGWIDPENGDTEYAS KFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVY YCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSC SASSSVSYMHWYQQKPGTSPRRWIYDTSKLA SGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQWSSNPPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSE PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 192)	M1, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая

Таблица 29 - Аминокислотные последовательности слияний «гуманизированное антитело M8 - субъединица IL-12»

Описание	**Последовательность**	**Примечания**
hM8-IgG1(H3)-p40	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTD YGMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPT YAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKS**C**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG**K**GGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFG	гуманизированное M8 LALA, p40 C177S

	DAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWS TDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCW WLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAAT LSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSASPAAEE SLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPH SYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO: 193)	
hM8-Fab(H3)-p40	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTD YGMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPT YAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCGGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDW YPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVL SHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSS RGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEY SVECQEDSASPAAEESLPIEVMVDAVHKLK YENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQ VEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKS KREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGSGLNDIFEAQKIE WHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 194)	гуманизированное M8, p40 C177S
hM8-Fab(h3)-Fc (Выступ)	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTD YGMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPT YAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE	гуманизированное M8, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая

	PKSCGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 195)	
hM8-ScFv(vH3-vL2B2)-p40	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTD YGMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPT YAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDTVTIT CRTSENIYSNLAWYQQKPGKSPQLLVYAAT NLADGVPSRFSGSGSGTQYTLKISSLQPEDF ATYYCQHFWGTPWTFGGGTKVEIKGGGGS GGGGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMV VLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTI QVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKK EDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSG RFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAS PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT WSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFT DKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSE WASVPCSGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHH HHHH (SEQ ID NO: 196)	гуманизированное M8, p40 C177S
hM8-ScFv(vL2B2-vH3)-p40	DIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSN LAWYQQKPGKSPQLLVYAATNLADGVPSRF SGSGSGTQYTLKISSLQPEDFATYYCQHFWG TPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQ IQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTDY GMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPTY	гуманизированное M8, p40 C177S

	AEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDT ATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGG GGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVL TCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKED GIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRF TCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSASPA AEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDII KPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWS TPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASV PCSGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 197)	
hM8-ScFv(vH3-vL2B2)-Fc (выступ)	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTD YGMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPT YAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDTVTIT CRTSENIYSNLAWYQQKPGKSPQLLVYAAT NLADGVPSRFSGSGSGTQYTLKISSLQPEDF ATYYCQHFWGTPWTFGGGTKVEIKGGGGS GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 198)	гуманизированное M8, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая
hM8-ScFv(vL2B2-vH3)-Fc (выступ)	DIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSN LAWYQQKPGKSPQLLVYAATNLADGVPSRF SGSGSGTQYTLKISSLQPEDFATYYCQHFWG TPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQ	гуманизированное M8, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG,

	IQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTDY GMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPTY AEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDT ATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGG GGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 199)	эффекторная функция нулевая
p35-hM8-ScFv(vH3-vL2B2)	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVE ACLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCLASRK TSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKL LMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSE TVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAV TINRVMSYLNASGGGGSGGGGSQIQLVQSG SELKKPGASVKISCKASGTTFTDYGMNWVK QSPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEDFKGR FVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYFCAH YSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIY SNLAWYQQKPGKSPQLLVYAATNLADGVP SRFSGSGSGTQYTLKISSLQPEDFATYYCQHF WGTPWTFGGGTKVEIKGGSGGGGSGGGSG GGGSGGGGSGGGSGGQIQLVQSGSELKKPG ASVKISCKASGTTFTDYGMNWVKQSPGKGL KWMGWINTNTGEPTYAEDFKGRFVFSLDTS VSTAYLQISSLKAEDTATYFCAHYSFDYWG QGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQ QKPGKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGS	гуманизированное M8, p35 S27D, C74K, D188N

	GTQYTLKISSLQPEDFATYYCQHFWGTPWT FGGGTKVEIKGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGS HHHHHH (SEQ ID NO: 200)	
p35-hM8-ScFv(vL2B2-vH3)	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVE ACLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCLASRK TSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKL LMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSE TVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAV TINRVMSYLNASGGGGSGGGGSDIQMTQSP SSLSASVGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQQK PGKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQ YTLKISSLQPEDFATYYCQHFWGTPWTFGG GTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQIQLVQSG SELKKPGASVKISCKASGTTFTDYGMNWVK QSPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEDFKGR FVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYFCAH YSFDYWGQGTLLTVSSGGSGGGGSGGGSGG GGSGGGGSGGGSGGDIQMTQSPSSLSASVG DTVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKSPQLL VYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYTLKISSL QPEDFATYYCQHFWGTPWTFGGGTKVEIKG GGGSGGGGSGGGGSQIQLVQSGSELKKPGA SVKISCKASGTTFTDYGMNWVKQSPGKGLK WMGWINTNTGEPTYAEDFKGRFVFSLDTSV STAYLQISSLKAEDTATYFCAHYSFDYWGQ GTLLTVSSGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHH HHHH (SEQ ID NO: 201)	гуманизированное M8, p35 S27D, C74K, D188N
hM8-ScFv(vH3-vL2B5)-p40	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTD YGMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPT YAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRTSENIYSNLAWYQQKPGKSPQLLVYAAT NLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFG	гуманизированное M8, p40 C177S

	TYYCQHFWGTPWTFGGGTKVEIKGGGGSG GGGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVV LTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQ VKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKE DGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSG RFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAS PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT WSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFT DKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSE WASVPCSGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHH HHHH (SEQ ID NO: 202)	
hM8-ScFv(vL2B5-vH3)-p40	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSN LAWYQQKPGKSPQLLVYAATNLADGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYYCQHFWG TPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQ IQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTDY GMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPTY AEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDT ATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGG GGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVL TCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKED GIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRF TCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSASPA AEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDII KPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWS TPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASV PCSGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 203)	гуманизированное M8, p40 C177S
hM8-ScFv(vH3-vL2B5)-Fc	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTD YGMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPT	гуманизированное M8, выступ T366W,

(выступ)	YAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRTSENIYSNLAWYQQKPGKSPQLLVYAAT NLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFG TYYCQHFWGTPWTFGGGTKVEIKGGGGSG GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 204)	IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая
hM8-ScFv(vL2B5-vH3)-Fc (выступ)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSN LAWYQQKPGKSPQLLVYAATNLADGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYYCQHFWG TPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQ IQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTDY GMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPTY AEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDT ATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGG GGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 205)	гуманизированное M8, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая
p35-hM8-ScFv(vH3-vL2B5)	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVE ACLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCLASRK	6гуманизированный M8, p35 S27D, C74K, D188N

	TSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKL LMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSE TVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAV TINRVMSYLNASGGGGSGGGGSQIQLVQSG SELKKPGASVKISCKASGTTFTDYGMNWVK QSPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEDFKGR FVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYFCAH YSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIY SNLAWYQQKPGKSPQLLVYAATNLADGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYYCQHF WGTPWTFGGGTKVEIKGGSGGGGSGGGSG GGGSGGGGSGGGSGGQIQLVQSGSELKKPG ASVKISCKASGTTFTDYGMNWVKQSPGKGL KWMGWINTNTGEPTYAEDFKGRFVFSLDTS VSTAYLQISSLKAEDTATYFCAHYSFDYWG QGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSNLAWYQ QKPGKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFGTYYCQHFWGTPWTF GGGTKVEIKGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSH HHHHH (SEQ ID NO: 206)	
p35-hM8-ScFv(vL2B5-vH3)	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVE ACLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCLASRK TSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKL LMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSE TVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAV TINRVMSYLNASGGGGSGGGGSDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCRTSENIYSNLAWYQQK PGKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFGTYYCQHFWGTPWTFGG GTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQIQLVQSG SELKKPGASVKISCKASGTTFTDYGMNWVK QSPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEDFKGR	гуманизированное M8, p35 S27D, C74K, D188N

	FVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYFCAH YSFDYWGQGTLLTVSSGGSGGGGSGGGSGG GGSGGGGSGGGSGGDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKSPQLL VYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFGTYYCQHFWGTPWTFGGGTKVEIKG GGGSGGGGSGGGGSQIQLVQSGSELKKPGA SVKISCKASGTTFTDYGMNWVKQSPGKGLK WMGWINTNTGEPTYAEDFKGRFVFSLDTSV STAYLQISSLKAEDTATYFCAHYSFDYWGQ GTLLTVSSGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHH HHHH (SEQ ID NO: 207)	
hM8-ScFv(vH3-vL2B10)-p40	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTD YGMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPT YAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDTVTIT CRTSENIYSNLAWYQQKPGKSPQLLVYAAT NLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFG TYYCQHFWGTPWTFGGGTKVEIKGGGGSG GGGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVV LTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQ VKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKE DGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSG RFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAS PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT WSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFT DKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSE WASVPCSGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHH HHHH (SEQ ID NO: 208)	гуманизированное M8, p40 C177S
hM8-ScFv(vL2B10-vH3)-p40	DIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSN LAWYQQKPGKSPQLLVYAATNLADGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYYCQHFWG	гуманизированное M8, p40 C177S

	TPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQ IQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTDY GMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPTY AEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDT ATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGG GGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVL TCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKED GIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRF TCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSASPA AEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDII KPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWS TPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASV PCSGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 209)	
hM8-ScFv(vH3-vL2B10)-Fc (выступ)	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTD YGMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPT YAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDTVTIT CRTSENIYSNLAWYQQKPGKSPQLLVYAAT NLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFG TYYCQHFWGTPWTFGGGTKVEIKGGGGSG GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 210)	гуманизированное M8, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая
hM8-	DIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSN	гуманизированное

ScFv(vL2B10-vH3)-Fc (выступ)	LAWYQQKPGKSPQLLVYAATNLADGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYYCQHFWG TPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQ IQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTDY GMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPTY AEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDT ATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGG GGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 211)	M8, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая
p35-hM8-ScFv(vH3-vL2B10	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVE ACLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCLASRK TSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKL LMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSE TVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAV TINRVMSYLNASGGGGSGGGGSQIQLVQSG SELKKPGASVKISCKASGTTFTDYGMNWVK QSPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEDFKGR FVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYFCAH YSFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIY SNLAWYQQKPGKSPQLLVYAATNLADGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYYCQHF WGTPWTFGGGTKVEIKGGSGGGGSGGGSG GGGSGGGGSGGGSGGQIQLVQSGSELKKPG ASVKISCKASGTTFTDYGMNWVKQSPGKGL KWMGWINTNTGEPTYAEDFKGRFVFSLDTS VSTAYLQISSLKAEDTATYFCAHYSFDYWG	гуманизированное M8, p35 S27D, C74K, D188N

	QGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQ QKPGKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFGTYYCQHFWGTPWTF GGGTKVEIKGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSH HHHHH (SEQ ID NO: 212)	
p35-hM8-ScFv(vL2B10-vH3)	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVE ACLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCLASRK TSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKL LMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSE TVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAV TINRVMSYLNASGGGGSGGGGSDIQMTQSP SSLSASVGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQQK PGKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFGTYYCQHFWGTPWTFGG GTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQIQLVQSG SELKKPGASVKISCKASGTTFTDYGMNWVK QSPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEDFKGR FVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYFCAH YSFDYWGQGTLLTVSSGGSGGGGSGGGSGG GGSGGGGSGGGSGGDIQMTQSPSSLSASVG DTVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKSPQLL VYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFGTYYCQHFWGTPWTFGGGTKVEIKG GGGSGGGGSGGGGSQIQLVQSGSELKKPGA SVKISCKASGTTFTDYGMNWVKQSPGKGLK WMGWINTNTGEPTYAEDFKGRFVFSLDTSV STAYLQISSLKAEDTATYFCAHYSFDYWGQ GTLLTVSSGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHH HHHH (SEQ ID NO: 213)	гуманизированное M8, p35 S27D, C74K, D188N
hM8-IgG1(H3)-scIL12	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTD YGMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPT YAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSASTKGP	гуманизированное M8 LALA, p40-p35

	SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKS**C**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG**K**GGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFG DAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWS TDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCW WLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAAT LSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEE SLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPH SYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSA TVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPC SGGSGGGGSGGRNLPVATPDPGMFPCLHHS QNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHE DITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQ VEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDE LMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCI LLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO: 214)	
hM8-Fab(H3)-scIL12	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTD YGMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPT YAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV	гуманизированное M8, p40-p35

	VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKS**C**GGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDW YPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVL SHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSS RGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEY SVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLK YENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQ VEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKS KREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCSGGSGGGGSGGRNLP VATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKAR QTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPL ELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFM MALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMD PKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQ KSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDR VMSYLNASGGSGGHHHHHHGGSGLNDIFEA QKIEWHE (SEQ ID NO: 215)	

Таблица 30 - Аминокислотные последовательности слияний «гуманизированное антитело M43 - субъединица IL-12»

№	Описание	Последовательность	Примечания
1	hM43-IgG1(H1)-p40	QVQLVQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFT SYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYN EKFKGKVTLTTDKSTRTAYMELRSLTSEDTA VYYCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKS**C**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK	гуманизированное M43, p40 C177S

		GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSIWELK KDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDG ITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQY TCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIST DLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVECQEDSASPAAEESLPIEVMV DAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQ VQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASIS VRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO: 216)	
2	hM43-Fab(H1)-p40	QVQLVQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFT SYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYN EKFKGKVTLTTDKSTRTAYMELRSLTSEDTA VYYCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCGGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDW YPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRC EAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSS DPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEC QEDSASPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYT SSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWE YPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCSGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHH HHHH (SEQ ID NO: 217)	гуманизированное M43, p40 C177S
3	hM43-ScFv(vH1-	QVQLVQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFT SYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYN	гуманизированное M43, p40 C177S

	vL4)-p40	EKFKGKVTLTTDKSTRTAYMELRSLTSEDTA VYYCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSGG GGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPATLSASPGER VTMTCSASSSVSSRYLHWYQQKSGASPRLWI YGTSNLASGVPARFSGSGPGTSYTLTISSVEPE DAATYYCQQYHSDPLTFGQGTKLELKGGGG SGGGGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMV VLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQ VKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKE DGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGR FTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSASPAA EESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKP DPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPH SYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS GGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 218)	
4	hM43-ScFv(vL4-vH1)-p40	QIVLTQSPATLSASPGERVTMTCSASSSVSSR YLHWYQQKSGASPRLWIYGTSNLASGVPARF SGSGPGTSYTLTISSVEPEDAATYYCQQYHSD PLTFGQGTKLELKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFTSY GISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYNEK FKGKVTLTTDKSTRTAYMELRSLTSEDTAVY YCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSGGGGS GGGGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMV VLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQ VKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKE DGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGR FTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSASPAA EESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKP DPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPH SYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT	гуманизированное M43, p40 C177S

		VICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS GGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 219)	
5	hM43-Fab(H1)-Fc (выступ)	QVQLVQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFT SYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYN EKFKGKVTLTTDKSTRTAYMELRSLTSEDTA VYYCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 220)	гуманизированное M43, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая
6	hM43-ScFv(vH1-vL4)-Fc(выступ)	QVQLVQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFT SYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYN EKFKGKVTLTTDKSTRTAYMELRSLTSEDTA VYYCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSGG GGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPATLSASPGER VTMTCSASSSVSSRYLHWYQQKSGASPRLWI YGTSNLASGVPARFSGSGPGTSYTLTISSVEPE DAATYYCQQYHSDPLTFGQGTKLELKGGGG SGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:	гуманизированное M43, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая

		221)	
7	hM43-ScFv(vL4-vH1)-Fc (выступ)	QIVLTQSPATLSASPGERVTMTCSASSSVSSR YLHWYQQKSGASPRLWIYGTSNLASGVPARF SGSGPGTSYTLTISSVEPEDAATYYCQQYHSD PLTFGQGTKLELKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFTSY GISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYNEK FKGKVTLTTDKSTRTAYMELRSLTSEDTAVY YCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSGGGGS GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 222)	гуманизированное M43, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая
8	p35-hM43-ScFv(vH1-vL4)2	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEA CLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCLASRKTS FMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTINR VMSYLNASGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVA KPGASVNLNCKASGYTFTSYGISWVRQRTGQ GLEWIGEIYPRSGNTYYNEKFKGKVTLTTDK STRTAYMELRSLTSEDTAVYYCAGKDYGSTY ADYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQ IVLTQSPATLSASPGERVTMTCSASSSVSSRYL HWYQQKSGASPRLWIYGTSNLASGVPARFSG SGPGTSYTLTISSVEPEDAATYYCQQYHSDPL TFGQGTKLELKGGSGGGGSGGGSGGGGSGG GGSGGGSGGQVQLVQSGAEVAKPGASVNLN CKASGYTFTSYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYP	гуманизированное M43, p35 S27D, C74K, D188N

		RSGNTYYNEKFKGKVTLTTDKSTRTAYMEL RSLTSEDTAVYYCAGKDYGSTYADYWGQGT TLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAT LSASPGERVTMTCSASSSVSSRYLHWYQQKS GASPRLWIYGTSNLASGVPARFSGSGPGTSYT LTISSVEPEDAATYYCQQYHSDPLTFGQGTKL ELKGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 223)	
9	p35-hM43-ScFv(vL4-vH1)2	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEA CLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCLASRKTS FMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTINR VMSYLNASGGGGSGGGGSQIVLTQSPATLSA SPGERVTMTCSASSSVSSRYLHWYQQKSGAS PRLWIYGTSNLASGVPARFSGSGPGTSYTLTIS SVEPEDAATYYCQQYHSDPLTFGQGTKLELK GGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVAKPG ASVNLNCKASGYTFTSYGISWVRQRTGQGLE WIGEIYPRSGNTYYNEKFKGKVTLTTDKSTR TAYMELRSLTSEDTAVYYCAGKDYGSTYAD YWGQGTTLTVSSGGSGGGGSGGGSGGGGSG GGGSGGGSGGQIVLTQSPATLSASPGERVTM TCSASSSVSSRYLHWYQQKSGASPRLWIYGT SNLASGVPARFSGSGPGTSYTLTISSVEPEDA ATYYCQQYHSDPLTFGQGTKLELKGGGGSG GGGSGGGGSQVQLVQSGAEVAKPGASVNLN CKASGYTFTSYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYP RSGNTYYNEKFKGKVTLTTDKSTRTAYMEL RSLTSEDTAVYYCAGKDYGSTYADYWGQGT TLTVSSGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHH HH (SEQ ID NO: 224)	гуманизированное M43, p35 S27D, C74K, D188N
10	hM43-IgG1(H1)-	QVQLVQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFT SYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYN	гуманизированное M43 LALA, p40-

	scIL12	EKFKGKVTLTTDKSTRTAYMELRSLTSEDTA VYYCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKS**C**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSIWELK KDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDG ITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQY TCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIST DLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMV DAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQ VQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASIS VRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGSGGGGSG GRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEA CLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTS FMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDR VMSYLNAS (SEQ ID NO: 225)	p35
11	hM43-Fab(H1)-scIL12	QVQLVQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFT SYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYN EKFKGKVTLTTDKSTRTAYMELRSLTSEDTA VYYCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE	гуманизированное M43, p40-p35

		PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKS**C**GGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDW YPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRC EAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSS DPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEC QEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYT SSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWE YPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCSGGSGGGGSGGRNLPVATPDPGM FPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCT SEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDL KMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLA VIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGSGGH HHHHHGGSGLNDIFEAQKIEWHE (SEQ ID NO: 226)	
12	hM43- IgG1(H4)- p40	QVQLQQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFT SYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYN EKFKGKATLTADKSTRTAYMELRSLTSEDTA VYFCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKS**C**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA	гуманизированное M43, p40 C177S

		LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSIWELK KDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDG ITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQY TCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIST DLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVECQEDSASPAAEESLPIEVMV DAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQ VQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASIS VRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO: 227)	
13	hM43-Fab(H4)-p40	QVQLQQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFT SYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYN EKFKGKATLTADKSTRTAYMELRSLTSEDTA VYFCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCGGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDW YPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRC EAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSS DPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEC QEDSASPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYT SSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWE YPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCSGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHH HHHH (SEQ ID NO: 228)	гуманизированное M43, p40 C177S
14	hM43-ScFv(vH4-vL4)-p40	QVQLQQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFT SYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYN EKFKGKATLTADKSTRTAYMELRSLTSEDTA VYFCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSGGG	гуманизированное M43, p40 C177S

		GSGGGGSGGGGSQIVLTQSPATLSASPGERVT MTCSASSSVSSRYLHWYQQKSGASPRLWIYG TSNLASGVPARFSGSGPGTSYTLTISSVEPEDA ATYYCQQYHSDPLTFGQGTKLELKGGGGSG GGGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVL TCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVK EFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAA TLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSASPAAEE SLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDP PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSY FSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGS GLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 229)	
15	hM43-ScFv(vL4-vH4)-p40	QIVLTQSPATLSASPGERVTMTCSASSSVSSR YLHWYQQKSGASPRLWIYGTSNLASGVPARF SGSGPGTSYTLTISSVEPEDAATYYCQQYHSD PLTFGQGTKLELKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLQQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFTSY GISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYNEK FKGKATLTADKSTRTAYMELRSLTSEDTAVY FCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSGGGGS GGGGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMV VLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQ VKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKE DGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGR FTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSASPAA EESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKP DPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPH SYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS GGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ	гуманизированное M43, p40 C177S

		ID NO: 230)	
16	hM43-Fab(H4)-Fc (выступ)	QVQLQQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFT SYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYN EKFKGKATLTADKSTRTAYMELRSLTSEDTA VYFCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 231)	гуманизированное M43, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая
17	hM43-ScFv(vH4-vL4)-Fc(выступ)	QVQLQQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFT SYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYN EKFKGKATLTADKSTRTAYMELRSLTSEDTA VYFCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQIVLTQSPATLSASPGERVT MTCSASSSVSSRYLHWYQQKSGASPRLWIYG TSNLASGVPARFSGSGPGTSYTLTISSVEPEDA ATYYCQQYHSDPLTFGQGTKLELKGGGGSG GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 232)	гуманизированное M43, выступ T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая
18	hM43-ScFv(vL4-	QIVLTQSPATLSASPGERVTMTCSASSSVSSR YLHWYQQKSGASPRLWIYGTSNLASGVPARF	гуманизированное M43, выступ

	vH4)-Fc (выступ)	SGSGPGTSYTLTISSVEPEDAATYYCQQYHSD PLTFGQGTKLELKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLQQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFTSY GISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYNEK FKGKATLTADKSTRTAYMELRSLTSEDTAVY FCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSGGGGS GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 233)	T366W, IgG1 человека, LALA-PG, эффекторная функция нулевая
19	p35-hM43-ScFv(vH4-vL4)2	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEA CLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCLASRKTS FMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTINR VMSYLNASGGGGSGGGGSQVQLQQSGAEVA KPGASVNLNCKASGYTFTSYGISWVRQRTGQ GLEWIGEIYPRSGNTYYNEKFKGKATLTADK STRTAYMELRSLTSEDTAVYFCAGKDYGSTY ADYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQ IVLTQSPATLSASPGERVTMTCSASSSVSSRYL HWYQQKSGASPRLWIYGTSNLASGVPARFSG SGPGTSYTLTISSVEPEDAATYYCQQYHSDPL TFGQGTKLELKGGSGGGGSGGGSGGGGSGG GGSGGGSGGQVQLQQSGAEVAKPGASVNLN CKASGYTFTSYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYP RSGNTYYNEKFKGKATLTADKSTRTAYMEL RSLTSEDTAVYFCAGKDYGSTYADYWGQGT TLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAT	гуманизированное M43, p35 S27D, C74K, D188N

		LSASPGERVTMTCSASSSVSSRYLHWYQQKS GASPRLWIYGTSNLASGVPARFSGSGPGTSYT LTISSVEPEDAATYYCQQYHSDPLTFGQGTKL ELKGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 234)	
20	p35-hM43-ScFv(vL4-vH4)2	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEA CLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCLASRKTS FMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTINR VMSYLNASGGGGSGGGGSQIVLTQSPATLSA SPGERVTMTCSASSSVSSRYLHWYQQKSGAS PRLWIYGTSNLASGVPARFSGSGPGTSYTLTIS SVEPEDAATYYCQQYHSDPLTFGQGTKLELK GGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAEVAKPG ASVNLNCKASGYTFTSYGISWVRQRTGQGLE WIGEIYPRSGNTYYNEKFKGKATLTADKSTR TAYMELRSLTSEDTAVYFCAGKDYGSTYAD YWGQGTTLTVSSGGSGGGGSGGGSGGGGSG GGGSGGGSGGQIVLTQSPATLSASPGERVTM TCSASSSVSSRYLHWYQQKSGASPRLWIYGT SNLASGVPARFSGSGPGTSYTLTISSVEPEDA ATYYCQQYHSDPLTFGQGTKLELKGGGGSG GGGSGGGGSQVQLQQSGAEVAKPGASVNLN CKASGYTFTSYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYP RSGNTYYNEKFKGKATLTADKSTRTAYMEL RSLTSEDTAVYFCAGKDYGSTYADYWGQGT TLTVSSGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGSHHHH HH (SEQ ID NO: 235)	гуманизированное M43, p35 S27D, C74K, D188N
21	hM43-IgG1(H4)-scIL12	QVQLQQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFT SYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYN EKFKGKATLTADKSTRTAYMELRSLTSEDTA VYFCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE	гуманизированное M43 LALA, p40-p35

		PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKS**C**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSIWELK KDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDG ITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQY TCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIST DLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMV DAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQ VQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASIS VRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGSGGGGSG GRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEA CLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTS FMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDR VMSYLNAS (SEQ ID NO: 236)	
22	hM43-Fab(H4)-scIL12	QVQLQQSGAEVAKPGASVNLNCKASGYTFT SYGISWVRQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYN EKFKGKATLTADKSTRTAYMELRSLTSEDTA VYFCAGKDYGSTYADYWGQGTTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKS**C**GGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDW	гуманизированное M43, p40-p35

		YPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRC EAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSS DPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEC QEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYT SSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWE YPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCSGGSGGGGSGGRNLPVATPDPGM FPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCT SEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDL KMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLA VIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGSGGH HHHHHGGSGLNDIFEAQKIEWHE (SEQ ID NO: 237)	

Пример 6 - Дополнительные слитые белки, нацеленные на uPAR

Дизайн слитых белков по Примеру 6

Конструкции слитых белков, разработанных и/или синтезированных в соответствии с Примером 6, представлены в **Таблице 31**. Некоторые из этих аминокислотных последовательностей, представленных в **Таблице 31**, применяются в качестве контроля для следующих экспериментальных примеров. Последовательности, включающие белки мышей или белки человека, модифицированные для лучшего связывания в экспериментах на мышах, включены для целей тестирования на моделях мышей и клеточных системах мыши. Любая из конструкций, использующих белки мыши или белки человека, модифицированные для экспериментов на мышах, может быть заменена полностью человеческими белками.

Для экспрессии в клетках млекопитающих N-концевую лидерную последовательность добавляли к определенным конструкциям слитого белка, представленным в **Таблице 31**. Кроме того, метки 6xHis и FLAG и авидиновые полипептиды добавляли к определенным конструкциям слитых белков, представленным в **Таблице 31**, для облегчения очистки во время рекомбинантных процедур.

Понятно, что конструкции слитых белков из Примера 6, представленные в **Таблице 31**, могут быть модифицированы, например, для модификации аминокислотного состава или длины линкерных молекул между полипептидными молекулами без потери

желаемой биологической активности. Порядок слияния различных полипептидов может быть изменен таким образом, что, например, область домена, нацеливающегося на uPAR, может находиться на N-конце или C-конце части цитокина или модулятора иммунной контрольной точки слитых белков или что другой слитый белок может быть добавлен к конструкциям, представленным в **Таблице 31**, посредством необязательных линкеров, таких как слитый белок Fc или слитый белок сывороточного альбумина человека (HAS). Сокращения в **Таблице 31** включают: одноцепочечный (sc); скремблированная последовательность (ss) с циркулярной перестановкой (cp).

Таблица 31 - Аминокислотные последовательности полипептидов, описанных в Примере 6

Описание	Аминокислотная последовательность/SEQ ID NO
uPA человека UniProt: P00749	MRALLARLLLCVLVVSDSKGSNELHQVPSNCDCLNGGTCVSN KYFSNIHWCNCPKKFGGQHCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKAST DTMGRPCLPWNSATVLQQTYHAHRSDALQLGLGKHNYCRNP DNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCADGKKPSSPPEELKFQ CGQKTLRPRFKIIGGEFTTIENQPWFAAIYRRHRGGSVTYVCGG SLISPCWVISATHCFIDYPKKEDYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFE VENLILHKDYSADTLAHHNDIALLKIRSKEGRCAQPSRTIQTICL PSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDYLYPEQLKMTVVKLISHRE CQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQWKTDSCQGDSGGPLVCSLQG RMTLTGIVSWGRGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKEENGL AL (SEQ ID NO: 90)
ATF человека	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSYKYFSNIHRCNCPKKFGGQHCE IDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTYH AHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQEC MVHDCA (SEQ ID NO: 91)
uPA мыши UniProt: P06869	MKVWLASLFLCALVVKNSEGGSVLGAPDESNCGCQNGGVCVS YKYFSRIRRCSCPRKFQGEHCEIDASKTCYHGNGDSYRGKANT DTKGRPCLAWNAPAVLQKPYNAHRPDAISLGLGKHNYCRNPD NQKRPWCYVQIGLRQFVQECMVHDCSLSKKPSSSVDQQGFQC GQKALRPRFKIVGGEFTEVENQPWFAAIYQKNKGGSPPSFKCG GSLISPCWVASAAHCFIQLPKKENYVVYLGQSKESSYNPGEMK FEVEQLILHEYYREDSLAYHNDIALLKIRTSTGQCAQPSRSIQTI CLPPRFTDAPFGSDCEITGFGKESESDYLYPKNLKMSVVKLVSH EQCMQPHYYGSEINYKMLCAADPEWKTDSCKGDSGGPLICNIE GRPTLSGIVSWGRGCAEKNKPGVYTRVSHFLDWIQSHIGEEKG

	LAF (SEQ ID NO: 93)
слитый белок «cpIL-2:IL-2Ra» человека	SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIISTLTGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQG SGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIK SGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQK ERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVG QMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG (SEQ ID NO: 94)
IL-15Ra:cpIL-15 человека	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTE CVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDGGSELEEKNIKEFLQSFVHIVQ MFINGGGSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCK VTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVT ESGCKEC*(SEQ ID NO: 95)
слитый белок «ср мыши IL-2-IL-2Ra»	SSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVVD FLRRWIAFCQSIISTSPQ**GGSS**STQQQQQHLEQLLMDLQELLSR MENYRNLKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVL DLTQ**GSGGGS**ELCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRG FRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQ KEQQTTTDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRIYHF VEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTCV D*(SEQ ID NO: 96)
слитый белок «IL-15:15Ra» мыши	TTCPPPVSIEHADIRVKNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIEC VINKNTNVAHWTTPSLKCIRDggsELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFI NgggsNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMN CFLLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESG CKEC**(SEQ ID NO: 97)
uPA-ATF человека:cpIL-2:IL-2Ra человека	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHC EIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTY HAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQE CMVHDCAGGSGGSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGSSSTKKTQLQLEHLLL DLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRN

	TTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWE NEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTG (SEQ ID NO: 98)
cpIL-2:IL-2Ra человека:uPA-ATF человека	SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIISTLTGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQG SGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIK SGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQK ERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVG QMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG GGSGGSNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKF GGQHCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATV LQQTYHAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLK PLVQECMVHDCA (SEQ ID NO: 99)
uPA-ATF человека:IL-15Ra:cpIL-15 человека	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHC EIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTY HAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQE CMVHDCAGGSGGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNS GFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDGGSELEEK NIKEFLQSFVHIVQMFINGGGSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHID ATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENL IILANNSLSSNGNVTESGCKEC (SEQ ID NO: 100)
cpIL-2:IL-2Ra мыши:uPA-ATF мыши	SKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVVDF LRRWIAFCQSIISTSPQ**GGSS**STQQQQQHLEQLLMDLQELLSRM ENYRNLKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLD LTQ**GSGGGS**ELCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGF RRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQK EQQTTTDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRIYHFV EGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTCVD ggsggGSVLGAPDESNCGCQNGGVCVSYKYFSRIRRCSCPRKFQ GEHCEIDASKTCYHGNGDSYRGKANTDTKGRPCLAWNAPAVL QKPYNAHRPDAISLGLGKHNYCRNPDNQKRPWCYVQIGLRQF VQECMVHDC (SEQ ID NO: 101)
uPA-ATF:IL-15Ra мыши:cpIL-15	GSVLGAPDESNCGCQNGGVCVSYKYFSRIRRCSCPRKFQGEHC EIDASKTCYHGNGDSYRGKANTDTKGRPCLAWNAPAVLQKPY

	NAHRPDAISLGLGKHNYCRNPDNQKRPWCYVQIGLRQFVQEC MVHDCGGSGGTTCPPPVSIEHADIRVKNYSVNSRERYVCNSGF KRKAGTSTLIECVINKNTNVAHWTTPSLKCIRDGGSELEEKTFT EFLQSFIRIVQMFINGGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLYT DSDFHPSCKVTAMNCFLLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLA NSTLSSNKNVAESGCKEC (SEQ ID NO: 102)
uPA-ATF человека (контрольная молекула)	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHC EIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTY HAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQE CMVHDCA (SEQ ID NO: 103)
uPA-ATF мыши (контрольная молекула)	GSVLGAPDESNCGCQNGGVCVSYKYFSRIRRCSCPRKFQGEHC EIDASKTCYHGNGDSYRGKANTDTKGRPCLAWNAPAVLQKPY NAHRPDAISLGLGKHNYCRNPDNQKRPWCYVQIGLRQFVQEC MVHDC (SEQ ID NO: 104)
uPA-ATF мыши:cpIL-2:IL-2Ra мыши	GSVLGAPDESNCGCQNGGVCVSYKYFSRIRRCSCPRKFQGEHC EIDASKTCYHGNGDSYRGKANTDTKGRPCLAWNAPAVLQKPY NAHRPDAISLGLGKHNYCRNPDNQKRPWCYVQIGLRQFVQEC MVHDCGGSGGSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQ FDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGSSSTQQQQQHLEQLL MDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLQCLE DELGPLRHVLDLTQGSGGGSELCLYDPPEVPNATFKALSYKNG TILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRK QVTAQLEHQKEQQTTTDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWK HEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTG WTQPQLTCVD (SEQ ID NO: 105)
cpIL-2:IL-2Ra человека:IgG1 Fc человека:uPA-ATF* человека Молекулу можно модифицировать для уменьшения ADCC путем замены подчеркнутого LL	SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIISTLTGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQG SGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIK SGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQK ERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVG QMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG gggsEPKSSDKTHTCPPCPAPE**LL**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG

на AA.	QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGSNELHQVPSNCDCLNG GTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHCEIDKSKTCYEGNGHFYR GKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTYHAHRSDALQLGLGKHN YCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCA (SEQ ID NO: 106)
uPA-ATF человека: IgG1 Fc человека:hcp IL-15 Молекулу можно модифицировать для уменьшения ADCC путем замены подчеркнутого LL на AA.	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHC EIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTY HAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQE CMVHDCAGGSGGEPKSSDKTHTCPPCPAPE**LL**GGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKgsITCPPPMSVEHA DIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAH WTTPSLKCIRDGGSELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINGGGSNWV NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLEL QVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKEC (SEQ ID NO: 107)
cpIL-2:IL-2Ra мыши:IgG1 мыши:uPA-ATF мыши	SKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVVDF LRRWIAFCQSIISTSPQGGSSSTQQQQQHLEQLLMDLQELLSRM ENYRNLKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLD LTQGSGGGSELCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFR RLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQKE QQTTTDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRIYHFVE GQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTCVDg sVPRDSGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVA ISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIM HQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPP PKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQ PIMNTNGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPGKggsggsGSVLGAPDESNCGCQNGGVCVSYKYFSRI RRCSCPRKFQGEHCEIDASKTCYHGNGDSYRGKANTDTKGRPC

	LAWNAPAVLQKPYNAHRPDAISLGLGKHNYCRNPDNQKRPW CYVQIGLRQFVQECMVHDC (SEQ ID NO: 108)
uPA-ATF:Fc:m cp IL-15 мыши	GSVLGAPDESNCGCQNGGVCVSYKYFSRIRRCSCPRKFQGEHC EIDASKTCYHGNGDSYRGKANTDTKGRPCLAWNAPAVLQKPY NAHRPDAISLGLGKHNYCRNPDNQKRPWCYVQIGLRQFVQEC MVHDCggsggVPRDSGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLT PKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNST FRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRP KAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQ PAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVL HEGLHNHHTEKSLSHSPGKggsTTCPPPVSIEHADIRVKNYSVNS RERYVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHWTTPSLKCIRDg gsELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINgggsNWIDVRYDLEKIESLIQSI HIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLLELQVILHEYSNMTLNET VRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCKEC (SEQ ID NO: 109)
Слитый белок cpIL-2:IL-2Ra человека:uPA-ATF человека (N22Y; W30R)	SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIISTLTGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQG SGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIK SGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQK ERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVG QMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG GGSGGSNELHQVPSNCDCLNGGTCVSYKYFSNIHRCNCPKKFG GQHCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVL QQTYHAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKP LVQECMVHDCA** (SEQ ID NO: 110)
cpIL-2:IL-2Ra- P25-человека	SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIISTLTGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQG SGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIK SGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQK ERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVG QMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG GGSGGGGSGGAESTYHHLSLGYMYTLNGGSHHHHHHGGSGL NDIFEAQKIEWHE (SEQ ID NO: 111)

cpIL-2:IL-2Ra-ssP25- человека	SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIISTLTGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQG SGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIK SGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQK ERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVG QMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG GGSGGGGSGGNYHYLESSMTALYTLGH (SEQ ID NO: 112)
cpIL-2:IL-2Ra-M25- человека	SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIISTLTGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQG SGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIK SGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQK ERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVG QMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG GGSGGGGSGGPRYQHIGLVAMFRQNTG (SEQ ID NO: 113)
cpIL-2:IL-2Ra-ssM25- человека	SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIISTLTGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQG SGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIK SGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQK ERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVG QMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG GGSGGGGSGGHQIPGAYRGVNQRFTML (SEQ ID NO: 114)
Легкая цепь каппа мышиного IgG 9d9 *анти*-CTLA-4	DIRRADIVMTQTTLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLE WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSS EQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWT DQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKS FNRNEC (SEQ ID NO: 115)
9d9 Тяжелая цепь IgG2a мыши	EAKLQESGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMNWVKQSH GKSLEWIGVINPYNGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELN SLTSEDSAVYYCARYYGSWFAYWGQGTLITVSTAKTTAPSVYP LAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFP AVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIE

	PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCV VVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS ALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQ VYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTEL NYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEG LHNHHTTKSFSRTPGK** (SEQ ID NO: 116)
*Тяжелая цепь IgG2a мыши анти-*CTLA-4 9d9: uPA-*ATF мыши*	EAKLQESGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMNWVKQSH GKSLEWIGVINPYNGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELN SLTSEDSAVYYCARYYGSWFAYWGQGTLITVSTAKTTAPSVYP LAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFP AVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIE PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCV VVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS ALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQ VYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTEL NYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEG LHNHHTTKSFSRTPGKggsggsGSVLGAPDESNCGCQNGGVCVS YKYFSRIRRCSCPRKFQGEHCEIDASKTCYHGNGDSYRGKANT DTKGRPCLAWNAPAVLQKPYNAHRPDAISLGLGKHNYCRNPD NQKRPWCYVQIGLRQFVQECMVHDC (SEQ ID NO: 117)**
Патент США. №: _7858746_B2_4 *легкая J43; легкая цепь анти-*PD-1 J43	YELTQPPSASVNVGETVKITCSGDQLPKYFADWFHQRSDQTIL QVIYDDNKRPSGIPERISGSSSGTTATLTIRDVRAEDEGDYYCFS GYVDSDSKLYVFGSGTQLTVLGGPKSSPKVTVFPPSPEELRTNK ATLVCLVNDFYPGSATVTWKANGATINDGVKTTKPSKQGQNY MTSSYLSLTADQWKSHNRVSCQVTHEGETVEKSLSPAECL** (SEQ ID NO: 118)
Патент США № 7858746_B2_11 *тяжелая v J43 по* GenBank; *AAA82733.1 для CH1,2,3; тяжелая цепь анти-*PD-1 J43	RLLESGGGLVKPEGSLKLSCVASGFTFSDYFMSWVRQAPGKGL EWVAHIYTKSYNYATYYSGSVKGRFTISRDDSRSMVYLQMNN LRTEDTATYYCTRDGSGYPSLDFWGQGTQVTVSSATTTapsvypl apacdsttsttdtvtlgclvkgyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpsvlhsglyslsssvtvpsstwpk qpitcnvahpasstkvdkkieprtdtdtcpnppdpcptcptpdllggpsvfifppkpkdvlmislt pkitcvvvdvseeepdvqfnwyvnnvedktaqtetrqrqynstyrvvsvlpikhqdwmsgkv fkckvnnnalpspiektiskprgqvrvpqiytfpppieqtvkkdvsvtclvtgflpqdihvewes ngqpqpeqnyknqpvldsdgsyflysklnvpksrwdqgdsftcsvihealhnhhmtktisrsl gn** (SEQ ID NO: 119)

тяжелая цепь анти-PD-1 J43: *ATF мыши*	RLLESGGGLVKPEGSLKLSCVASGFTFSDYFMSWVRQAPGKGL EWVAHIYTKSYNYATYYSGSVKGRFTISRDDSRSMVYLQMNN LRTEDTATYYCTRDGSGYPSLDFWGQGTQVTVSSATTTapsvypl apacdsttsttdtvtlgclvkgyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpsvlhsglyslsssvtvpsstwpk qpitcnvahpasstkvdkkieprtdtdtcpnppdpcptcptpdllggpsvfifppkpkdvlmislt pkitcvvvdvseeepdvqfnwyvnnvedktaqtetrqrqynstyrvvsvlpikhqdwmsgkv fkckvnnnalpspiektiskprgqvrvpqiytfpppieqtvkkdvsvtclvtgflpqdihvewes ngqpqpeqnykntqpvldsdgsyflysklnvpksrwdqgdsftcsvihealhnhhmtktisrsl gnggsggsGSVLGAPDESNCGCQNGGVCVSYKYFSRIRRCSCPRK FQGEHCEIDASKTCYHGNGDSYRGKANTDTKGRPCLAWNAPA VLQKPYNAHRPDAISLGLGKHNYCRNPDNQKRPWCYVQIGLR QFVQECMVHDC (SEQ ID NO: 120)
ATF мыши: тяжелая цепь анти-PD-1 J43	GSVLGAPDESNCGCQNGGVCVSYKYFSRIRRCSCPRKFQGEHC EIDASKTCYHGNGDSYRGKANTDTKGRPCLAWNAPAVLQKPY NAHRPDAISLGLGKHNYCRNPDNQKRPWCYVQIGLRQFVQEC MVHDCggsggRLLESGGGLVKPEGSLKLSCVASGFTFSDYFMSW VRQAPGKGLEWVAHIYTKSYNYATYYSGSVKGRFTISRDDSRS MVYLQMNNLRTEDTATYYCTRDGSGYPSLDFWGQGTQVTVS SATTTapsvyplapacdsttsttdtvtlgclvkgyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpsvlhsgly slsssvtvpsstwpkqpitcnvahpasstkvdkkieprtdtdtcpnppdpcptcptpdllggpsvf ifppkpkdvlmisltpkitcvvvdvseeepdvqfnwyvnnvedktaqtetrqrqynstyrvvsv lpikhqdwmsgkvfkckvnnnalpspiektiskprgqvrvpqiytfpppieqtvkkdvsvtclv tgflpqdihvewesngqpqpeqnykntqpvldsdgsyflysklnvpksrwdqgdsftcsvihe alhnhhmtktisrslgn (SEQ ID NO: 121)
Родительский внеклеточный домен PD-1 человека (UniProt: Q15116)	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWR**PGWFLDSPDRPWNPPTFSPAL LVVTEGDNTFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPED RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISL APKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVV** GVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPS AVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMG TSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO: 122)
uPA-ATF человека:линкер 5AA:PD-1 человека	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSYKYFSNIHRCNCPKKFGGQHCE IDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTYH AHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQEC MVHDCAGGSGGPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATF

	TCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVT QLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRV TERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV (SEQ ID NO: 123)
huPA-ATF (N22Y, W30R) : линкер 10AA : hPD-1 :	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSYKYFSNIHRCNCPKKFGGQHCEI DKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTYHA HRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMV HDCAGGSGGGGSGGPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNA TFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFR VTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELR VTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV (SEQ ID NO: 124)
hPD-1 : линкер 5AA : huPA-ATF (N22Y, W30R)	PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLN WYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVV RARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPS PRPAGQFQTLVGGSGGSNELHQVPSNCDCLNGGTCVSYKYFSNI HRCNCPKKFGGQHCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPC LPWNSATVLQQTYHAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWC YVQVGLKPLVQECMVHDCA (SEQ ID NO: 125)
hPD-1 : линкер 10AA : huPA-ATF (N22Y, W30R) :	PSPRPAGQFQTLVGGSGGGGSGGSNELHQVPSNCDCLNGGTCV SNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKAS TDTMGRPCLPWNSATVLQQTYHAHRSDALQLGLGKHNYCRNP DNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCA (SEQ ID NO: 126)
ATF мыши: IL-2 мыши	GSVLGAPDESNCGCQNGGVCVSYKYFSRIRRCSCPRKFQGEHC EIDASKTCYHGNGDSYRGKANTDTKGRPCLAWNAPAVLQKPY NAHRPDAISLGLGKHNYCRNPDNQKRPWCYVQIGLRQFVQEC MVHDCggsggAPTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQQHLEQLLM DLQELLSRMENYRNLKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLQCLEDE LGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFEC QFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQ (SEQ ID NO: 127)
ATF мыши: IL-15 мыши	GSVLGAPDESNCGCQNGGVCVSYKYFSRIRRCSCPRKFQGEHC EIDASKTCYHGNGDSYRGKANTDTKGRPCLAWNAPAVLQKPY NAHRPDAISLGLGKHNYCRNPDNQKRPWCYVQIGLRQFVQEC MVHDCggsggNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCK VTAMNCFLLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNKN VAESGCKECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTS (SEQ ID NO: 128)

Связанный 4-1BBL Тример с линкерами GSG между мономерами	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQ GRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPE IPAGLPSPRSEGSGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ GATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGSGREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE (SEQ ID NO: 129)
Связанный 4-1BBL тример с линкером GSG между мономерами	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGLPSPRSEGSGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVA QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG VYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGSGREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALH LQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPR SE (SEQ ID NO: 130)
uPA-ATF - 5 линкер - связанный 4-1BBL Тример	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHCE IDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTYHA HRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMV HDCAGGSGGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQL ELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT

	VLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGSGREGPELSPDDPAGLLDLRQGM FAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGSGREGPELSPD DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTG GLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLAL HLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRS E (SEQ ID NO: 131)
Связанный 4-1BBL Тример - 5 линкер - uPA-ATF	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQ GRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPE IPAGLPSPRSEGSGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGSGREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEG GSGGSNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGG QHCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQ TYHAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQ ECMVHDCA (SEQ ID NO: 132)
Слитый 4-1BB CL:CH1 Fc (Uniprot: 4-1BB (Q07011|24-186)): 15AA линкер: uPA	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQ CKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQG QELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGT KERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQGGGGSGGG GSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS

	GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGGGSGGGSG GSNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQH CEIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQT YHAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQ ECMVHDCA (SEQ ID NO: 133)
Слитый белок OX40 CL:CH1 Fc (OX40 Uniprot: P43489|29-214)): 15AA линкер (линкер различной длины): uPA (с или без точковых мутантов для связывания uPAR мыши)	LHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGF YNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQ PLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQP ASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGP STRPVEVPGGRAGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG GSGGGGGSGGGSGGSNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIH WCNCPKKFGGQHCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPC LPWNSATVLQQTYHAHRSDALQLGLGKHN (SEQ ID NO: 134)
Слитый GITR CL:CH1 Fc (GITR (Uniprot: Q9Y5U5|26-162)): 15AA линкер : uPA человека	QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCS EWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQ CIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCTQFGFLTVFPGNKTHNAVCV PGSPPAEPGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSG

	GGGSGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGG GGSGGGSGGSNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCP KKFGGQHCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSA TVLQQTYHAHRSDALQLGLGKHN (SEQ ID NO: 135)
scIL-10_scVlVh1Fc_uPA-ATF - 5aa линкер (линкер различной длины) - uPA-ATF	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQL DNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDI KAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNK LQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRNGGGSPGQGTQSENS CTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLE DFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGEN LKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAM SEFDIFINYIEAYMTMKIRNGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGECGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGGSGGSNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWC NCPKKFGGQHCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPW NSATVLQQTYHAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQ VGLKPLVQECMVHDCA (SEQ ID NO: 136)
scIL-10_uPA-ATF (линкер различной	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQL DNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPD

длины)-UPA	IKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFN KLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRNGGGSPGQGTQSEN SCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLL EDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGE NLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKA MSEFDIFINYIEAYMTMKIRNGGSGGGGSGGSNELHQVPSNCD CLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHCEIDKSKTCYEGN GHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTYHAHRSDALQLGL GKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCA SEQ ID NO: (SEQ ID NO: 137)
мономер GM-CSF - huPA-ATF	APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVIS EMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQH CPPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQEGGSGGS NELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHCEI DKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTYHA HRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMV HDCA (SEQ ID NO: 138)
Субъединица альфа p35 IL-12 UniProt: P29459	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCT SEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQI FLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCI LLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO : 139)
Субъединица бета p40 IL-12 UniProt: P29460	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQS SEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKED GIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLT FSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDS ACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREK KDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO: 140)
P40: 10 AA линкер (линкер различной длины до 30-40 GlySer): P35: uPA	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQS SEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKED GIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLT FSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDS ACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ

	LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREK KDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSG GSGGGGSGGRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKA RQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRE TSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKL LMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFY KTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGSGGGSGGGSSNE LHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHCEIDK SKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTYHAHR SDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVH DCA (SEQ ID NO: 141)
huPA-ATF : p40 Предпочтительной мутацией является замена подчеркнутого цистеина на серин (C199S).	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHC EIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTY HAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQE CMVHDCAGGSGGGGSGGIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEM VVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQY TCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRC EAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAAT LSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA<u>C</u>PAAEESLPIEVMVDAVHK LKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT WSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNA SISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO: 142)
P35 : huPA- ATF Предпочтительной мутацией является замена подчеркнутого цистеина на серин (C97S).	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCT EEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNES<u>C</u>LNSRETSFITNGSCLA SRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFL DQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGSGGGSGGGSSNELHQVPSNC DCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHCEIDKSKTCYEGN GHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTYHAHRSDALQLGL GKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCA (SEQ ID NO: 143)
> huPA- ATF : P35 : huPA- ATF : Предпочтительной мутацией является	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHCE IDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTYHA HRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMV HDCAGGSGGGGSGGRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSN

замена подчеркнутого цистеина на серин (C97S).	MLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNES **C**LNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFK TMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSS LEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGSGGGS GGGSSNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGG QHCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQ TYHAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQ ECMVHDCAGGSGGHHHHHHGGSGLNDIFEAQKIEWHE (SEQ ID NO: 144)
HSA : p40 : uPA Типовой мутацией является замена подчеркнутого цистеина на серин (C199S).	RGVFRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFE DHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT ECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQGLKCASLQKFGER AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLE CADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDE MPADLPSLAADFVGSKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHP DYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVE EPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEV SRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDCLSVFLNQLCVLHEKTPV SDRVTKCCTESLVNGRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEK CCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGGGSGGIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVL GSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIW STDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSA**C**PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCV QVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCSGGSGGGGSGGSNELHQVPSNCDCLNGGTCVSN KYFSNIHWCNCPKKFGGQHCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTD TMGRPCLPWNSATVLQQTYHAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDN RRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCA (SEQ ID NO: 145)
(cpIL-6 GP130 D1)	QNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQMSGGSGGGSSERID

	KQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEK DGCFQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQARAV QMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQASELLDP CGYISPESPVVQLHSNFTAVCVLKEKCMDYFHVNANYIVWKTN HFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIASLNIQLTCNILTFGQLEQNVYG ITIISG (SEQ ID NO: 146)
cpIL-6 GP130 D1: uPA человека:	QNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQMSGGSGGGSSERI DKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMA EKDGCFQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQA RAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQASE LLDPCGYISPESPVVQLHSNFTAVCVLKEKCMDYFHVNANYIV WKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIASLNIQLTCNILTFGQLE QNVYGITIISGGGSGGGGSGGSNELHQVPSNCDCLNGGTCVSN KYFSNIHWCNCPKKFGGQHCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKAST DTMGRPCLPWNSATVLQQTYHAHRSDALQLGLGKHNYCRNP DNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCA (SEQ ID NO: 147)

Рекомбинантные процедуры, экспрессия белка и очистка белка для Примера 6

Синтез генов и субклонирование в вектор экспрессии млекопитающих

Синтез и субклонирование генов для экспрессии разработанных конструкций проводили с применением стандартных способов молекулярной биологии.

Экспрессия белка

Все белки экспрессировали с применением набора системы экспрессии EXPI293™ (ThermoFisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя.

Очистка белка

После сбора супернатанта экспрессионной культуры экспрессируемый белок захватывали в зависимости от природы слитого белка. Белки, содержащие IgG Fc (мыши или человека), захватывали на колонке с белком А и колонку промывали PBS (до 5 объемов колонки). Белок элюировали из колонки путем понижения pH рабочего буфера и непосредственно нейтрализовали Tris-буфером с pH 8. Очищенный белок затем подвергали диализу в течение ночи против PBS. Для белков, содержащих слитый гексагистидин (6xHis), белок в супернатанте захватывали на сефарозной смоле Ni-NTA и элюировали увеличивая концентрации имидазола. Очищенный белок затем диализовали в течение ночи против PBS.

Кинетические измерения связывания слитых белков на основе IL-2 и IL-15 с uPAR человека или мыши - Пример 6.

Рекомбинантный uPAR-Fc мыши (R&D Systems, кат. № 531-PA-100) захватывали на сенсорном чипе BIACORE™ CM5, модифицированном с применением набора для

захвата антител человека (GE Healthcare, кат. № BR100839) в соответствии с протоколом производителя. Тестируемые молекулы пропускали через чип со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 2 минут ступенчато увеличивая диапазон концентрации. Диссоциацию аналитов измеряли в течение 10 минут. Чип регенерировали, пропуская 3M $MgCl_2$ в течение 30 секунд. Полученные сенсорограммы анализировали с помощью собственного программного обеспечения прибора для расчета аффинности связывания конструкций, и результаты представлены в **Таблице 32**.

Рекомбинантный uPAR his человека (R&D Systems, 807-UK-100/CF) биотинилировали, а затем захватывали на сенсорном чипе BIACORE™ Streptavidin в соответствии с протоколом производителя. Молекулы, представляющие интерес, также называемые аналитами, пропускали через чип со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 3 минут ступенчато увеличивая диапазон концентрации. Диссоциацию аналитов измеряли в течение 20 минут. Чип регенерировали, пропуская 3M $MgCl_2$ в течение 30 секунд. Полученные сенсорограммы анализировали с помощью собственного программного обеспечения прибора для расчета аффинности связывания конструкций, и результаты представлены в **Таблице 32**.

В целом, слияния IL-2 или IL-15 человека с uPA-ATF прочно связываются с uPAR человека в диапазоне 0,59-2,2 нМ (см. **Таблицу 32**, SEQ ID NO: 98, 99 и 100). Эти слитые молекулы связывались с несколько меньшей эффективностью по сравнению с контрольной молекулой, SEQ ID NO: 20 (uPA-ATF человека; 0,24 нМ). Слияния IL-2 и IL-15 с uPA-ATF мыши связываются с uPAR мыши с эффективностью, аналогичной (0,14-0,24 нМ) SEQ ID NO: 104 (uPA-ATF мыши; 0,14 нМ). Кроме того, SEQ ID NO: 110, который cpIL-2:IL-2Rα человека слит с uPA-ATF человека с точечными мутантами N22Y, W30R, прочно связан с uPAR мыши, с K_D 0,12 нМ. Эти данные указывают на то, что слияние последовательностей на основе IL-2 и IL-15 с фрагментом, нацеливающимся на uPAR, в данном случае uPA-ATF, слитым на N- или C-конце, сохраняет мощное связывание с uPAR in vitro.

Таблица 32

Конструкция/SEQ ID NO:	**Описание**	**Мишень**	**K_D (нМ)**	**K_{on} (1/мс)**	**k_d (1/с)**
98	uPA-ATF человека:cpIL-2:IL-2Ra человека:His_6	uPAR человека	2,2	$4,6\times10^5$	$1,0\times10^{-3}$
99	cpIL-2:IL-2Ra человека:uPA-ATF-His_6 человека	uPAR человека	0,59	$8,3\times10^5$	$4,9\times10^{-4}$
100	His_6: uPA-ATF человека:hIL-15Ra:cpIL-	uPAR человека	1,1	$5,0\times10^5$	$5,6\times10^{-4}$

	15				
101	cpIL-2:IL-2Ra мыши:uPA-ATF-His_6 мыши	uPAR мыши	0,19	$1,3\times10^6$	$2,6\times10^{-4}$
102	His_6:uPA-ATF мыши:IL-15Ra мыши:cpIL-15	uPAR мыши	0,14	$1,5\times10^6$	$2,0\times10^{-4}$
103	uPA-ATF человека:His_6	uPAR человека	0,24	$1,5\times10^6$	$3,5\times10^{-4}$
104	uPA-ATF мыши:His_6	uPAR мыши	0,15	$2,2\times10^6$	$3,2\times10^{-4}$
105	uPA-ATF мыши:cpIL-2:IL-2Ra мыши:His_6	uPAR мыши	0,14	$1,4\times10^6$	$2,0\times10^{-4}$
110	cpIL-2:IL-2Rα человека:uPA-ATF (N22Y, W30R)-His_6 человека	uPAR мыши	0,12	$1,9\times10^6$	$2,3\times10^{-4}$

***Эффективность in* vitro молекул, разработанных для активации рецептора IL-2 на Т-клетках человека - Пример 6**

Чтобы оценить эффективность молекул, содержащих слияния на основе последовательностей IL-2 или IL-15 человека, клетки HH (ATCC® CRL-2105™) инкубировали в течение 30 минут, увеличивая концентрации SEQ ID NO: 98, 99, 100, 110, 94, 106 и 107. После инкубации клетки промывали и лизировали, а фосфорилирование STAT5 определяли с помощью набора STAT5 альфа/бета (Phospho) [pY694/pY699] Multispecies InstantOne™ ELISA Kit (ThermoFisher Scientific, кат. № 85-86112-11) в соответствии с протоколом производителя. Фосфорилирование STAT5 представляет собой сигнальное событие, проксимальное к рецептору, индуцируемое активацией рецептора IL-2/IL-15. Полученные результаты продемонстрированы в **Таблице 33**.

Ненацеленный родительский слитый белок cpIL-2:IL2Rα с циркулярной перестановкой, SEQ ID NO: 94, демонстрировал значение EC_{50} 1,1 нМ в анализе HH pSTAT5. Слитые белки cpIL-2:IL2Rα с С-концевым доменом, нацеливающимся на uPAR, т.е. SEQ ID NO: 99, 106 и 110, были аналогично эффективными, со значениями EC_{50} 1,5 нМ, 1,6 нМ и 2,1 нМ соответственно. SEQ ID NO: 98, слитый белок cpIL-2:IL2 Rα с N-концевым доменом, нацеливающимся на uPAR, был менее эффективным со значением EC_{50} 7-10 нМ. Ненацеленный родительский слитый белок hIL-15Ra(sushi):cpIL-15, SEQ ID NO: 95, является более эффективным, чем SEQ ID NO: 94, со значением EC_{50} 0,039 нМ в анализе HH pSTAT5. Варианты SEQ ID NO: 95 с N-концевым нацеливающимся доменом также были больше эффективными, чем SEQ ID NO: 94, со значениями EC_{50} 0,18 нМ и

0,099 нМ для SEQ ID NO: 100 и 107 соответственно. Таким образом, все нацеленные варианты SEQ ID NO: 94 с С-концевым доменом, нацеливающимся на uPAR, и нацеленные варианты SEQ ID NO: 95 с N-концевым нацеливающимся доменом были равносильны своим ненацеленным родительским молекулам, что указывает на то, что слияние с мотивом, нацеливающимся на uPAR, не стерически препятствует/мешает связыванию цитокиновых доменов с родственным им рецептором.

Таблица 33

Конструкция/ SEQ ID NO:	**Описание**	**pSTAT5 EC_{50} (нМ)**
94	cpIL-2:IL-2Rα человека	1,1
95	IL-15Ra:cpIL-15 человека	0,039
98	uPA-ATF человека:cpIL-2:IL-2Ra человека:His_6	7-10
99	cpIL-2:IL-2Ra человека:uPA-ATF-His_6 человека	1,5
100	His_6 : uPA-ATF человека:hIL-15Ra:cpIL-15	0,18
110	cpIL-2:IL-2Rα человека:uPA-ATF (N22Y, W30R)-His_6 человека	1,6
106	cpIL-2:IL-2Ra:Fc человека:uPA-ATF человека	2,1
107	uPA-ATF человека:Fc:hIL-15Ra:cpIL-15	0,099

***Эффективность in vitro* молекул, разработанных для активации рецептора IL-2 на первичных спленоцитах мыши - Пример 6**

Чтобы проверить эффективность молекул, содержащих слияния на основе последовательностей IL-2 или IL-15 мыши, спленоциты собирали из селезенки мышей дикого типа, инкубировали в течение 30 минут, увеличивая концентрации SEQ ID NO: 96, Fc мыши: IL-15Ra:cpIL-15 мыши, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 и SEQ ID NO: 105. Затем клетки фиксировали и окрашивали флуоресцентно-меченными антителами против поверхностных и внутриклеточных маркеров для обнаружения фосфорилирования STAT5 на NK-клетках мышей, Т-клетках CD8 и регуляторных Т-клетках CD4+CD25+ Foxp3+ (T_{regs}) с помощью стандартных методов проточной цитометрии. Полученные результаты продемонстрированы в **Таблице 34**.

Рекомбинантный IL-2 дикого типа (rIL-2) избирательно стимулировал клетки, которые экспрессируют высокоаффинный рецептор IL-2, который у нормальных мышей и здоровых людей экспрессируется в основном клетками T_{regs}. В гораздо более высоких концентрациях rIL-2 может также активировать NK-клетки и подгруппы CD8 Т-клеток памяти благодаря экспрессии ими комплекса рецепторов промежуточной аффиности IL-2. Слитый белок cpIL-2:IL2Rα мыши с циркулярной перестановкой, SEQ ID NO: 96, был

сконструирован для более эффективного воздействия на клетки, экспрессирующие рецептор промежуточной аффинности относительно rIL-2. Это демонстрирует равносильная индукция pSTAT5 в T_{regs}, NK-клетках и CD8 Т-клетках памяти со значениями EC_{50} 21,6 нМ, 19,0 нМ и 23,2 нМ соответственно. Слитый белок cpIL-2:IL2Rα мыши с С-концевым доменом, нацеливающимся на uPAR, т.е. SEQ ID NO: 101, был аналогично эффективным в отношении T_{regs}, NK-клеток и CD8 Т-клеток памяти со значениями EC_{50} 16,5 нМ, 19,5 нМ и 27,3 нМ соответственно. Аналогично, слитый белок cpIL-2:IL2 Rα мыши с N-концевым доменом, нацеливающимся на uPAR, т.е. SEQ ID NO: 105, демонстрировал значения EC_{50} 21,9 нМ, 34,9 нМ и 38,0 нМ на T_{reg}, NK-клетках и CD8 Т-клетках памяти соответственно. В отличие от rIL-2, rmIL-15 не демонстрировал избирательной активации T_{reg}, поскольку его аффиность к рецепторному комплексу IL-2/IL-15 не повышалась в присутствии CD25. Это демонстрирует аналогичная индукция pSTAT5 в T_{regs}, NK-клетках и CD8 Т-клетках памяти с помощью Fc мыши: IL-15Ra:cpIL-15 мыши со значениями EC_{50} 0,60 нМ, 0,047 нМ и 0,15 нМ соответственно. Слитый белок IL-15Ra мыши(sushi):cpIL-15 с N-концевым доменом, нацеливающимся на uPAR, т.е. SEQ ID NO: 102, демонстрировал аналогичную эффективность в отношении T_{regs}, NK-клеток и CD8 Т-клеток памяти со значениями EC_{50} 1,7 нМ, 0,15 нМ и 0,50 нМ соответственно. Как и в случае с вариантами SEQ ID NO: 94 и SEQ ID NO: 95, нацеленными на uPAR, все варианты ортологов мышей, нацеленных на uPAR, были равносильны своим ненацеленным родительским молекулам, что позволяет предположить, что слитие с мотивом, нацеленным на uPAR, не стерически препятствует/мешает связыванию цитокиновых доменов с родственными им рецепторами, экспрессируемыми на первичных T_{reg}, NK-клетках и Т-клетках памяти CD8 мышей.

Таблица 34

Конструкция/SEQ ID NO:	**Описание**	**T_{regs} EC_{50} (нМ)**	**NK-клетка EC_{50} (нМ)**	**Т-клетка памяти CD8 EC_{50} (нМ)**
96	cpIL-2:IL-2Ra мыши	22	19	23
xx	Fc:IL-15Ra:cpIL-15 мыши	0,60	0,047	0,15
101	cpIL-2:IL-2Ra мыши:uPA-ATF-His_6 мыши	17	20	27
102	His_6:uPA-ATF мыши:IL-15Ra мыши:cpIL-15	1,7	0,15	0,50
105	uPA-ATF мыши:cpIL-	22	35	38

	2:IL-2Ra мыши:His_6			

Связывание молекул на основе IL-2 или IL-15 с линиями опухолевых клеток мыши, которые экспрессируют uPAR - Пример 6

Было продемонстрировано, что сингенные опухолевые линии мышей 4T1, CT26, EMT6 (все ранее полученные от ATCC®) и MC38 (от NCI) экспрессируют мышиный uPAR на поверхности клеток путем окрашивания флуоресцентно меченым антителом анти-uPAR мыши (CD87), как было определено методом проточной цитометрии. Прикрепившиеся клетки снимали раствором CORNING® CELLSTRIPPER® (кат. № 25056CI), промывали, а затем инкубировали с увеличением концентраций тестируемых молекул (см. **Таблицу 35**). После инкубации при 4°C в течение 60 мин клетки окрашивали флуоресцентно мечеными антителами анти-His и анализировали с помощью стандартных методов проточной цитометрии. Среднюю интенсивность флуоресценции наносили на график в зависимости от концентрации тестируемого образца, а значения EC_{50} рассчитывали с применением 4-параметрической логистической кривой.

Таблица 35

Опухолевая линия	**4T1** EC_{50} (нМ)	**CT26** EC_{50} (нМ)	**EMT6** EC_{50} (нМ)	**MC38** EC_{50} (нМ)
SEQ ID NO: 101	1,0	1,3	0,41	0,71
SEQ ID NO: 102	ND	ND	ND	0,41
SEQ ID NO: 103	0,22	1,1	ND	0,42
SEQ ID NO: 110	ND	1,4	0,54	ND

Фармакокинетика у мышей с опухолями MC38 SEQ ID NO: 94 и SEQ ID NO: 110 - Пример 6

Чтобы определить соотношение белка, циркулирующего в сыворотке, относительно опухолей, на самках мышей C57BL/6 с опухолями MC38 проводили эксперимент с однократной дозой для изучения PK . Мышам вводили дозу, когда размер опухолей находился в пределах 200-400 мм3. Мышам вводили подкожно либо 30 мкг SEQ ID NO: 94, либо 75 мкг SEQ ID NO: 110 в момент времени 0, а затем собирали терминальные образцы крови и обрабатывали их для получения сыворотки для каждого отдельного животного в момент времени 0,5, 2, 4, 8 и 24 часа после введения дозы. Опухоли тех же животных также собирали и быстро замораживали для последующего анализа концентрации. Образцы сыворотки анализировали с помощью анализа MSD (Meso-Scale Discovery), специфичного для IL-2 человека. Образцы опухолей гомогенизировали и концентрации измеряли с помощью того же анализа обнаружения.

Фармакокинетические параметры определяли с помощью бескомпартментной модели WinNonlin (Phoenix). Полученные результаты продемонстрированы в **Таблице 36**.

При сравнении соотношения опухолевой экспозиции к системной экспозиции (T/S) как для Cmax, так и для AUC, SEQ ID NO: 110, IL-2, нацеленная на uPAR, продемонстрировала больший коэффициент проникновения в опухоль по сравнению с ненацеленной контрольной молекулой SEQ ID NO: 94, которая продемонстрировал аналогичное соотношение экспозиции в опухоли по сравнению с сывороткой.

Таблица 36

Конструкция/ SEQ ID NO:	**Матрица**	**Cmax**	**Tmax**	**AUClast**	**AUCinf**	**MRTinf**	**t1/2**	**T/S (Cmax)**	**T/S (AUCinf)**
		(нМ)	**(ч)**	**(ч*нМ)**	**(ч*нМ)**	**(ч)**	**(ч)**	**(соотношение)**	**(соотношение)**
94	Сыворотка	19,5	2	234	239	9,9	8,3	NA	NA
94	Опухоль	23,2	2	189	191	6,6	8	1,2	0,8
110	Сыворотка	2,9	4	29	29,1	7,3	6,3	NA	NA
110	Опухоль	31,3	2	155	157	4,2	5,9	10,8	5,4

***Эффективность in vitro* молекул, разработанных для активации рецептора IL-10 - Пример 6**

Фосфорилирование STAT3 представляет собой сигнальное событие, проксимальное к рецептору, в ответ на связывание и активацию рецептора IL-10. Чтобы проверить эффективность молекул, содержащих слияния IL-10, мононуклеарные клетки периферической крови человека инкубировали в течение 1 часа с увеличением концентраций scIL-10:CL:CH1:Fc (линкер scIL10 3aa));=SEQ ID NO: 136, что эквивалентно: scIL-10:CL:CH1:Fc плюс 5AA линкер плюс huPA-ATF). Затем клетки фиксировали и окрашивали флуоресцентно-меченными антителами против поверхностных и внутриклеточных маркеров для обнаружения фосфорилирования STAT3 на B-клетках мыши, моноцитах, T-клетках CD4 и CD8 с помощью стандартных методов проточной цитометрии. Полученные результаты продемонстрированы в **Таблице 37**.

Обе молекулы обладают аналогичной эффективностью в отношении различных типов клеток, что подтверждает тот факт, что слияние молекул IL-10 с фрагментом, нацеливающимся на uPAR, в данном случае uPA-ATF человека, не влияет на способность

молекул связываться и активировать рецептор IL-10, экспрессируемый на иммунных клетках человека.

Таблица 37

Популяция клеток	scIL-10:CL:CH1:Fc (scIL10 3aa линкер)	SEQ ID NO: 136
CD8 Т-клетки центральной памяти	91,0 pM	49,9 pM
CD4 Т-клетки центральной памяти	80,6 pM	111 pM
Моноциты	0,060 pM	0,037 pM
В-клетки	0,057 pM	0,127 pM

***Эффективность in vitro* молекул, нацеленных на uPAR, разработанных для активации рецептора IL-12 - Пример 6**

Клетки HEK-BLUE™ IL-12 (InvivoGen) представляют собой клетки эмбриональной почки человека, специально разработанные для обнаружения биоактивного IL-12 in vitro путем мониторинга IL-12-индуцированной активации путей NF-κB/AP-1. Клеточная линия экспрессирует индуцируемый секретируемый репортерный ген эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под контролем индуцируемого STAT4 промотора. Клетки HEK-Blue IL-1β высевали по 50 000 клеток на лунку в среду DMEM, содержащую 4,5 г/л глюкозы и 2 мМ L-glu и 10% инактивированную нагреванием FBS (Gibco). Клетки инкубировали в течение 20 часов при 37 °C, 5% CO_2 с различными концентрациями IL-12 (R&D Systems, кат. № 219-IL-005/CF) или SEQ ID NO: 141. Продукцию SEAP определяли путем добавления QUANTI-Blue™ (InvivoGen) и инкубирования в течение 3 часов при 37 °C, 5% CO_2, а затем считывали на планшет-ридере при 630 нм.

Одноцепочечная конструкция IL-12 человека, слитая с конструкцией uPA-ATF человека SEQ ID NO: 141, имеет аналогичную активность (27 пМ) по сравнению с IL-12 человека дикого типа (18 пМ), что позволяет предположить, что слияние IL-12 с uPA-ATF не влияет на способность части молекул IL-12 связываться и активировать рецептор IL-12.

***Эффективность in vitro* молекул, нацеленных на uPAR, разработанных для активации рецептора 4-1BB человека - Пример 6**

Слитые белки, содержащие лиганд 4-1BB, анализировали с помощью набора 4-1BB Bioassay Kit от компании Promega. В этом анализе используются эффекторные клетки 4-1BB, которые стабильно экспрессируют 4-1BB и люциферазу после ответного элемента. Экспрессия люциферазы индуцируется при связывании лиганда с рецептором. Анализ проводили в соответствии с протоколом производителя. Кривые «доза-эффект» генерировались путем инкубации тестируемых молекул при возрастающих концентрациях и измерения света, генерируемого экспрессированной люциферазой. Полученные результаты продемонстрированы в **Таблице 38**.

Рекомбинантный человеческий мономер-лиганд 4-1BB (R&D Systems, кат. № 2295-4L-025/CF) не проявил активности в анализе, что позволяет предположить, что несшитый мономер 4-1BBL не способен активировать 4-1BB, поскольку в норме 4-1BBL

функционирует как тримера. Связанные 4-1BBL тримеры, слитые с uPA-ATF человека на N- или C-конце (SEQ ID NO: 130 и SEQ ID NO: 131), имеют более эффективное значение EC_{50} (и более высокий максимальный сигнал по сравнению со связанной молекулой 4-1BBL тримера, которая не слита с uPA-ATF человека (SEQ ID NO: 129) и имеет значение EC_{50} 0,15 нМ. Эти результаты позволяют предположить, что слияние с человеческим доменом uPA-ATF, нацеливающимся на uPAR, может привести к в 2-3 раза более мощной активности в передаче сигнала через 4-1BB,что, возможно, связано с влиянием авидности вследствие мощного связывания с uPAR на поверхности клетки. Тем не менее, слитые белки 4-1BBL с uPA-ATF функционально способны связывать и передавать сигналы через 4-1BB.

Таблица 38

Тестируемая молекула	**описание**	**EC_{50} (нМ)**	**Emax (люциферазные единицы)**
мономер 4-1BBL	Контроль (из систем R&D)	Активность не проявляется	Активность не проявляется
SEQ ID NO: 129	Связанный 4-1BBL тример человека	0,15	193 000
SEQ ID NO: 130	uPA-ATF человека: связанный 4-1BBL тример человека	0,046	266 000
SEQ ID NO: 131	связанный 4-1BBL тример человека : uPA-ATF человека	0,10	330 000

***Эффективность in vitro* молекул, разработанных для активации рецептора GM-CSF на моноцитах человека - Пример 6**

Чтобы оценить эффективность молекул, содержащих слияния на основе последовательностей GM-CSF человека, клетки U937 (ATCC® CRL-1593.2™) инкубировали в течение 30 минут, увеличивая концентрации рекомбинантного GM-CSF человека (R&D Systems, кат. 215-GM-050/CF), SEQ ID NO: 138 или SEQ ID NO: 103. После инкубации клетки фиксировали, пермеабилизировали и окрашивали внутриклеточно флуоресцентно меченным антителом, специфичным к pSTAT5, и анализировали с помощью стандартных методов проточной цитометрии. Полученные результаты продемонстрированы в **Таблице 39**.

Рекомбинантный GM-CSF человека (rhGM-CSF) является мощным индуктором фосфорилирования STAT5, о чем свидетельствует EC_{50} 18,6 пМ в анализе U937 pSTAT5. Домен, нацеливающийся на uPAR человека, был слит с C-концевым концом GM-CSF в SEQ ID NO: 138. SEQ ID NO: 138 была в около 20 раз более эффективной в индуцировании фосфорилирования STAT5 с EC_{50} 1,28 пМ. Совместная инкубация SEQ ID

NO: 138 с увеличением концентраций одного домена, нацеливающегося на uPAR человека, SEQ ID NO: 103, приводила к снижению активности, подобно одному rhGM-CSF. Эти результаты позволяют предположить, что слияние мотива, нацеливающегося на uPAR, с GM-CSF не оказывает отрицательного влияния на способность слитого белка индуцировать фосфорилирование STAT5 в результате связывания рецептора, а, скорее, повышает его активность.

Таблица 39

Тестируемая молекула	**Конкурент**	**EC_{50} (пМ)**
rhGM-CSF	нет	18,6
SEQ ID NO: 138	нет	1,28
SEQ ID NO: 138	1 нМ uPA-ATF человека	2,55
SEQ ID NO: 138	100 нМ uPA-ATF человека	14,0

Фармакокинетика типовых слитых белков in vivo

Отобранные слитые белки анти-uPAR человека и субъединицы IL-12 анализировали in vivo на моделях опухолей мышей. В частности, уровни тестируемых слитых белков определяли в сыворотке и опухолевой ткани мышей в несколько моментов времени после введения дозы. Слитые белки, использование которых описано в этом разделе, приведены ниже в **Таблице 40**. Детали эксперимента изложены ниже в **Таблице 41**.

Таблица 40 - Аминокислотные последовательности слитых белков

Описание	Аминокислотная последовательность/SEQ ID NO
p35-hM1-ScFv(vH3vL4)2	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNMLQKARQTLEFYPCT SEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIF LDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTINRVMSYLNASGGGGSGGGGSEVQLQQSGAEVKK PGATVKLSCTASGFNIKDEYINWVKQRPGQGLEWIGWIDPENGD TEYASKFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVYYCTGGNY VGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPATL SASPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPRRWLYDTSKLA SGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYYCQQWSSNPPYTFG QGTKLEIKGGSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGSGGEVQLQQS GAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKDEYINWVKQRPGQGLEWIGW IDPENGDTEYASKFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRSEDTAVYY CTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVL

	TQSPATLSASPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPRRWL YDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYYCQQWSS NPPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 189)
p35-hM8-ScFv(vB10vH3)2	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNMLQKARQTLEFYPCT SEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIF LDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTINRVMSYLNASGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSAS VGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKSPQLLVYAATNLADG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYYCQHFWGTPWTFGGG TKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQIQLVQSGSELKKPGASVKISCK ASGTTFTDYGMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEDFK GRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYFCAHYSFDYWGQGTL LTVSSGGSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGSGGDIQMTQSPSS LSASVGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKSPQLLVYAATNL ADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYYCQHFWGTPWTF GGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQIQLVQSGSELKKPGASVKI SCKASGTTFTDYGMNWVKQSPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAE DFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYFCAHYSFDYWGQ GTLLTVSS (SEQ ID NO: 213)
Тяжелая цепь hM1-IgG1-p40 (hM1-IgG1(H3)-p40 (HC-слияние))	EVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKDEYINWVKQRPGQ GLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRS EDTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGE MVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQY TCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCE AKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS AERVRGDNKEYEYSVECQEDSASPAAEESLPIEVMVDAVHKLK

	YENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWST PHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO: 178)
Легкая цепь hM1-IgG1-p40 (hM1-L3 (Каппа LC))	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPRR WIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQW SSNPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 159)
hM8-IgG1-p40 Тяжелая цепь (hM8-IgG1(H3)-p40 (HC-слияние))	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTDYGMNWVKQSPGK GLKWMGWINTNTGEPTYAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVV LTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCH KGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKN YSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVECQEDSASPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYEN YTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHS YFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQ DRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO: 193)
hM8-IgG1-p40 Легкая цепь (hM8-B2 (Каппа LC))	DIQMTQSPSSLSASVGDTVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKSPQ LLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYTLKISSLQPEDFATYYCQ HFWGTPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 161)
hM1-Fab-p40 Тяжелая цепь	EVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKDEYINWVKQRPGQ GLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRS

(hM1-Fab(H3)-p40 (HC-слияние))	EDTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CGGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTP EEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVL SHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFT CWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNK EYEYSVECQEDSASPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSV QVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCS (SEQ ID NO: 179)
hM1-Fab-p40 Легкая цепь (hM1-L3 (Каппа LC))	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPRR WIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQW SSNPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 159)
hM8-Fab-p40 Тяжелая цепь (hM8-Fab(H3)-p40 (HC слияние))	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGTTFTDYGMNWVKQSPGK GLKWMGWINTNTGEPTYAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTATYFCAHYSFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGG GGSGGGGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEED GITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHS LLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCW WLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEY EYSVECQEDSASPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDII KPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQV QGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSE WASVPCS (SEQ ID NO: 194)
hM8-Fab-p40 Легкая цепь (hM8-B5 (Каппа LC))	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKSPQ LLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYYCQ HFWGTPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID

	NO: 162)
p35-hM1-Fab-KiH Тяжелая цепь (hM1-Fab(H3)-KiH (выступ))	EVQLQQSGAEVKKPGATVKLSCTASGFNIKDEYINWVKQRPGQ GLEWIGWIDPENGDTEYASKFQGRATITADTSTDTAYLELSSLRS EDTAVYYCTGGNYVGWFPYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 238)
p35-hM1-Fab-KiH Легкая цепь (hM1-L3 (Каппа LC))	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGTSPRR WIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQW SSNPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 159)
p35-hM1-Fab-KiH (p35-Fab-KiH (впадина))	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVDNMLQKARQTLEFYPCT SEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESKLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIF LDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTINRVMSYLNASGGGSGGGGSGEPKSSDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 239)

Таблица 41 - Детали анализа

Группа	Количество животных	Исследуемый препарат	Структура	Путь введения дозы	Целевой уровень дозы (мг/кг)	Анализ обнаружения
1	6	Носитель				

2	36	SEQ ID NO: 213	p35-hM8-ScFv2	болюс	40	Анализ MSD против P35 человека
3	36	SEQ ID NO: 213	p35-hM8-ScFv2	инфузия	40	Анализ MSD против P35 человека
4	36	SEQ ID NO: 189	p35-hM1-ScFv2	болюс	40	Анализ MSD против P35 человека
5	36	SEQ ID NO: 179 & SEQ ID NO: 159	hM1-Fab-P40	болюс	6,9	Набор MSD IL-12p40 человека V-Plex
6	36	SEQ ID NO: 213 (за 0,5 часа до P40)	p35-hM8-ScFv2	инфузия	40	Набор MSD IL-12p70 человека V-Plex
		SEQ ID NO: 178 и SEQ ID NO: 159	hM1-IgG-P40	болюс	11,7	
7	36	SEQ ID NO: 213 (за 4 часа до P40)	p35-hM8-ScFv2	инфузия	40	Набор MSD IL-12p70 человека V-Plex
		SEQ ID NO: 178 и SEQ ID NO: 159	hM1-IgG-P40	болюс	11,7	

Модель, использованная в вышеуказанном исследовании, представляла собой модель ксенотрансплантата рака прямой кишки человека SC RKO у самок мышей NOD/SCID. Для генерации модели опухоли, каждой мыши подкожно инокулировали опухолевые клетки RKO. Рандомизацию использовали, когда размер опухоли достигал ~250 $мм^3$. Образцы опухоли и сыворотки брали через 0,5, 1, 4, 24, 48, 72 часа после последней дозы. Анализы Meso Scale Discovery (MSD) использовали для обнаружения p35, p40 или p70 в образцах в соответствии с протоколами производителя.

Как продемонстрировано на **Фиг. 11**, тестируемые слитые белки в каждой группе обнаруживались в опухолевой ткани семенников во все моменты времени, при этом их уровни оставались относительно стабильными. Полученные данные демонстрируют, что слитые белки продуктивно накапливаются в опухолевой ткани. Как продемонстрировано

на **Фиг. 12,** для выбранных групп уровень слитых белков в сыворотке постепенно снижался с течением времени, демонстрируя, что слитый белок быстро выводится из системы, за исключением слитого белка в целевой опухолевой ткани.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с рецептором урокиназного активатора плазминогена (uPAR), содержащий:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий:

i) аминокислотную последовательность HCDR1 GFNIKDEY (SEQ ID NO: 3), GFSLTNYG (SEQ ID NO: 11), GNTFTDYG (SEQ ID NO: 19), GTTFTDYG (SEQ ID NO: 41), или GYTFTSYG (SEQ ID NO: 27);

ii) аминокислотную последовательность HCDR2 IDPENGDT (SEQ ID NO: 4), IWSDGGT (SEQ ID NO: 12), INTNTGEP (SEQ ID NO: 20), или IYPRSGNT (SEQ ID NO: 28); и

iii) аминокислотную последовательность HCDR3 TGGNYVGWFPY (SEQ ID NO: 5), ARGGRSDLFAY (SEQ ID NO: 13), AHYSFDY (SEQ ID NO: 21), или AGKDYGSTYADY (SEQ ID NO: 29); и

(b) вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий:

iv) аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSY (SEQ ID NO: 6), QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 14), ENIYSN (SEQ ID NO: 22), SSVSSRY (SEQ ID NO: 30);

v) аминокислотную последовательность LCDR2 DTS (SEQ ID NO: 7), KVS (SEQ ID NO: 15), AAT (SEQ ID NO: 23), или GTS (SEQ ID NO: 31); и

vi) аминокислотную последовательность LCDR3 QQWSSNPPY (SEQ ID NO: 8), FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 16), QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 24), QQYHSDPLT (SEQ ID NO: 32).

2. Антигенсвязывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 43, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 44.

3. Антигенсвязывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что:

a) домен VH содержит аминокислотную последовательность HCDR1 GFNIKDEY (SEQ ID NO: 3), аминокислотную последовательность HCDR2 IDPENGDT (SEQ ID NO: 4), аминокислотную последовательность HCDR3 TGGNYVGWFPY (SEQ ID NO: 5); и

b) домен VL содержит аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSY (SEQ ID NO: 6), аминокислотную последовательность LCDR2 DTS (SEQ ID NO: 7), и аминокислотную последовательность LCDR3 QQWSSNPPY (SEQ ID NO: 8).

4. Антигенсвязывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что:

a) домен VH содержит аминокислотную последовательность HCDR1 GFSLTNYG (SEQ ID NO: 11), аминокислотную последовательность HCDR2 IWSDGGT (SEQ ID NO: 12), аминокислотную последовательность HCDR3 ARGGRSDLFAY (SEQ ID NO: 13); и

b) домен VL содержит аминокислотную последовательность LCDR1 QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 14), аминокислотную последовательность LCDR2 KVS (SEQ ID NO: 15), и аминокислотную последовательность LCDR3 FQGSHVPYT (SEQ ID

NO: 16).

5. Антигенсвязывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что:

a) домен VH содержит аминокислотную последовательность HCDR1 GNTFTDYG (SEQ ID NO: 19), или GTTFTDYG (SEQ ID NO: 41), аминокислотную последовательность HCDR2 INTNTGEP (SEQ ID NO: 20), аминокислотную последовательность HCDR3 AHYSFDY (SEQ ID NO: 21); и

b) домен VL содержит аминокислотную последовательность LCDR1 ENIYSN (SEQ ID NO: 22), аминокислотную последовательность LCDR2 AAT (SEQ ID NO: 23), и аминокислотную последовательность LCDR3 QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 24).

6. Антигенсвязывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что:

a) домен VH содержит аминокислотную последовательность HCDR1 GYTFTSYG (SEQ ID NO: 27), аминокислотную последовательность HCDR2 IYPRSGNT (SEQ ID NO: 28), аминокислотную последовательность HCDR3 AGKDYGSTYADY (SEQ ID NO: 29); и

b) домен VL содержит аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSSRY (SEQ ID NO: 30), аминокислотную последовательность LCDR2 GTS (SEQ ID NO: 31), и аминокислотную последовательность LCDR3 QQYHSDPLT (SEQ ID NO: 32).

7. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что:

a) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

b) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

c) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

d) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

e) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38;

f) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39;

g) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40;

h) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; или

i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

8. Антигенсвязывающий белок по п. 7, отличающийся тем, что домен VH и домен VL присоединены с помощью аминокислотного линкера.

9. Антигенсвязывающий белок по п. 8, отличающийся тем, что аминокислотный линкер содержит (GGGGS)n (SEQ ID NO: 148), где n представляет собой целое число от 1 до 5.

10. Антигенсвязывающий белок по п. 8, отличающийся тем, что аминокислотный линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 149), GGSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 150) или GGGSGGGGSG (SEQ ID NO: 246).

11. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок содержит фрагмент Fab, фрагмент F(ab')2, фрагмент Fd, фрагмент Fv, одноцепочечный Fv (scFv), фрагмент dAb, однодоменное антитело или нанотело.

12. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-10, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 56-71.

13. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-12, дополнительно содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 72-78.

14. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-13, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи антитела (HC) SEQ ID NO: 45, 46, 49, 53 или 54, и аминокислотную последовательность легкой цепи антитела (LC) SEQ ID NO: 47, 48, 50, 51, 52 и 55.

15. Антигенсвязывающий белок по п. 14, отличающийся тем, что:

a) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47;

b) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48;

c) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47;

d) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48;

e) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50;

f) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51;

g) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52;

h) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; или

i) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55.

16. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 189.

17. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 213.

18. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-10, содержащий:

первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 178; и

вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159.

19. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-10, содержащий:

первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193; и

вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161.

20. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-10, содержащий:

первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 179; и

вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159.

21. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-10, содержащий:

первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194; и

вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162.

22. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-10, содержащий:

первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 238;

вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159; и

третью полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 239.

23. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека со значением KD меньше чем около 5×10^{-8} M, меньше чем около 1×10^{-8} M, меньше чем около 5×10^{-9} M, меньше чем около 1×10^{-9} M, меньше чем около 5×10^{-10} M или меньше чем около 1×10^{-10} M.

24. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека в присутствии лиганда uPAR.

25. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека, связанный с лигандом uPAR.

26. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека на клетках,

экспрессирующих uPAR человека, тем самым создавая флуоресцентный сигнал, детектируемый флуоресцентно меченным антителом, которое связывается с антигенсвязывающим белком, со значением EC50 от около 0,1 нМ до около 3,0 нМ.

27. Антигенсвязывающий белок по п. 26, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека на клетках, экспрессирующих uPAR человека, в присутствии лиганда uPAR.

28. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок связывает домен DII-DIII uPAR человека или домен DIII uPAR человека.

29. Выделенный антигенсвязывающий белок, который конкурирует за связывание с антигенсвязывающим белком по любому из пп. 1-28.

30. Выделенный антигенсвязывающий белок, который связывает тот же эпитоп, что и антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-28.

31. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-30 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

32. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-30.

33. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность по п. 32.

34. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п. 33.

35. Способ получения антигенсвязывающего белка по любому из пп. 1-30, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 34 в условиях экспрессии антигенсвязывающего белка.

36. Способ по п. 35, дополнительно включающий выделение антигенсвязывающего белка из клетки-хозяина.

37. Применение антигенсвязывающего белка, который специфически связывается с uPAR, для лечения или предотвращения заболевания или нарушения, ассоциированного с активностью или экспрессией uPAR, при этом указанное применение включает введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 31 субъекту, нуждающемуся в таком лечении.

38. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 31.

39. Слитый белок, содержащий:

(i) антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-30; и

(ii) цитокин или его вариант.

40. Слитый белок по п. 39, отличающийся тем, что антигенсвязывающий белок и цитокин или его вариант связаны аминокислотным линкером.

41. Слитый белок по п. 39 или 40, отличающийся тем, что цитокин или его вариант выбран из группы, состоящей из IL-2, IL-2 с циркулярной перестановкой (cpIL-2), IL-15,

IL15 с циркулярной перестановкой (cpIL-15), IL-6, IL-6 с циркулярной перестановкой (cpIL-6), IL-10 или IL-12.

42. Слитый белок по п. 39 или 40, отличающийся тем, что цитокин или его вариант содержит по меньшей мере одну субъединицу интерлейкина-12 (IL-12).

43. Слитый белок по п. 42, отличающийся тем, что субъединица IL-12 содержит одну или обе из p35 и p40.

44. Слитый белок по п. 43, отличающийся тем, что p35 содержит одну или большее количество аминокислотных замен в положениях M12, S27, N28, Q35, F39, S44, C74, M111, V114, M119, M145, F150, L161 и D188 последовательности SEQ ID NO: 81.

45. Слитый белок по п. 44, отличающийся тем, что аминокислотная замена содержит M12S; S27D; N28R; Q35E; F39D или F39H; S44K; C74K, C74D, C74W, C74Y, или C74Q; M111F или M111W; V114I; M119L; M145L; F150Y; L161D или L161Q; D188N; или их комбинацию.

46. Слитый белок по п. 44 или 45, отличающийся тем, что аминокислотная замена содержит N28R и Q35E.

47. Слитый белок по любому из пп. 44-46, отличающийся тем, что аминокислотная замена содержит S27D и D188N.

48. Слитый белок по любому из пп. 44-47, отличающийся тем, что аминокислотная замена содержит C74K.

49. Слитый белок по любому из пп. 44-48, отличающийся тем, что аминокислотная замена содержит S27D, C74K и D188N.

50. Слитый белок по любому из пп. 44-49, отличающийся тем, что p35 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 или SEQ ID NO: 83.

51. Слитый белок по п. 43, отличающийся тем, что p40 содержит одну или большее количество аминокислотных замен в положениях C177 и C252 SEQ ID NO: 84.

52. Слитый белок по п. 51, отличающийся тем, что аминокислотная замена C177 выбрана из группы, состоящей из C177S, C177F, C177M, C177H, C177I или C177Q.

53. Слитый белок по п. 51 или 52, отличающийся тем, что аминокислотная замена C252 представляет собой C252S.

54. Слитый белок по п. 51 или 52, отличающийся тем, что p40 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87.

55. Слитый белок по п. 39 или 40, отличающийся тем, что цитокин или его вариант содержит одноцепочечный IL-12 (scIL-12), содержащий субъединицу p35 и p40, присоединенную аминокислотным линкером.

56. Слитый белок по п. 55, отличающийся тем, что аминокислотный линкер содержит последовательность GGSGGGGSGG (SEQ ID NO: 156).

57. Слитый белок по п. 55 или 56, отличающийся тем, что scIL-12 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89.

58. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок по любому из пп. 39-

57 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

59. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует слитый белок по любому из пп. 39-57.

60. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность по п. 59.

61. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п. 60.

62. Способ получения слитого белка по любому из пп. 39-57, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 61 в условиях экспрессии слитого белка.

63. Способ по п. 62, дополнительно включающий выделение слитого белка из клетки-хозяина.

64. Применение слитого белка, который специфически связывается с uPAR, для лечения или предотвращения заболевания или нарушения, ассоциированного с активностью или экспрессией uPAR, при этом указанное применение включает введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композициипо п. 58 или слитого белка по любому из пп. 39-57 субъекту, нуждающемуся в таком лечении.

65. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 52 или слитого белка по любому из пп. 39-57.

66. Способ по п. 65, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию или слитый белок вводят одновременно с цитокином или его вариантом или вторым слитым белком, при этом второй слитый белок содержит цитокин или его вариант, отличный от первого слитого белка.

67. Способ по п. 65, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию или слитый белок вводят последовательно с цитокином или его вариантом или вторым слитым белком, при этом второй слитый белок содержит цитокин или его вариант, отличный от первого слитого белка.

68. Способ по п. 66 или 67, отличающийся тем, что цитокин или его вариант содержит субъединицу p35 IL-12 или субъединицу p40 IL-12.

69. Способ по любому из пп. 65-68, отличающийся тем, что скорость клиренса слитого белка из опухоли пациента ниже, чем скорость клиренса слитого белка из сыворотки пациента.

70. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка и неслитой субъединицы IL-12, при этом:

(a) слитый белок содержит:

(i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с рецептором урокиназного активатора плазминогена (uPAR); и

(ii) субъединицу p35 IL-12 или ее вариант, или субъединицу p40 IL-12 или ее вариант; и

(b) неслитую субъединицу IL-12, содержащую субъединицу p35 IL-12 или ее

вариант, или субъединицу p40 IL-12 или ее вариант,

при этом, когда слитый белок содержит субъединицу p35 IL-12 или ее вариант, неслитая субъединица IL-12 содержит субъединицу p40 IL-12 или ее вариант, и когда слитый белок содержит субъединицу p40 IL-12 или ее вариант, неслитая субъединица IL-12 содержит субъединицу p35 IL-12 или ее вариант.

71. Способ по п. 70, отличающийся тем, что слитый белок и неслитую субъединицу IL-12 вводят последовательно.

72. Способ по п. 70 или 71, отличающийся тем, что один или оба из указанных агентов: слитый белок и неслитая субъединица IL-12, вводят внутривенно

73. Способ по любому из пп. 70-72, отличающийся тем, что сначала вводят слитый белок, а затем вводят неслитую субъединицу IL-12 после того, как пройдет достаточно времени для накопления слитого белка в опухоли пациента.

74. Способ по любому из пп. 70-72, отличающийся тем, что сначала вводят слитый белок, а затем вводят неслитую субъединицу IL-12 после того, как пройдет достаточно времени для существенного снижения концентрации слитого белка в сыворотке пациента.

75. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества первого слитого белка и второго слитого белка, при этом:

(a) первый слитый белок содержит:

(i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с первым эпитопом рецептора урокиназного активатора плазминогена (uPAR); и

(ii) субъединицу p35 IL-12 или ее вариант; и

(b) второй слитый белок содержит:

(i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается со вторым эпитопом uPAR; и

(ii) субъединицу p40 IL-12 или ее вариант.

76. Способ по п. 75, отличающийся тем, что первый эпитоп и второй эпитоп являются одинаковыми.

77. Способ по п. 75, отличающийся тем, что первый эпитоп и второй эпитоп отличаются.

78. Способ по любому из пп. 75-77, отличающийся тем, что первый слитый белок и второй слитый белок вводят последовательно.

79. Способ по любому из пп. 75-78, отличающийся тем, что один или оба из указанных агентов: первый слитый белок и второй слитый белок, вводят внутривенно.

80. Способ по любому из пп. 75-79, отличающийся тем, что сначала вводят первый слитый белок, а затем вводят второй слитый белок после того, как пройдет достаточно времени для накопления первого слитого белка в опухоли пациента.

81. Способ по любому из пп. 75-79, отличающийся тем, что сначала вводят первый слитый белок, а затем вводят второй слитый белок после того, как пройдет достаточно времени для существенного снижения концентрации первого слитого белка в сыворотке

пациента.

82. Способ по любому из пп. 75-79, отличающийся тем, что сначала вводят второй слитый белок, а затем вводят первый слитый белок после того, как пройдет достаточно времени для накопления второго слитого белка в опухоли пациента.

83. Способ по любому из пп. 75-79, отличающийся тем, что сначала вводят второй слитый белок, а затем вводят первый слитый белок после того, как пройдет достаточно времени для существенного снижения концентрации второго слитого белка в сыворотке пациента.

84. Способ по любому из пп. 75-83, отличающийся тем, что один или оба из указанных агентов: первый слитый белок и второй слитый белок, содержат антигенсвязывающий белок, содержащий:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GFNIKDEY (SEQ ID NO: 3), аминокислотную последовательность HCDR2 IDPENGDT (SEQ ID NO: 4), аминокислотную последовательность HCDR3 TGGNYVGWFPY (SEQ ID NO: 5); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSY (SEQ ID NO: 6), аминокислотную последовательность LCDR2 DTS (SEQ ID NO: 7), и аминокислотную последовательность LCDR3 QQWSSNPPY (SEQ ID NO: 8).

85. Способ по любому из пп. 75-83, отличающийся тем, что один или оба из указанных агентов: первый слитый белок и второй слитый белок, содержат антигенсвязывающий белок, содержащий:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GNTFTDYG (SEQ ID NO: 19), или GTTFTDYG (SEQ ID NO: 41), аминокислотную последовательность HCDR2 INTNTGEP (SEQ ID NO: 20), аминокислотную последовательность HCDR3 AHYSFDY (SEQ ID NO: 21); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 ENIYSN (SEQ ID NO: 22), аминокислотную последовательность LCDR2 AAT (SEQ ID NO: 23), и аминокислотную последовательность LCDR3 QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 24).

86. Способ по любому из пп. 75-83, отличающийся тем, что один или оба из указанных агентов: первый слитый белок и второй слитый белок, содержат антигенсвязывающий белок, содержащий:

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность HCDR1 GYTFTSYG (SEQ ID NO: 27), аминокислотную последовательность HCDR2 IYPRSGNT (SEQ ID NO: 28), аминокислотную последовательность HCDR3 AGKDYGSTYADY (SEQ ID NO: 29); и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSSRY (SEQ ID NO: 30), аминокислотную последовательность LCDR2 GTS (SEQ ID NO: 31), и аминокислотную последовательность LCDR3 QQYHSDPLT (SEQ ID NO: 32).

87. Комбинация, содержащая первый слитый белок и второй слитый белок, в которой:

(a) первый слитый белок содержит:

(i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с первым эпитопом рецептора урокиназного активатора плазминогена (uPAR); и

(ii) субъединицу p35 IL-12 или ее вариант; и

(b) второй слитый белок содержит:

(i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается со вторым эпитопом uPAR; и

(ii) субъединицу p40 IL-12 или ее вариант.

88. Комбинация по п. 87, отличающаяся тем, что первый эпитоп и второй эпитоп являются одинаковыми.

89. Комбинация по п. 87, отличающаяся тем, что первый эпитоп и второй эпитоп отличаются.

90. Слитый белок, содержащий:

(i) антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с рецептором урокиназного активатора плазминогена (uPAR); и

(ii) цитокин или его вариант.

91. Слитый белок по п. 90, отличающийся тем, что антигенсвязывающий белок и цитокин или его вариант связаны аминокислотным линкером.

92. Слитый белок по п. 90 или 91, отличающийся тем, что цитокин или его вариант выбран из группы, состоящей из IL-2, IL-2 с циркулярной перестановкой (cpIL-2), IL-15, IL-15 с циркулярной перестановкой (cpIL-15), IL-6, IL-6 с циркулярной перестановкой (cpIL-6), IL-10 или IL-12.

93. Слитый белок по п. 90 или 91, отличающийся тем, что цитокин или его вариант содержит по меньшей мере одну субъединицу интерлейкина-12 (IL-12).

94. Слитый белок по п. 93, отличающийся тем, что субъединица IL-12 содержит одну или обе из p35 и p40.

95. Слитый белок по п. 94, отличающийся тем, что p35 содержит одну или большее количество аминокислотных замен в положениях M12, S27, N28, Q35, F39, S44, C74, M111, V114, M119, M145, F150, L161 и D188 последовательности SEQ ID NO: 81.

96. Слитый белок по п. 95, отличающийся тем, что аминокислотная замена содержит M12S; S27D; N28R; Q35E; F39D или F39H; S44K; C74K, C74D, C74W, C74Y, или C74Q; M111F или M111W; V114I; M119L; M145L; F150Y; L161D или L161Q; D188N; или их комбинацию.

97. Слитый белок по п. 95 или 96, отличающийся тем, что аминокислотная замена содержит N28R и Q35E.

98. Слитый белок по любому из пп. 95-97, отличающийся тем, что аминокислотная замена содержит S27D и D188N.

99. Слитый белок по любому из пп. 95-98, отличающийся тем, что аминокислотная замена содержит C74K.

100. Слитый белок по любому из пп. 95-99, отличающийся тем, что

аминокислотная замена содержит S27D, C74K и D188N.

101. Слитый белок по любому из пп. 95-100, отличающийся тем, что p35 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 или SEQ ID NO: 83.

102. Слитый белок по п. 94, отличающийся тем, что p40 содержит одну или большее количество аминокислотных замен в положениях C177 и C252 SEQ ID NO: 84.

103. Слитый белок по п. 102, отличающийся тем, что аминокислотная замена C177 выбрана из группы, состоящей из C177S, C177F, C177M, C177H, C177I или C177Q.

104. Слитый белок по п. 102 или 103, отличающийся тем, что аминокислотная замена C252 представляет собой C252S.

105. Слитый белок по любому из пп. 102-104, отличающийся тем, что p40 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87.

106. Слитый белок по любому из пп. 90-93, отличающийся тем, что цитокин или его вариант содержит одноцепочечный IL-12 (scIL-12), содержащий субъединицу p35 и p40, присоединенную аминокислотным линкером.

107. Слитый белок по п. 106, отличающийся тем, что аминокислотный линкер содержит последовательность GGSGGGGSGG (SEQ ID NO: 156).

108. Слитый белок по п. 106 или 107, отличающийся тем, что scIL-12 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89.

109. Слитый белок по любому из пп. 90-108, отличающийся тем, что антигенсвязывающий белок содержит:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела, содержащий:

i) аминокислотную последовательность HCDR1 GFNIKDEY (SEQ ID NO: 3), GFSLTNYG (SEQ ID NO: 11), GNTFTDYG (SEQ ID NO: 19), GTTFTDYG (SEQ ID NO: 41), или GYTFTSYG (SEQ ID NO: 27);

ii) аминокислотную последовательность HCDR2 IDPENGDT (SEQ ID NO: 4), IWSDGGT (SEQ ID NO: 12), INTNTGEP (SEQ ID NO: 20), или IYPRSGNT (SEQ ID NO: 28); и

iii) аминокислотную последовательность HCDR3 TGGNYVGWFPY (SEQ ID NO: 5), ARGGRSDLFAY (SEQ ID NO: 13), AHYSFDY (SEQ ID NO: 21), или AGKDYGSTYADY (SEQ ID NO: 29); и

(b) вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела, содержащий:

iv) аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSY (SEQ ID NO: 6), QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 14), ENIYSN (SEQ ID NO: 22), SSVSSRY (SEQ ID NO: 30);

v) аминокислотную последовательность LCDR2 DTS (SEQ ID NO: 7), KVS (SEQ ID NO: 15), AAT (SEQ ID NO: 23), или GTS (SEQ ID NO: 31); и

vi) аминокислотную последовательность LCDR3 QQWSSNPPY (SEQ ID NO: 8), FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 16), QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 24), QQYHSDPLT (SEQ ID NO: 32).

110. Слитый белок по п. 109, отличающийся тем, что домен VH содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 43, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 44.

111. Слитый белок по п. 109, отличающийся тем, что:

a) домен VH содержит аминокислотную последовательность HCDR1 GFNIKDEY (SEQ ID NO: 3), аминокислотную последовательность HCDR2 IDPENGDT (SEQ ID NO: 4), аминокислотную последовательность HCDR3 TGGNYVGWFPY (SEQ ID NO: 5); и

b) домен VL содержит аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSY (SEQ ID NO: 6), аминокислотную последовательность LCDR2 DTS (SEQ ID NO: 7), и аминокислотную последовательность LCDR3 QQWSSNPPY (SEQ ID NO: 8).

112. Слитый белок по п. 109, отличающийся тем, что:

a) домен VH содержит аминокислотную последовательность HCDR1 GFSLTNYG (SEQ ID NO: 11), аминокислотную последовательность HCDR2 IWSDGGT (SEQ ID NO: 12), аминокислотную последовательность HCDR3 ARGGRSDLFAY (SEQ ID NO: 13); и

b) домен VL содержит аминокислотную последовательность LCDR1 QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 14), аминокислотную последовательность LCDR2 KVS (SEQ ID NO: 15), и аминокислотную последовательность LCDR3 FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 16).

113. Слитый белок по п. 109, отличающийся тем, что:

a) домен VH содержит аминокислотную последовательность HCDR1 GNTFTDYG (SEQ ID NO: 19), или GTTFTDYG (SEQ ID NO: 41), аминокислотную последовательность HCDR2 INTNTGEP (SEQ ID NO: 20), аминокислотную последовательность HCDR3 AHYSFDY (SEQ ID NO: 21); и

b) домен VL содержит аминокислотную последовательность LCDR1 ENIYSN (SEQ ID NO: 22), аминокислотную последовательность LCDR2 AAT (SEQ ID NO: 23), и аминокислотную последовательность LCDR3 QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 24).

114. Слитый белок по п. 109, отличающийся тем, что:

a) домен VH содержит аминокислотную последовательность HCDR1 GYTFTSYG (SEQ ID NO: 27), аминокислотную последовательность HCDR2 IYPRSGNT (SEQ ID NO: 28), аминокислотную последовательность HCDR3 AGKDYGSTYADY (SEQ ID NO: 29); и

b) домен VL содержит аминокислотную последовательность LCDR1 SSVSSRY (SEQ ID NO: 30), аминокислотную последовательность LCDR2 GTS (SEQ ID NO: 31), и аминокислотную последовательность LCDR3 QQYHSDPLT (SEQ ID NO: 32).

115. Слитый белок по любому из пп. 109-114, отличающийся тем, что:

a) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

b) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

c) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и

домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

d) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

e) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38;

f) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39;

g) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40;

h) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; или

i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

116. Слитый белок по п. 115, отличающийся тем, что домен VH и домен VL присоединены с помощью аминокислотного линкера.

117. Слитый белок по п. 116, отличающийся тем, что аминокислотный линкер содержит (GGGGS)n (SEQ ID NO: 148), где n представляет собой целое число от 1 до 5.

118. Слитый белок по п. 116, отличающийся тем, что аминокислотный линкер содержит последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 149), GGSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 150), GGGSGGGGSG ()SEQ ID NO: 246).

119. Слитый белок по любому из пп. 90-118, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок содержит фрагмент Fab, фрагмент F(ab')2, фрагмент Fd, фрагмент Fv, одноцепочечный Fv (scFv), фрагмент dAb, однодоменное антитело или нанотело.

120. Слитый белок по любому из пп. 90-119, отличающийся тем, что антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 56-71.

121. Слитый белок по любому из пп. 90-119, отличающийся тем, что антигенсвязывающий белок дополнительно содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 72-78.

122. Слитый белок по любому из пп. 90-119, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи антитела (HC) SEQ ID NO: 45, 46, 49, 53 или 54, и аминокислотную последовательность легкой цепи антитела (LC) SEQ ID NO: 47, 48, 50, 51, 52 и 55.

123. Слитый белок по п. 122, отличающийся тем, что:

a) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47;

b) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48;

c) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47;

d) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48;

e) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50;

f) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51;

g) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52;

h) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; или

i) HC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и LC антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55.

124. Слитый белок по любому из пп. 90-118, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 189.

125. Слитый белок по любому из пп. 90-118, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213.

126. Слитый белок по любому из пп. 90-118, содержащий:

первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 178; и

вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159.

127. Слитый белок по любому из пп. 90-118, содержащий:

первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193; и

вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161.

128. Слитый белок по любому из пп. 90-118, содержащий:

первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 179; и

вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159.

129. Слитый белок по любому из пп. 90-118, содержащий:

первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194; и

вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162.

130. Слитый белок по любому из пп. 90-118, содержащий:

первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 238;

вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159; и

третью полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 239.

131. Слитый белок по любому из пп. 90-130, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека со значением KD меньше чем около 5×10^{-8} M, меньше чем около 1×10^{-8} M, меньше чем около 5×10^{-9} M, меньше чем около 1×10^{-9} M, меньше чем около 5×10^{-10} M или меньше чем около 1×10^{-10} M.

132. Слитый белок по любому из пп. 90-130, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека в присутствии лиганда uPAR.

133. Слитый белок по любому из пп. 90-130, отличающийся тем, что антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека, связанный с лигандом uPAR.

134. Слитый белок по любому из пп. 90-130, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека на клетках, экспрессирующих uPAR человека, тем самым создавая флуоресцентный сигнал, детектируемый флуоресцентно меченным антителом, которое связывается с антителом или его фрагментом, со значением EC50 от около 0,1 нМ до около 3,0 нМ.

135. Слитый белок по любому из пп. 90-130, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок связывает uPAR человека на клетках, экспрессирующих uPAR человека, в присутствии лиганда uPAR.

136. Слитый белок по любому из пп. 90-130, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий белок связывает домен DII-DIII uPAR человека или домен DIII uPAR человека.

137. Сконструированный полипептид p35 IL-12, содержащий одну или большее количество аминокислотных замен в положениях S27, N28, Q35, F39, S44, C74, M111, V114, M119, M145, F150, и L161 SEQ ID NO: 81.

138. Сконструированный полипептид p35 IL-12 по п. 137, дополнительно содержащий одну или обе аминокислотные замены S27 и D188.

139. Сконструированный полипептид p35 IL-12 по п. 137 или 138, отличающийся тем, что аминокислотная замена содержит M12S; S27D; N28R; Q35E; F39D или F39H; S44K; C74K, C74D, C74W, C74Y, или C74Q; M111F или M111W; V114I; M119L; M145L; F150Y; L161D или L161Q; D188N; или их комбинацию.

140. Сконструированный полипептид p35 IL-12 по любому из пп. 137-139, отличающийся тем, что аминокислотная замена содержит N28R и Q35E.

141. Сконструированный полипептид p35 IL-12 по любому из пп. 137-140, отличающийся тем, что аминокислотная замена содержит C74K.

142. Сконструированный полипептид p35 IL-12 по любому из пп. 137-141, отличающийся тем, что аминокислотная замена содержит S27D, C74K и D188N.

143. Сконструированный полипептид p35 IL-12 по любому из пп. 137-142,

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 или SEQ ID NO: 83.

144. Слитый белок, содержащий:

(i) сконструированный полипептид p35 IL-12 по любому из пп. 137-143; и

(ii) один или большее количество партнеров по слиянию.

145. Слитый белок по п. 144, отличающийся тем, что один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который снижает агрегацию сконструированного полипептида p35 IL-12.

146. Слитый белок по п. 144, отличающийся тем, что один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который увеличивает экспрессию сконструированного полипептида p35 IL-12.

147. Слитый белок по п. 144, отличающийся тем, что один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который увеличивает период полужизни сконструированного полипептида p35 IL-12 в сыворотке.

148. Слитый белок по любому из пп. 144-147, отличающийся тем, что один или большее количество партнеров по слиянию содержат нацеливающийся фрагмент.

149. Слитый белок по любому из пп. 144-148, отличающийся тем, что один или большее количество партнеров по слиянию содержат сывороточный альбумин, полиэтиленгликоль (PEG) или антигенсвязывающий белок.

150. Слитый белок по п. 149, отличающийся тем, что антигенсвязывающий белок специфически связывается с рецептором урокиназного активатора плазминогена (uPAR).

151. Сконструированный полипептид p40 IL-12, содержащий одну или большее количество аминокислотных замен в положениях C177 и C252 последовательности SEQ ID NO: 84.

152. Сконструированный полипептид p40 IL-12 по п. 151, отличающийся тем, что аминокислотная замена C177 выбрана из группы, состоящей из C177S, C177F, C177M, C177H, C177I или C177Q.

153. Сконструированный полипептид p40 IL-12 по п. 151 или 152, отличающийся тем, что аминокислотная замена C252 представляет собой C252S.

154. Сконструированный полипептид p40 IL-12 по любому из пп. 151-153, отличающийся тем, что p40 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87.

155. Слитый белок, содержащий:

(i) сконструированный полипептид p40 IL-12 по любому из пп. 151-154; и

(ii) один или большее количество партнеров по слиянию.

156. Слитый белок по п. 155, отличающийся тем, что один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который снижает агрегацию сконструированного полипептида p40 IL-12.

157. Слитый белок по п. 155, отличающийся тем, что один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который увеличивает экспрессию

сконструированного полипептида p40 IL-12.

158. Слитый белок по п. 155, отличающийся тем, что один или большее количество партнеров по слиянию содержат фрагмент, который увеличивает период полужизни сконструированного полипептида p40 IL-12 в сыворотке.

159. Слитый белок по любому из пп. 155-158, отличающийся тем, что один или большее количество партнеров по слиянию содержат нацеливающийся фрагмент.

160. Слитый белок по любому из пп. 155-159, отличающийся тем, что один или большее количество партнеров по слиянию содержат сывороточный альбумин, полиэтиленгликоль (PEG) или антигенсвязывающий белок.

161. Слитый белок по п. 160, отличающийся тем, что антигенсвязывающий белок специфически связывается с рецептором урокиназного активатора плазминогена (uPAR).

162. Слитый белок, содержащий:

(i) полипептид, связывающий рецептор урокиназного активатора плазминогена (uPAR); и

(ii) цитокин или его вариант.

163. Слитый белок по п. 162, отличающийся тем, что полипептид, связывающий uPAR, связан с цитокином с помощью аминокислотного линкера.

164. Слитый белок по п. 162 или 163, отличающийся тем, что цитокин содержит его функциональный фрагмент, его функциональный вариант или его вариант с циркулярной перестановкой.

165. Слитый белок по любому из пп. 162-164, отличающийся тем, что цитокин связан через один или большее количество необязательных аминокислотных линкеров со всем или частью рецептора, в отношении которого этот цитокин обладает специфичностью связывания.

166. Слитый белок по любому из пп. 162-165, отличающийся тем, что полипептид, связывающий uPAR, содержит полипептид урокиназного активатора плазминогена (uPA) или его вариант, способный специфически связывать uPAR.

167. Слитый белок по п. 166, отличающийся тем, что вариант uPA представляет собой аминокислотный концевой фрагмент (ATF) uPA.

168. Слитый белок по п. 167, отличающийся тем, что ATF имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 91, или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 91.

169. Слитый белок по п. 167 или 168, отличающийся тем, что ATF uPA содержит одну или большее количество аминокислотных замен или делеций.

170. Слитый белок по п. 166, отличающийся тем, что uPA содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 90, или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 90.

171. Слитый белок по любому из пп. 162-170, отличающийся тем, что цитокин

представляет собой IL-2 с циркулярной перестановкой, а рецептор представляет собой IL-2Rα.

172. Слитый белок по любому из пп. 162-170, отличающийся тем, что цитокин представляет собой IL-15 с циркулярной перестановкой, а рецептор представляет собой IL-15Rα.

173. Слитый белок по любому из пп. 162-170, отличающийся тем, что цитокин представляет собой IL-1 с циркулярной перестановкой, а рецептор представляет собой IL-1RI, IL-1RII.

174. Слитый белок по любому из пп. 162-165, отличающийся тем, что полипептид, связывающий uPAR, представляет собой антигенсвязывающий белок анти-uPAR.

175. Слитый белок по любому из пп. 162-165, отличающийся тем, что полипептид, связывающий uPAR, представляет собой scFv-фрагмент антитела анти-uPAR.

176. Слитый белок по любому из пп. 162-165, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 98, 99, 100, 106, 107, 111 и 113.

177. Слитый белок по любому из пп. 162-165, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98, 99, 111 и 112.

178. Слитый белок по любому из пп. 162-177, отличающийся тем, что uPAR-связывающий агент, цитокин и рецептор имеют человеческое происхождение.

179. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка по любому из пп. 162-178.

180. Способ по п. 179, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из: меланомы, карциномы, бластомы и лимфомы.

181. Способ лечения воспалительного заболевания у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка по любому из пп. 162-178.

182. Способ по п. 181, отличающийся тем, что воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из IBD и RA.

183. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один слитый белок по любому из пп. 162-178 и необязательно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

184. Слитый белок, содержащий:

полипептид, связывающий рецептор урокиназного активатора плазминогена (uPAR), связанный через один или большее количество необязательных аминокислотных линкеров с:

(i) цитокином или его вариантом; или

(ii) модулятором молекулы контрольной точки.

185. Слитый белок по п. 184, отличающийся тем, что цитокин содержит его функциональный фрагмент, его функциональный вариант или его вариант с циркулярной перестановкой.

186. Слитый белок по п. 184 или 185, отличающийся тем, что цитокин связан через один или большее количество необязательных аминокислотных линкеров со всем или частью рецептора, в отношении которого этот цитокин обладает специфичностью связывания.

187. Слитый белок по любому из пп. 184-186, отличающийся тем, что полипептид, связывающий uPAR, содержит полипептид урокиназного активатора плазминогена (uPA) или его вариант, способный специфически связывать uPAR.

188. Слитый белок по п. 187, отличающийся тем, что вариант uPA представляет собой аминокислотный концевой фрагмент (ATF) uPA.

189. Слитый белок по п. 187 или 188, отличающийся тем, что ATF содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 91, или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 91.

190. Слитый белок по п. 188 или 189, отличающийся тем, что ATF uPA содержит одну или большее количество аминокислотных замен или делеций.

191. Слитый белок по любому из пп. 184-190, отличающийся тем, что цитокин или модулятор молекулы контрольной точки выбраны из группы, состоящей из: IL-2, IL-2 с циркулярной перестановкой (cpIL-2), IL-15, IL15 с циркулярной перестановкой (cpIL-15), IL-6, IL-6 с циркулярной перестановкой (cpIL-6), IL-10, IL-12, IL-15, GM-CSF, IFNγ, IFNα, 4-1BBB (CD131) или его лиганда, OX40 или его лиганда, PD-1, PD-L1, антитела анти-PD-1, CTLA-4, антитела анти-CTLA4, GITR или его лиганда, ICOS или его лиганда, CD27, CD70, CD40 или их лиганда.

192. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка по любому из пп. 184-191.

193. Способ по п. 192, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из: меланомы и лимфомы.

194. Способ лечения воспалительного заболевания у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка по любому из пп. 184-191.

195. Способ по п. 194, отличающийся тем, что воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из IBD и RA.

196. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один слитый белок по любому из пп. 184-191 и необязательно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

197. Способ иммунотерапии для лечения рака у пациента, включающий введение слитого белка по пп. 162 или 184 пациенту, нуждающемуся в этом.

198. Способ по п. 197, дополнительно включающий введение пациенту таргетной противораковой терапии.

199. Способ по п. 198, дополнительно включающий введение пациенту

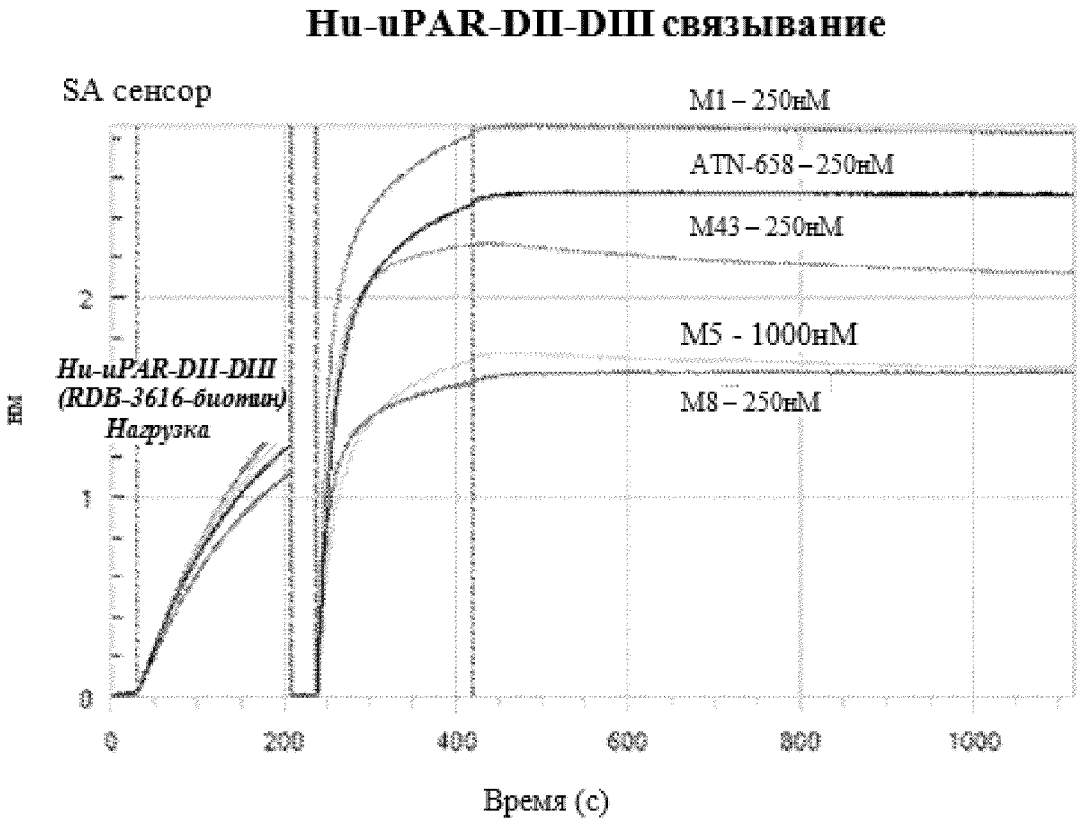
традиционной цитотоксической терапии, выбранной из химиотерапии, лучевой терапии или того и другого.

200. Способ по любому из пп. 197-199, дополнительно включающий введение иммунотерапии, выбранной из противораковой вакцины, ингибитора контрольной точки или моноклонального антитела.

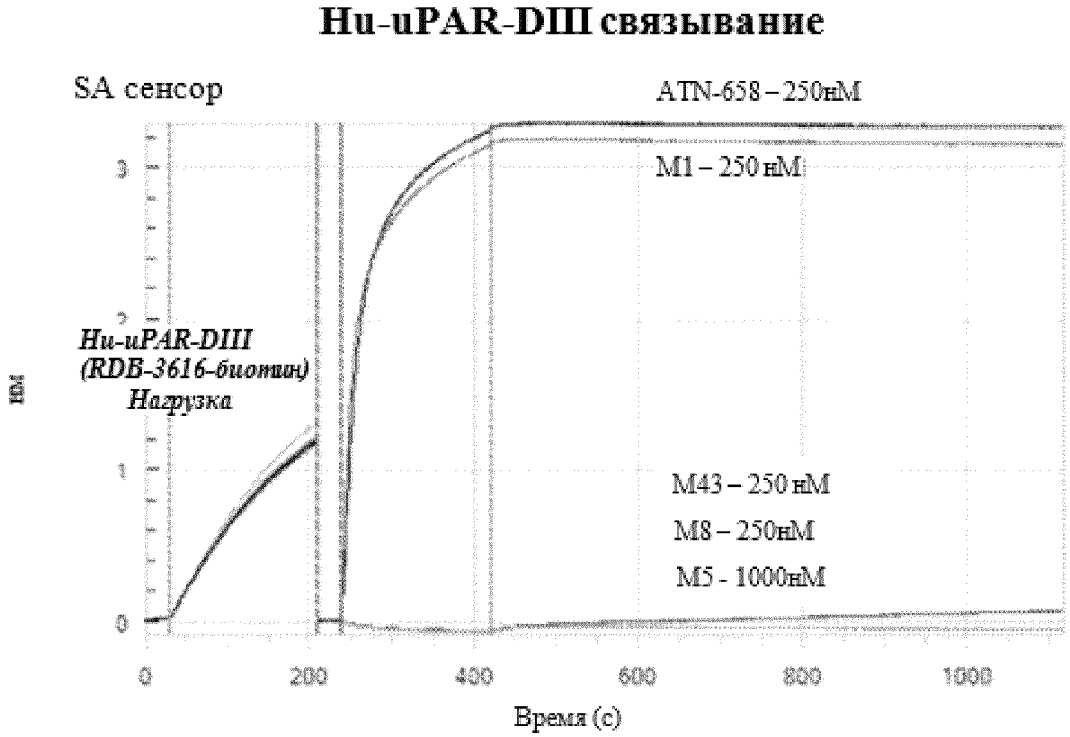
201. Слитый белок по пп. 162 или 184, отличающийся тем, что полипептид, связывающий uPAR, содержит M25 или гомологичную ему аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности на аминокислотном уровне.

202. Слитый белок по пп. 162 или 184, отличающийся тем, что полипептид, связывающий uPAR, содержит P25 или гомологичную ему аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности на аминокислотном уровне.

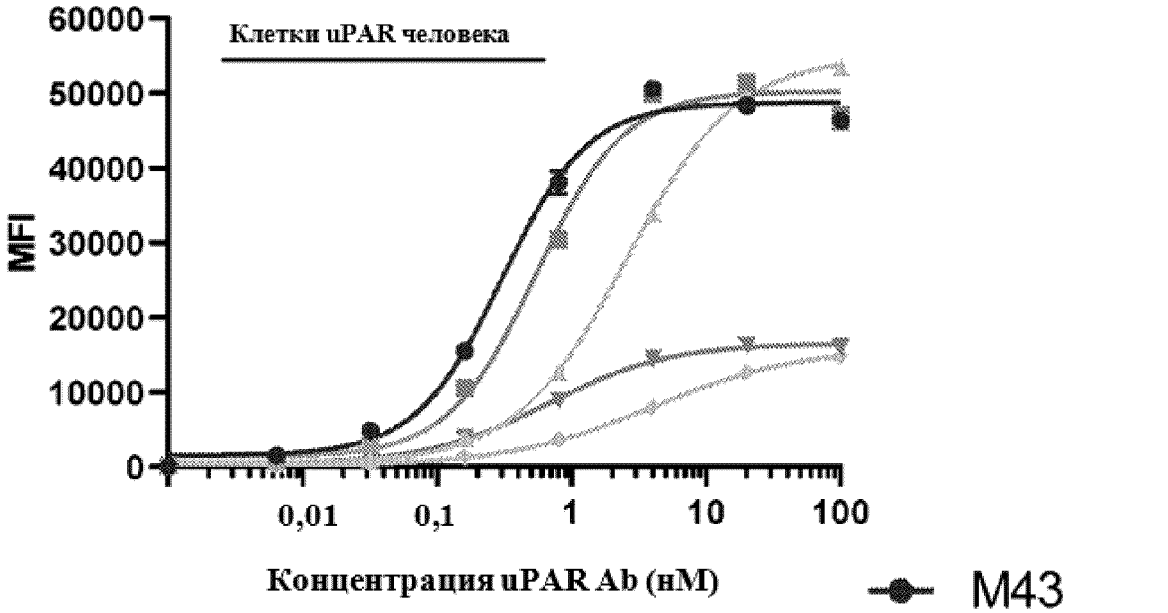
По доверенности


Hu-uPAR-DII-DIII связывание
SA сенсор
M1 – 250нМ
ATN-658 – 250нМ
M43 – 250нМ
M5 - 1000нМ
M8 – 250нМ
Hu-uPAR-DII-DIII
(RDB-3616-биотин)
Нагрузка
нм
0
1
2
0
200
400
600
800
1000
Время (с)

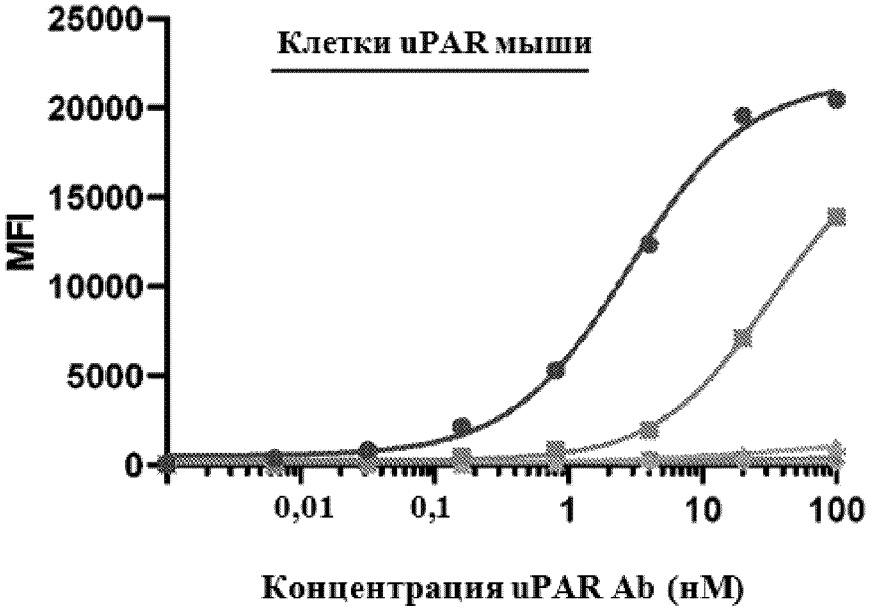
Фиг. 1A


Hu-uPAR-DIII связывание
SA сенсор
ATN-658 – 250нМ
M1 – 250 нМ
M43 – 250 нМ
M8 – 250нМ
M5 - 1000нМ
Hu-uPAR-DIII
(RDB-3616-биотин)
Нагрузка
нм
0
1
2
3
0
200
400
600
800
1000
Время (с)

Фиг. 1B


Клетки uPAR человека
MFI
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация uPAR Ab (нМ)
M43
M8
M5
M1
ATN-658

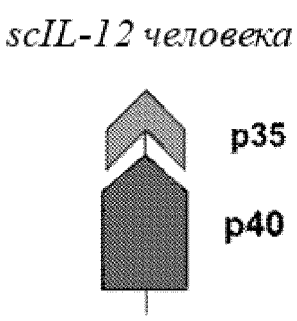
Фиг. 2A


Клетки uPAR мыши
MFI
25000
20000
15000
10000
5000
0
0,01
0,1
1
10
100
Концентрация uPAR Ab (нМ)

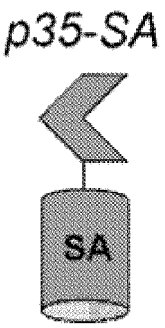
Фиг. 2B

Фиг. 3

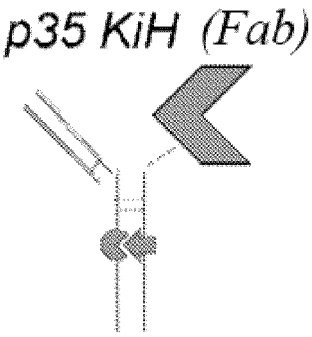
Отклик от дисульфидных пар Octet
Отклик (нм)
0,7
0,5
0,3
0,1
-0,1
K-S
W-Y
W-F
W-S
W-M
Y-M
Q-Y
K-M
Y-H
D-F
D-H
D-M
W-W
Q-H
W-I
W-Q
K-Q
Y-R
D-Q
W-N
K-W
K-I
Y-K
D-I
K-K
K-N
K-R
D-K
S(ss1)-Y
S-Y
S(ss1)-F
S(ss1)-S
R-R
S-W
R-K
S(ss1)-M
S-Q
S-H
S-S
R-Q
S-N
S-K
S-R
R-Y
R-F
S(ss1)-Q
S(ss1)-W
S(ss1)-N
p35-p40 дисульфидный мутант



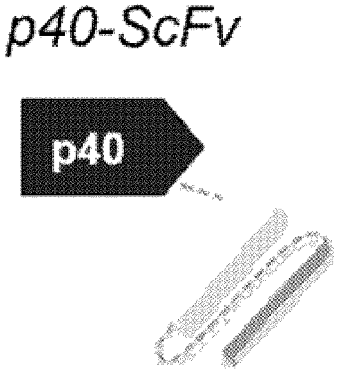
Фиг. 4A



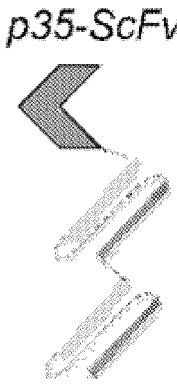
Фиг. 4B



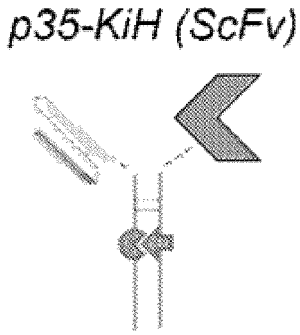
Фиг. 4C



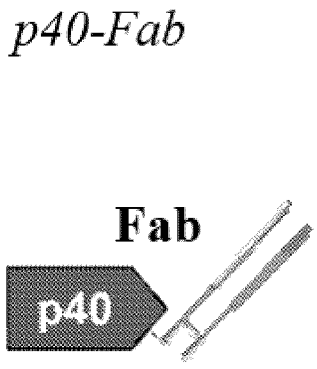
Фиг. 4D



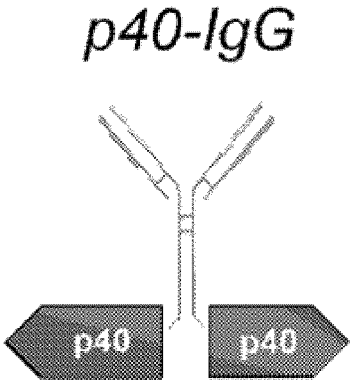
Фиг. 4E



Фиг. 4F

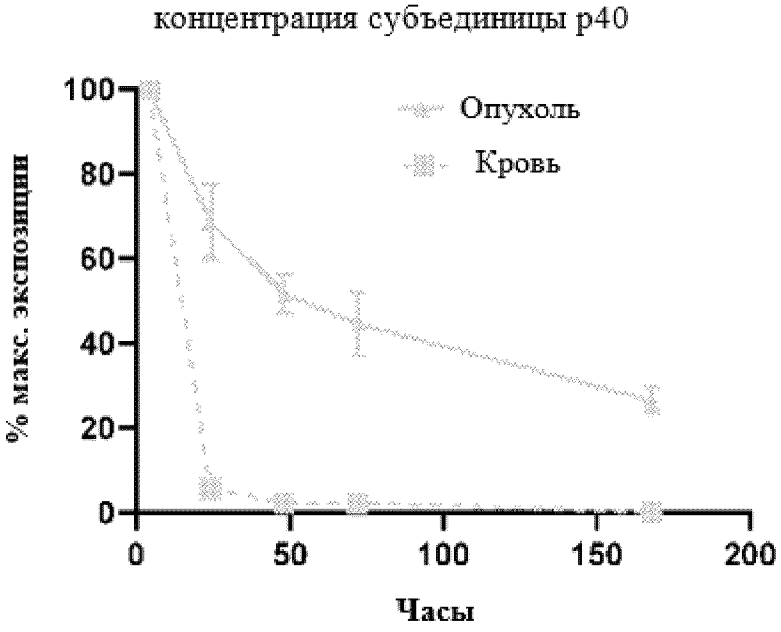


Фиг. 4G

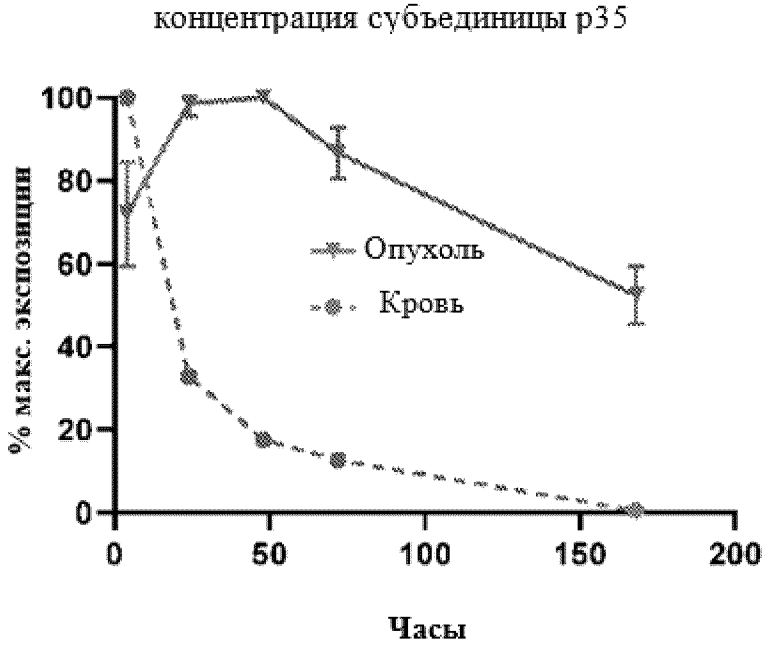


Фиг. 4H

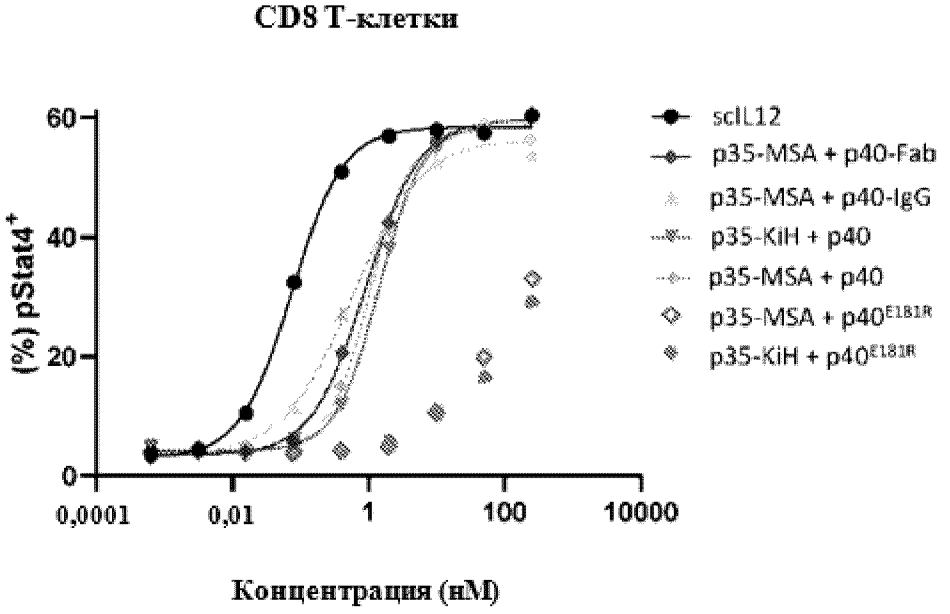
Фармакокинетика в опухоли и сыворотки крови по данным PET/CT-визуализации радиоактивно меченных субъединиц, нацеленных на опухоль



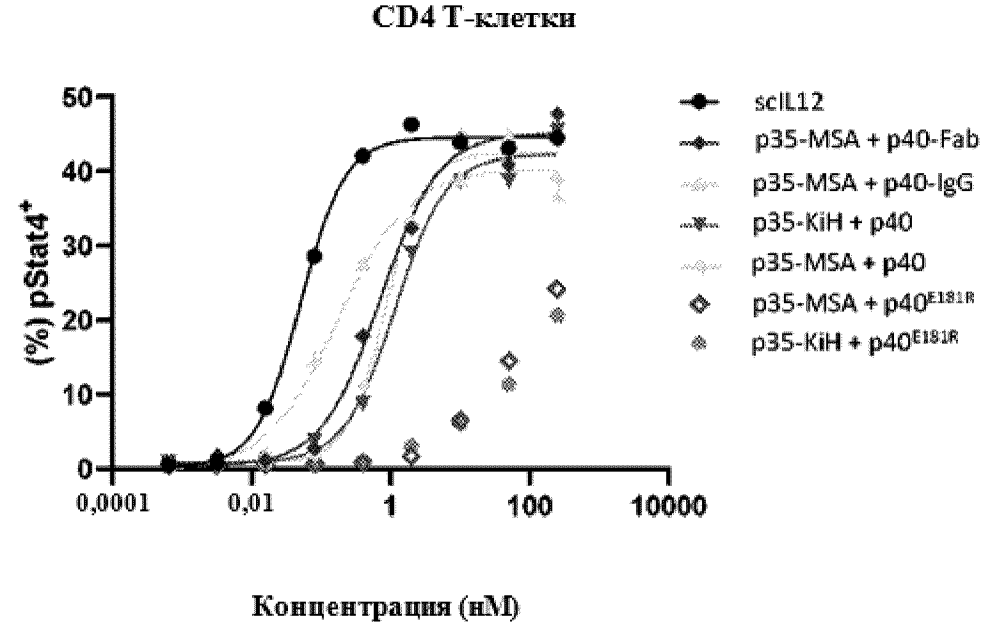
Фиг. 5A



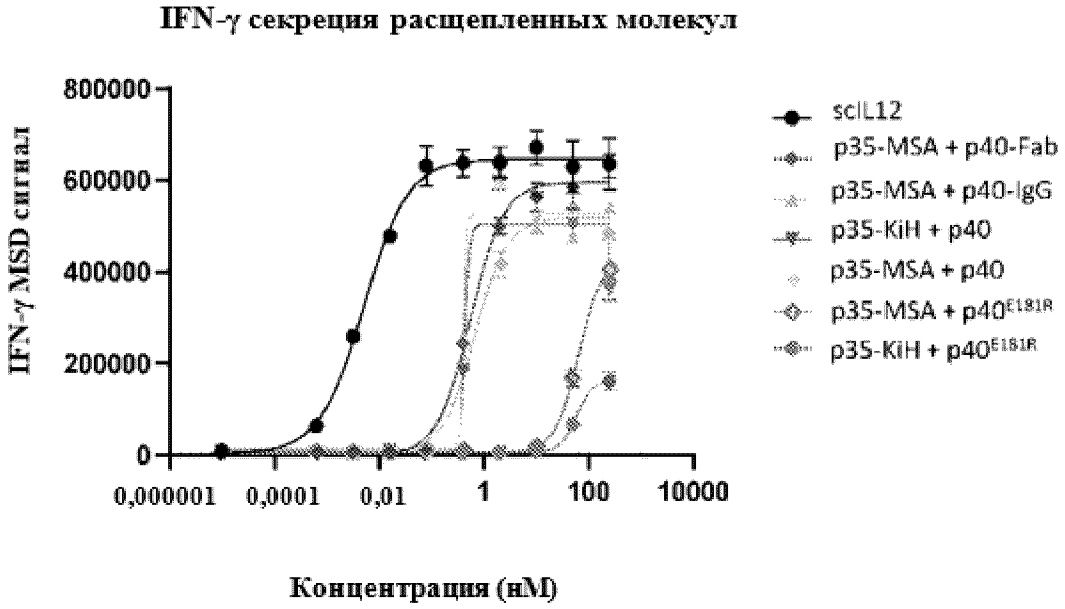
Фиг. 5B


CD8 T-клетки
60
40
20
0
(%) pStat4+
0,0001
0,01
1
100
10000
Концентрация (нМ)
scIL12
p35-MSA + p40-Fab
p35-MSA + p40-IgG
p35-KiH + p40
p35-MSA + p40
p35-MSA + p40E181R
p35-KiH + p40E181R

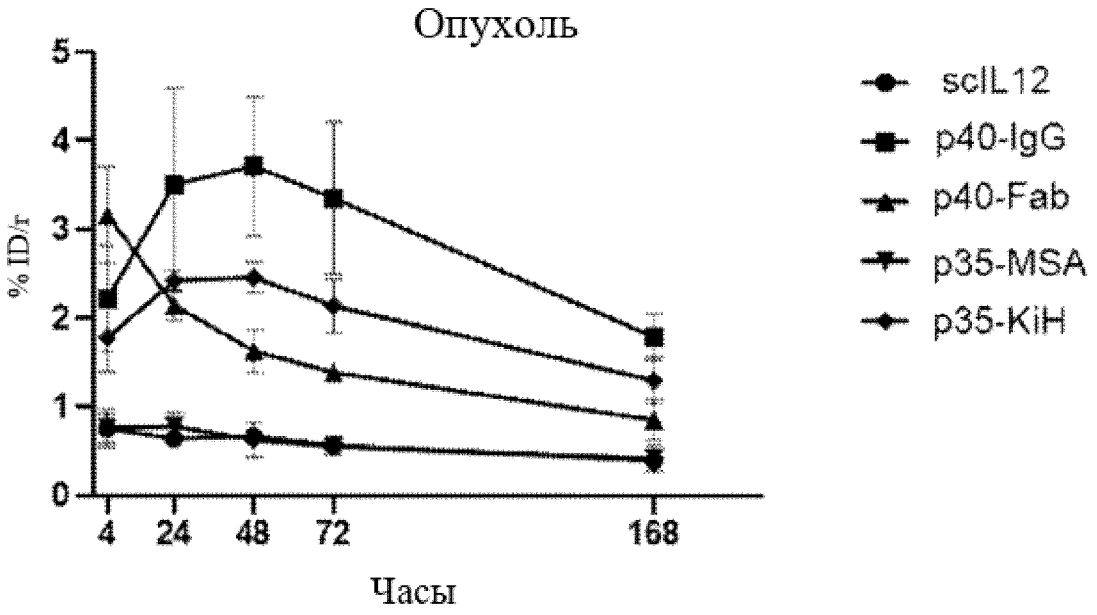
Фиг. 6A


CD4 T-клетки
50
40
30
20
10
0
(%) pStat4+
0,0001
0,01
1
100
10000
Концентрация (нМ)
scIL12
p35-MSA + p40-Fab
p35-MSA + p40-IgG
p35-KiH + p40
p35-MSA + p40
p35-MSA + p40E181R
p35-KiH + p40E181R

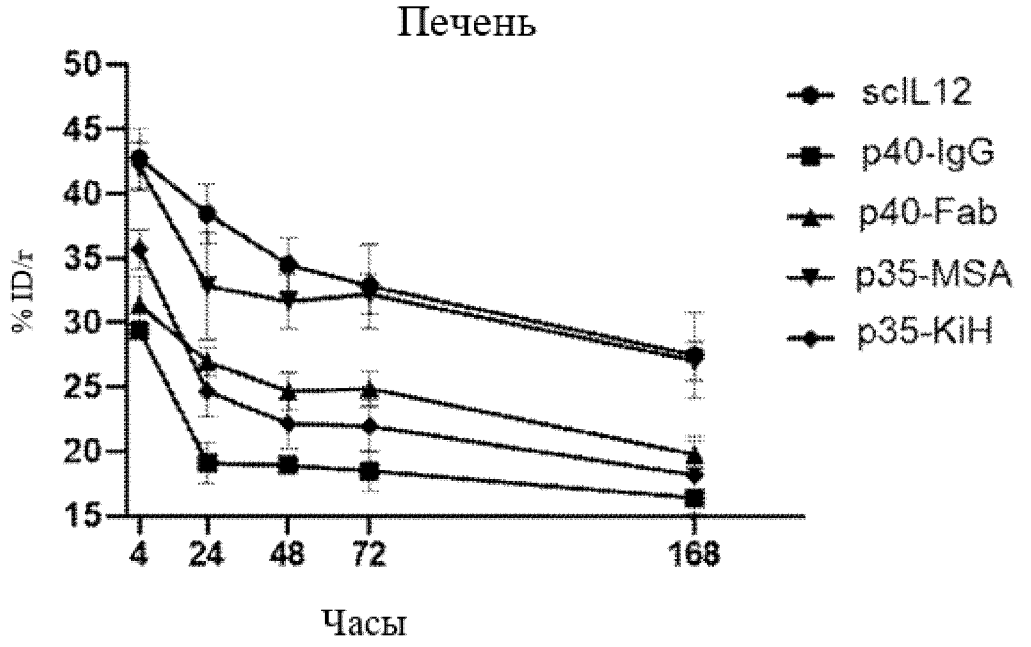
Фиг. 6B


IFN-γ секреция расщепленных молекул
IFN-γ MSD сигнал
800000
600000
400000
200000
0
0,000001
0,0001
0,01
1
100
10000
Концентрация (нМ)
scIL12
p35-MSA + p40-Fab
p35-MSA + p40-IgG
p35-KiH + p40
p35-MSA + p40
p35-MSA + p40E181R
p35-KiH + p40E181R

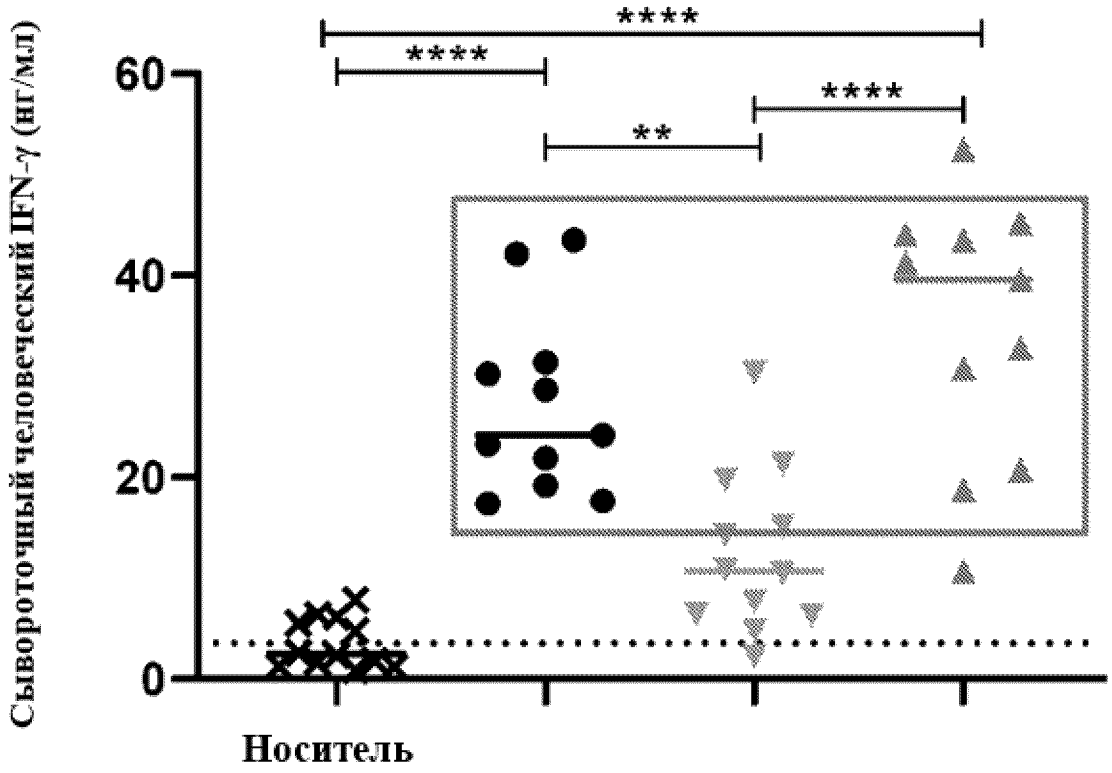
Фиг. 7


Опухоль
% ID/г
0
1
2
3
4
5
4
24
48
72
168
Часы
scIL12
p40-IgG
p40-Fab
p35-MSA
p35-KiH

Фиг. 8A


Печень
% ID/г
15
20
25
30
35
40
45
50
4
24
48
72
168
Часы
scIL12
p40-IgG
p40-Fab
p35-MSA
p35-KiH

Фиг. 8B



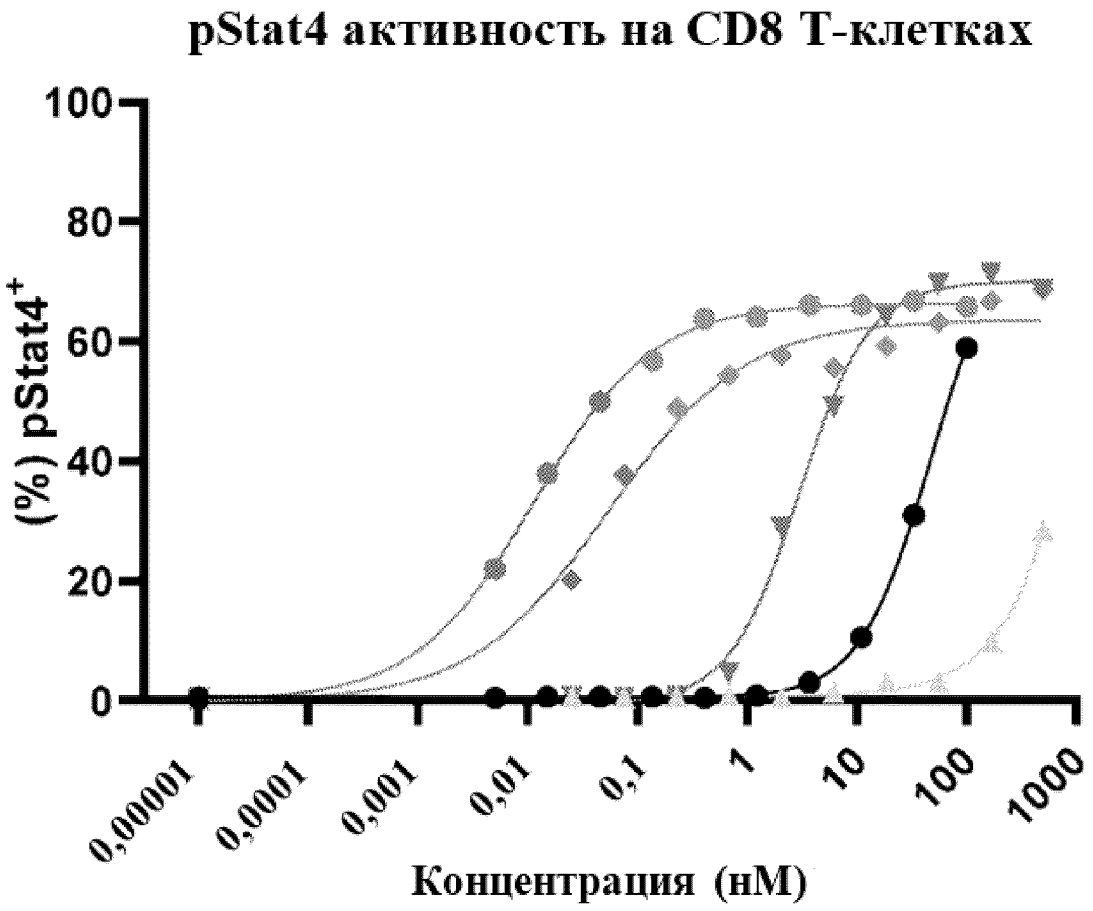
✕ Носитель

● hlL12p70 **(0,24 мг/кг)**

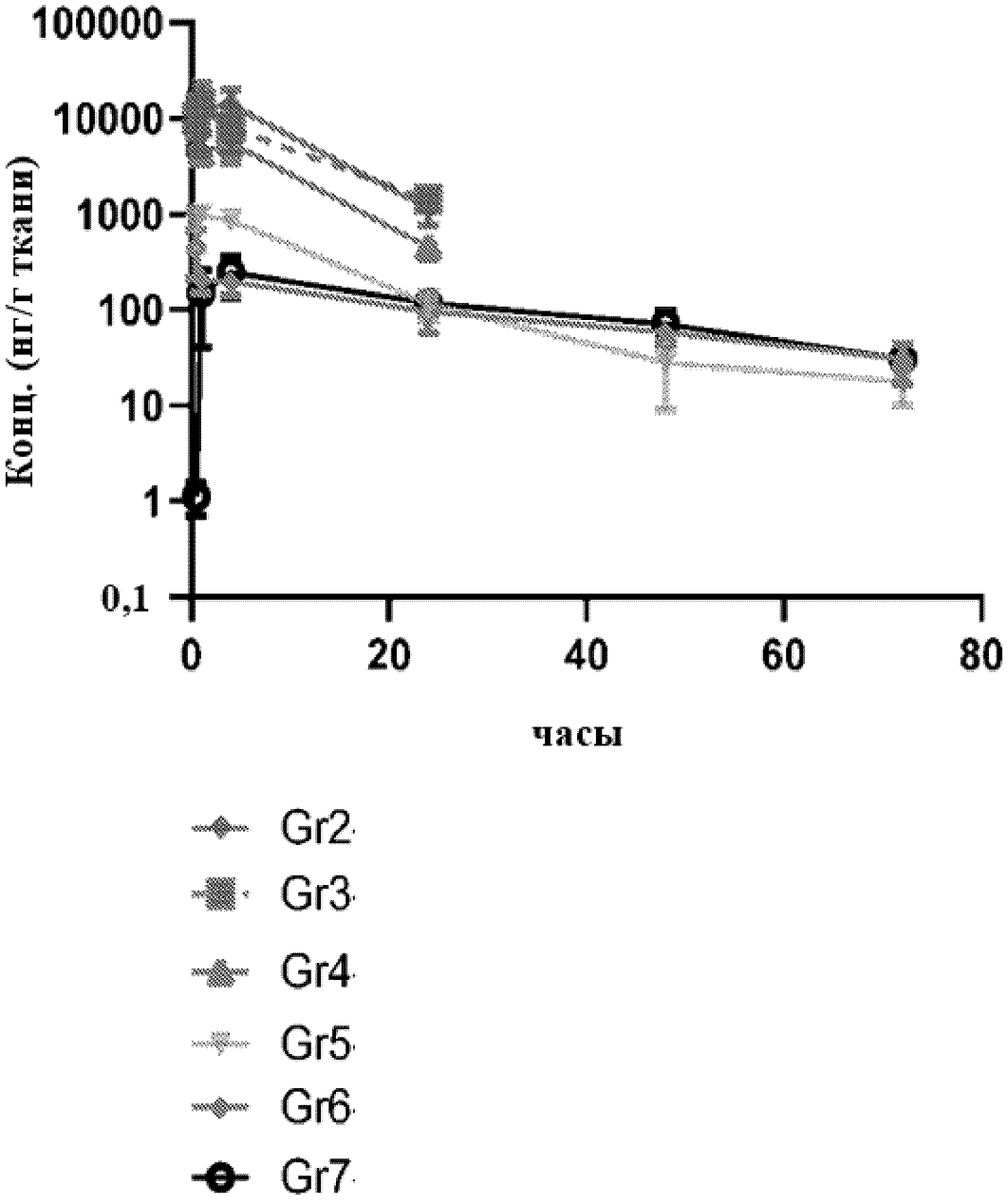
▼ hlL12p35-msa + hlL12p40-Fab **(0,6 мг/кг каждый)**

▲ hlL12p35-msa + hlL12p40-Fab **(6 мг/кг каждый)**

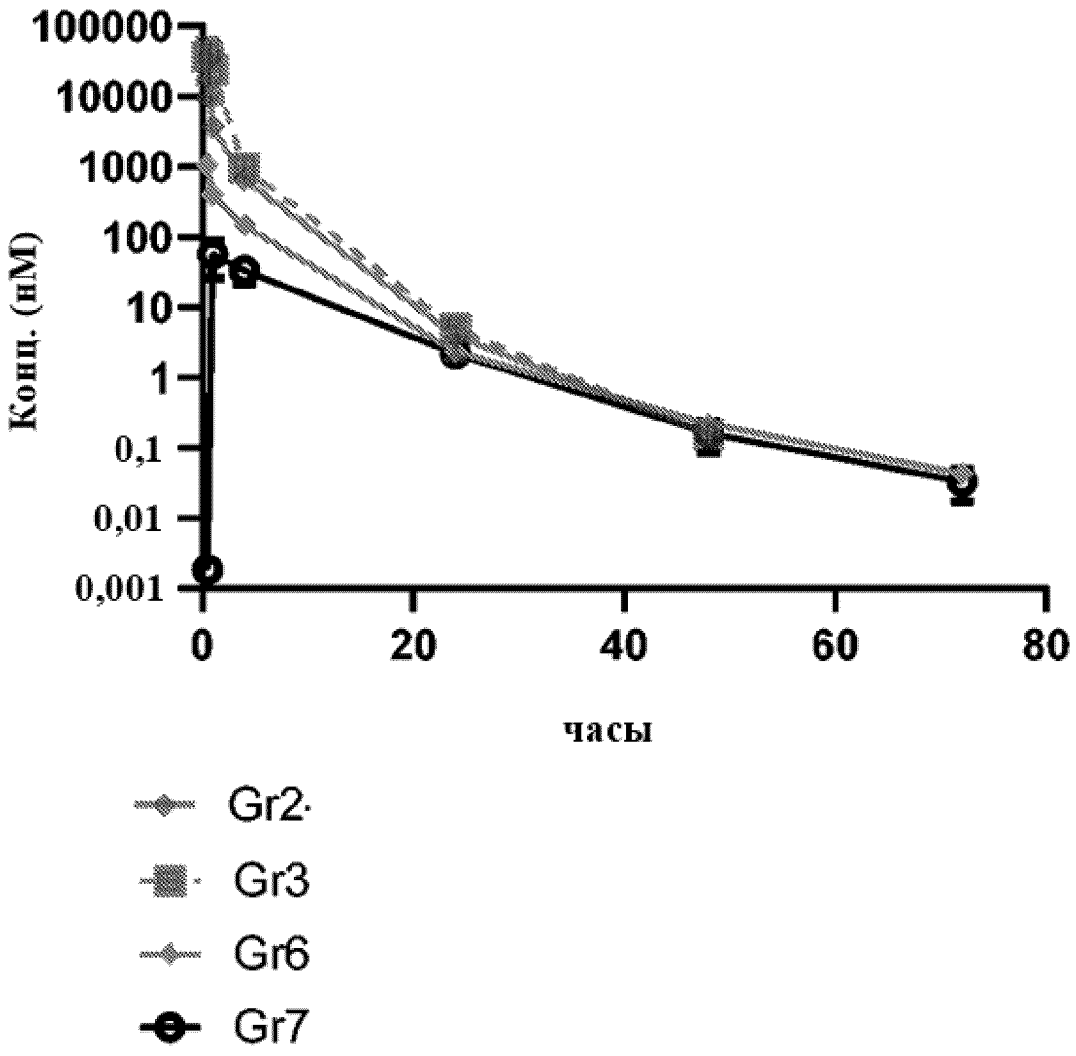
Фиг. 9


pStat4 активность на CD8 T-клетках
100
80
60
40
20
0
(%) pStat4+
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Концентрация (нМ)
M8-Fab-IL-12)
M8-p40-Fab + M1-p35-KiH-Fab
M8-p40-Fab + M37-p35-KiH
scIL-12
M37-p40-Fab + M37-p35-KiH

Фиг. 10


100000
10000
1000
100
10
1
0,1
Конц. (нг/г ткани)
0
20
40
60
80
часы
Gr2
Gr3
Gr4
Gr5
Gr6
Gr7

Фиг. 11


100000
10000
1000
100
10
1
0,1
0,01
0,001
Конц. (нМ)
0
20
40
60
80
часы
Gr2
Gr3
Gr6
Gr7

Фиг. 12