

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046818**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.04.25**

(21) Номер заявки  
**202291680**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.11.27**

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 31/20** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 47/68** (2017.01)

---

(54) **ИНТЕРФЕРОН-АССОЦИИРОВАННЫЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА В**

---

(31) **19306551.3; 19306572.9**

(32) **2019.12.03; 2019.12.04**

(33) **EP**

(43) **2022.08.17**

(86) **PCT/EP2020/083737**

(87) **WO 2021/110561 2021.06.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЕВОТЕК ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ  
ГМБХ (DE); САНОФИ (FR)**

(56) **WO-A1-2019229264**

**WU J-M ET AL.: "Construction of the HBV S-ecdCD40L fusion gene and effects of HBV S-ecdCD40L modification on function of dendritic cells", JOURNAL OF VIRAL HEPATITIS, BLACKWELL PUBLISHING LTD, OXFORD, UK, vol. 18, no. 10, 30 September 2011 (2011-09-30), pages E461-E467, XP009508889, ISSN: 1352-0504, DOI: 10.1111/J.1365-2893.2011.01470.X, abstract**

**WO-A1-2018087345**

**EP-A1-2589654**

(72) Изобретатель:  
**Алам Ангуан (FR)**

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

---

(57) Изобретение относится к новым интерферон-ассоциированным антигенсвязывающим белкам, а также к нуклеиновым кислотам и экспрессирующим векторам, кодирующим такие интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки, для применения в терапии, более конкретно для применения при лечении инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV). Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим такие интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки или нуклеиновые кислоты или экспрессирующие векторы, для применения в терапии, более конкретно для применения при лечении инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV). Настоящее изобретение дополнительно относится к способам лечения с использованием таких интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белков или нуклеиновых кислот, или экспрессирующих векторов, или фармацевтических композиций. Указанные новые интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки обеспечивают полезные улучшения по сравнению с современным уровнем техники, например, в том, что они эффективно нарушают репликацию вируса и тем самым снижают вирусную нагрузку HBV.

---

**046818**  
**B1**

**046818**  
**B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к новым интерферон-ассоциированным антигенсвязывающим белкам, а также к нуклеиновым кислотам и экспрессирующим векторам, кодирующим такие интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки, для применения в терапии, более конкретно, для применения при лечении инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV). Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим такие интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки или нуклеиновые кислоты или экспрессирующие векторы, для применения в терапии, более конкретно, для применения при лечении инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV). Настоящее изобретение дополнительно относится к способам лечения с использованием таких интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белков или нуклеиновых кислот, или экспрессирующих векторов, или фармацевтических композиций. Указанные новые интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки обеспечивают полезные улучшения по сравнению с современным уровнем техники, например, в том, что они эффективно нарушают репликацию вируса и тем самым снижают вирусную нагрузку HBV.

### Уровень техники

HBV поражает более 300 млн человек во всем мире и является частой причиной заболеваний печени и рака печени (Liang (2009) *Hepatology* 49:S13). HBV представляет собой небольшой ДНК-вирус с необычными свойствами, сходными с ретровирусами, который реплицируется через промежуточную РНК (прегеномную РНК, пРНК (pgRNA)) и может интегрироваться в геном хозяина. Уникальные особенности цикла репликации HBV придают особую способность вирусу сохраняться в инфицированных клетках. HBV-инфекция приводит к широкому спектру заболеваний печени, начиная от острого (включая фульминантную печеночную недостаточность) и заканчивая хроническим гепатитом, циррозом и гепатоцеллюлярной карциномой. Острая инфекция HBV может протекать бессимптомно или проявляться симптоматическим острым гепатитом. 90-95% детей и 5-10% взрослых, инфицированных HBV, не могут избавиться от вируса и становятся хронически инфицированными. У многих хронически инфицированных людей заболевание печени протекает в легкой форме с незначительной или отсутствующей долгосрочной заболеваемостью или смертностью. У других людей с хронической инфекцией HBV развивается активное заболевание, которое может прогрессировать до цирроза и рака печени. Эти пациенты требуют тщательного наблюдения и нуждаются в терапевтическом вмешательстве.

Необходимы новые методы лечения HBV-инфекции путем модулирования HBV-инфекции в клетке. В частности, необходимы способы эффективного нарушения репликации вируса, снижения вирусной нагрузки HBV в HBV-инфицированных клетках, снижения транскрипции ковалентно замкнутой кольцевой ДНК HBV в HBV-инфицированных клетках и/или уменьшения количества прегеномной РНК HBV в HBV-инфицированных клетках.

### Сущность изобретения

Изобретение относится к интерферон-ассоциированному антигенсвязывающему белку, содержащему (I) агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, и (II) интерферон (IFN) или его функциональный фрагмент для применения при лечении инфекции вируса гепатита В (HBV).

В соответствии с этим аспектом изобретения агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент может содержать: (a) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 56, CDRH2, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 57, и CDRH3, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 58; и (b) легкую цепь или ее фрагмент, содержащую CDRL1, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 52, CDRL2, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 53, и CDRL3, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 54. Альтернативно, агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент может содержать (a) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, которая идентична SEQ ID NO: 56, CDRH2, которая идентична SEQ ID NO: 57, и CDRH3, которая идентична SEQ ID NO: 58; и (b) легкую цепь или ее фрагмент, содержащую CDRL1, которая идентична SEQ ID NO: 52, CDRL2, которая идентична SEQ ID NO: 53, и CDRL3, которая идентична SEQ ID NO: 54.

В соответствии с одним вариантом осуществления агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 51, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%; и/или переменную область тяжелой цепи VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 55, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

В соответствии с другим вариантом осуществления агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность SEQ ID NO: 3, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%; и/или тяжелую цепь (HC), которая содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 48, или последовательность, идентичную им по

меньшей мере на 90%.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления IFN или его функциональный фрагмент может быть выбран из группы, состоящей из IFN типа I, IFN типа II и IFN типа III или их функционального фрагмента. Предпочтительно IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$  или IFN $\beta$  или их функциональный фрагмент.

В соответствии с другим вариантом осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$ 2a или его функциональный фрагмент. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления IFN $\alpha$ 2a содержит последовательность SEQ ID NO: 17, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

В соответствии с другим вариантом осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\beta$  или его функциональный фрагмент. В предпочтительном варианте осуществления IFN $\beta$  содержит последовательность SEQ ID NO: 14, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

В соответствии с другим вариантом осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с легкой цепью агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, предпочтительно с С-концом.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с тяжелой цепью агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, предпочтительно с С-концом.

В соответствии с другим вариантом осуществления агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и IFN или его функциональный фрагмент слиты друг с другом через линкер. В предпочтительном варианте осуществления линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 26.

В соответствии с другим вариантом осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащее одну из комбинаций последовательностей, раскрытых в табл. 9.

Согласно другому варианту осуществления применение включает введение интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка пациенту посредством генетической доставки последовательностей РНК или ДНК, кодирующих интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, или вектора или векторной системы, кодирующего интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок содержится в фармацевтической композиции.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1: На этом схематическом чертеже показаны иллюстративные форматы интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический антигенсвязывающий фрагмент. IFN ассоциированы через линкеры с различными положениями на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте: с N-концевой или С-концевой частью легкой цепи (LC) или тяжелой цепи (HC). В частности, IFN выбирают из семейств интерферонов типа I, типа II и типа III.

На фиг. 2A показана иллюстративная карта плазмиды pCDNA3.1, кодирующей SEQ ID NO: 32 под контролем промотора рCMV. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SEQ ID NO: 32 (SEQ ID NO: 78), также показана справа. Курсив: последовательность сигнального пептида; черный цвет: кодирующая последовательность тяжелой цепи CP870,893; подчеркнуто: кодирующая последовательность линкера HL; полужирный шрифт: кодирующая последовательность IFN $\beta$ .

На фиг. 2B показаны примеры SDS-PAGE в условиях пониженного содержания некоторых IFA, с IFN $\alpha$  или IFN $\beta$ , слитыми либо с тяжелой цепью, либо с легкой цепью. Миграция родительского CP870,893 также показана слева.

На фиг. 3A-3B графически изображен дозозависимый эффект ряда молекул IFA со слитыми IFN $\beta$  в отношении активации репортерного пути NF $\kappa$ B, опосредованного CD40, в клетках HEK-Blue™ CD40L. На фиг. 3A показаны примеры анти-CD40-активностей для IFA с IFN $\beta$ , слитым с С-концевой частью тяжелой цепи (HC). На фиг. 3B показаны примеры анти-CD40-активностей для IFA с IFN $\beta$ , слитым с N-концевой частью LC (IFA34) или HC (IFA36), и соответствующими слитыми вариантами на С-концевой части (IFA35 и IFA37). Выход после очистки последней группы IFA был очень низким, поэтому для проверки их активности использовали супернатанты из трансфицированных клеток HEK, и серийно разбавляли их для оценки анти-CD40-активности на клетках HEK-Blue™ CD40L.

На фиг. 3C-3D графически изображен дозозависимый эффект ряда молекул IFA со слитыми вариантами IFN $\beta$  в отношении активации IFN-пути типа I в репортерных клетках HEK-Blue-IFN- $\alpha/\beta$ . На фиг. 3C показаны примеры активности IFN для IFA с IFN $\beta$ , слитым с С-концевой частью HC. На фиг. 3D по-

казаны примеры активности IFN для IFA с IFN $\beta$ , слитым с N-концевой частью LC (IFA34) или HC (IFA36), и соответствующими слитыми вариантами на C-концевой части (IFA35 и IFA37). Для оценки активности IFN использовали те же супернатанты из трансфицированных клеток ЕК, что и на фиг. 3В, и серийно разбавляли. Родительское антитело СР870,893 использовали в качестве отрицательного контроля, а рекомбинантный человеческий IFN $\beta$  использовали в качестве положительного контроля. NS: Не стимулированные.

На фиг. 4А графически изображен эффект дозы ряда молекул IFA со слитыми вариантами IFN $\alpha$  в отношении активации репортерного пути NF $\kappa$ B, опосредованного CD40, в клетках HEK-Blue™ CD40L.

На фиг. 4В графически изображен эффект дозы ряда молекул IFA со слитыми вариантами IFN $\alpha$  в отношении активации пути, опосредованного IFN типа I в репортерных клетках HEK-Blue-IFN- $\alpha/\beta$ . Активность Pegasys указана на вкладыше в правом нижнем углу.

На фиг. 4С графически изображен эффект молекул IFA со слитыми вариантами IFN $\alpha$  и линкером HL на HC (IFA38) или LC (IFA39) в отношении активации CD40-опосредованного репортерного пути NF $\kappa$ B в клетках HEK-Blue™ CD40L.

На фиг. 4D графически изображен эффект IFA38 и IFA39 в отношении активации пути IFN типа I в репортерных клетках HEK-Blue-IFN $\alpha/\beta$ .

На фиг. 5 изображен дозозависимый эффект IFA на основе IFN $\beta$  в отношении высвобождения HBeAg из первичных гепатоцитов, инфицированных HBV. IFA1, IFA12: слияние IFN $\beta$  с C-концом LC через линкеры HL или RL соответственно. IFA2 и IFA13: слияние IFN $\beta$ \_C17S с C-концом LC через линкеры HL или RL соответственно.

На фиг. 6А показан дозозависимый эффект IFA25, IFA26 и IFA27 в отношении высвобождения HBeAg из первичных гепатоцитов человека, инфицированных HBV.

На фиг. 6В показан дозозависимый эффект IFA28, IFA29 и IFA30 в отношении высвобождения HBeAg из первичных гепатоцитов человека, инфицированных HBV.

На фиг. 6С показана дозозависимая противовирусная активность (высвобождение HBeAg) IFA с линкером HL (IFA38 и IFA39) в отношении HBV-инфицированных РНН.

На фиг. 6D-6H показана дозозависимая противовирусную активность 4 молекул IFA со слиянием с IFN $\alpha$  через пептидный линкер в отношении первичных гепатоцитов человека, инфицированных HBV. Фиг. 6D: графическое изображение, иллюстрирующее дизайн исследования. Фиг. 6E: Эффект IFA в отношении высвобождения HBeAg по сравнению с Pegasys. Фиг. 6F: эффект IFA в отношении высвобождения HBsAg по сравнению с Pegasys. Фиг. 6G: эффект IFA в отношении уровня pgRNA по сравнению с Pegasys. Фиг. 6H: эффект IFA в отношении высвобождения CXCL10 по сравнению с Pegasys.

На фиг. 7 показаны результаты анализа высвобождения цитокинов клетками цельной крови человека (WBC) *in vitro*: пример данных, полученных после стимуляции лейкоцитов от 4 здоровых доноров-добровольцев. Лейкоциты оставляли нестимулированными (NS), обрабатывали LPS (10 нг/мл) или IFA1 (1 мкг/мл) в течение 24 ч. Супернатанты собирали и подвергали количественному определению высвобождения цитокинов с использованием набора MSD u-Plex для цитокинов человека. Результаты представляют собой среднее значение двух независимых стимуляций от каждого донора. Показаны профили CXCL10 (IP10), IL6, IL1 $\beta$  и TNF $\alpha$ .

Табл. 11a-b: В этих таблицах суммированы данные, полученные после стимуляции *in vitro* клеток цельной крови (лейкоцитов), полученных от здоровых добровольцев. Каждую IFA тестировали на лейкоцитах от четырех разных доноров. Лейкоциты оставляли необработанными (NT), обрабатывали LPS (10 нг/мл) или IFA (1 мкг/мл) в течение 24 ч. Супернатанты собирали и подвергали количественному определению высвобождения цитокинов с использованием набора MSD u-Plex для цитокинов человека. Результаты представляют собой среднее значение двух независимых стимуляций от каждого донора и выражены в пг/мл (nd: не обнаружено).

Фиг. 8: Фармакокинетический профиль IFA25, IFA26, IFA27, IFA28, IFA29 и IFA30 после внутривенной болюсной инъекции мышам 0,5 мг/кг (IFA) или 0,3 мг/кг (Pegasys). Данные выражены как среднее +/- стандартное отклонение в полулогарифмической шкале. Образцы собирали в течение 10 дней после введения. Анализ ИФА с использованием анти-IFN $\alpha$  в качестве вторичного антитела для метода количественного определения использовали для IFA27, IFA29 и IFA30 (фиг. 8А) и для IFA25, IFA26 и IFA28 (фиг. 8В). Анализ ИФА с использованием анти-IgG2 в качестве вторичного антитела для метода количественного определения использовали для IFA25 и IFA27 (фиг. 8С). Фиг. 8D. Количественную оценку Pegasys проводили с использованием пар антител человека, соответствующих IFN $\alpha$ . Отмеченная линия (LLOQ) обозначает предел обнаружения для анализа Pegasys.

Табл. 12А: Сводка данных по фармакокинетике: фармакокинетические параметры для СР870,893, IFA27, IFA29 и IFA30 после однократного внутривенного введения 0,5 мг/кг самцам мышей CD1 Swiss. ФК-параметры для СР870,893 исследовали в 7-дневном эксперименте, а параметры для IFA27, IFA29 и IFA30 в 10-дневном эксперименте (количественное определение IFA27 проводили с использованием 2 различных подходов ИФА).

Табл. 12В: Сводка данных по ФК: параметры ФК для СР870,893, Pegasys и для трех различных IFA

(IFA25, IFA26 и IFA28) после однократного внутривенного болюсного введения 0,5 мг/кг самцам мышей CD1 Swiss. ФК-параметры для CP870,893 и IFA25, IFA26, IFA28 и Regasys исследовали в 21-дневных экспериментах (количественное определение IFA25 проводили с использованием 2 различных подходов ИФА).

На фиг. 9А показана дозозависимая агонистическая активность CD40 для IFA50 и IFA51 без Fc-области по сравнению с родительским антителом против CD40 в репортерных клетках HEK-Blue™ CD40L. На фиг. 9В показана дозозависимая активность IFN $\alpha$  для IFA50 и IFA51 в репортерных клетках HEK-Blue™ hIFN- $\alpha/\beta$ . Фиг. 9С: Эффект IFA50 и IFA51 в отношении высвобождения HBeAg из HBV-инфицированных РНН.

На фиг. 10А показана дозозависимая агонистическая активность CD40 для IFA49 на основе IFN $\epsilon$  по сравнению с родительским антителом против CD40 в репортерных клетках HEK-Blue™ CD40L. IFA49 соответствует слиянию IFN $\epsilon$  с HC через пептидный линкер. На фиг. 10В показана дозозависимая активность IFN для IFA49 на репортерных клетках HEK-Blue™ hIFN- $\alpha/\beta$ , которые активируются интерферонами I типа. Фиг. 10С: эффект IFA49 в отношении высвобождения HBeAg из HBV-инфицированных РНН.

На фиг. 11А показана дозозависимая агонистическая активность CD40 для IFA46 на основе IFN $\omega$  по сравнению с родительским антителом против CD40 в репортерных клетках HEK-Blue™ CD40L. IFA46 соответствует слиянию IFN $\omega$  с LC через пептидный линкер. На фиг. 11В показана дозозависимая активность IFN для IFA46 на репортерных клетках HEK-Blue™ hIFN- $\alpha/\beta$ , которые активируются интерферонами I типа. Фиг. 11С: эффект IFA46 в отношении высвобождения HBeAg из HBV-инфицированных РНН.

На фиг. 12А показана дозозависимая агонистическая активность CD40 для IFA на основе IFN $\gamma$  (IFA42 и IFA43) по сравнению с исходным антителом против CD40 в репортерных клетках HEK-Blue™ CD40L. IFA42 соответствует слиянию IFN $\gamma$  с LC через пептидный линкер, а IFA43 соответствует слиянию IFN $\gamma$  с HC через пептидный линкер. На фиг. 12В показана дозозависимая активность IFN для IFA42 и IFA43 в репортерных клетках HEK-Blue-hIFN $\gamma$ ; фиг. 12С: эффект IFA42 и IFA43 в отношении высвобождения HBeAg из HBV-инфицированных РНН.

На фиг. 13А показана дозозависимая агонистическая активность CD40 для IFA на основе IFN $\lambda$  (IFA44 и IFA45) по сравнению с родительским антителом против CD40 в репортерных клетках HEK-Blue™ CD40L. IFA44 соответствует слиянию IFN $\lambda$  с LC через пептидный линкер, а IFA45 соответствует слиянию IFN $\lambda$  с HC через пептидный линкер. На фиг. 13В показана дозозависимая активность IFN для IFA44 и IFA45 в репортерных клетках HEK-Blue-hIFN $\lambda$ . Фиг. 13С: эффект IFA на основе IFN $\lambda$  (IFA44 и IFA45) в отношении высвобождения HBeAg из HBV-инфицированных РНН.

На фиг. 14 показаны примеры SDS-PAGE в условиях пониженного содержания некоторых IFA с IFN $\alpha$  или IFN $\beta$ , слитыми с тяжелой цепью антитела 3G5 против CD40. Слева также показана миграция родительского антитела 3G5 против CD40.

На фиг. 15А-В графически показан дозозависимый эффект ряда молекул IFA на основе 3G5 со слияниями IFN $\beta$  в отношении активации CD40-опосредованного репортерного пути NF $\kappa$ B в анализе клеток HEK-Blue™ CD40L. Аналогичным образом показано сравнение с родительским антителом 3G5 (обозначенным на этой фигуре как CDX-3G5). На фиг. 15А показаны примеры анти-CD40-активностей для IFA со слиянием IFN $\beta$  с С-концевой частью тяжелой цепи (HC). Выход очистки IFA со слияниями IFN $\beta$  на легкой цепи был очень низким, поэтому для проверки их активности использовали супернатанты из трансфицированных клеток HEK, и серийно разбавляли для оценки анти-CD40-активности на клетках HEK-Blue™ CD40L; пример активности показан на фиг. 15, и супернатант, содержащий полосу 3G5, использовали в качестве контроля.

На фиг. 15С-D графически показан дозозависимый эффект ряда молекул IFA со слияниями IFN $\beta$  в отношении активации пути IFN типа I в репортерных клетках HEK-Blue-IFN- $\alpha/\beta$ . На фиг. 15С показаны примеры активности IFN для IFA со слиянием IFN $\beta$  с С-концевой частью HC. На фиг. 15D показана IFN-активность IFA с IFN $\beta$ , слитым с легкой цепью; уровень продукции этих белков был очень низким, и поэтому пример активности двух IFA показан на фиг. 15D с использованием того же супернатанта, что и на фиг. 15В.

На фиг. 16А графически показан эффект дозы четырех молекул IFA со слияниями IFN $\alpha$  в отношении активации пути NF $\kappa$ B, опосредованного CD40, в анализе с использованием репортера в клетках HEK-Blue™ CD40L. Аналогичным образом показано сравнение с исходным антителом 3G5 (обозначенным на этой фигуре как CDX-3G5).

На фиг. 16В графически показан эффект дозы ряда молекул IFA со слияниями IFN $\alpha$  в отношении активации пути, опосредованного IFN типа I, в репортерных клетках HEK-Blue-IFN- $\alpha/\beta$ .

На фиг. 17 показан дозозависимый эффект IFA на основе IFN типа I в отношении высвобождения HBeAg из РНН, инфицированных HBV. На фиг. 17А показаны результаты, полученные с IFA на основе

IFN $\beta$  (IFA106, IFA107, IFA108 и IFA109) со слиянием IFN $\beta$  с С-концевой частью НС. На фиг. 17В показаны результаты, полученные с четырьмя IFA на основе IFN $\alpha$  (IFA121, IFA122, IFA123 и IFA124) со слиянием IFN $\alpha$  с С-концевой частью НС. NI-NT: неинфицированные, необработанные. MOI: множественность инфекции.

Фиг. 18: Анализ высвобождения цитокинов *in vitro* клетками цельной крови человека (WBC): пример данных, полученных после стимуляции WBC от 4 здоровых доноров-добровольцев. Лейкоциты оставляли необработанными (NT), обрабатывали LPS (10 нг/мл) или IFA109 (1 мкг/мл) в течение 24 ч. Супернатанты собирали и подвергали количественному определению высвобождения цитокинов с использованием набора MSD u-Plex для цитокинов человека. Результаты представляют собой среднее значение двух независимых стимуляций от каждого донора. Показаны профили CXCL10 (IP10), IL6, IL1 $\beta$  и TNF $\alpha$ .

Табл. 13. В этой таблице суммированы данные, полученные после стимуляции *in vitro* клеток цельной крови, полученных от здоровых добровольцев. IFA109 тестировали на лейкоцитах четырех разных доноров. Лейкоциты оставляли необработанными (NT), обрабатывали LPS (10 нг/мл) или IFA109 (1 мкг/мл) в течение 24 ч. Супернатанты собирали и подвергали количественному определению высвобождения цитокинов с использованием набора MSD u-Plex для цитокинов человека. Результаты представляют собой среднее значение двух независимых стимуляций от каждого донора и выражены в пг/мл (nd: не обнаружено).

Вышеупомянутые и другие особенности и преимущества настоящего изобретения станут более понятными из следующего подробного описания иллюстративных вариантов осуществления в сочетании с прилагаемыми чертежами.

### Подробное описание

Настоящее изобретение частично основано на открытии терапии на основе использования "интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белков", их вариантов или производных, содержащих (I) агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и (II) интерферон (IFN) или его функциональный фрагмент в терапии инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV). Указанные интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки ингибируют транскрипцию ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК) вируса гепатита В в прегеномную РНК HBV (пгРНК) в HBV-инфицированных клетках, ингибируют высвобождение е-антигена гепатита В (HBeAg) из HBV-инфицированных клеток, и усиливают путь IFN в неинфицированных и HBV-инфицированных гепатоцитах, в частности, в неинфицированных и HBV-инфицированных первичных гепатоцитах человека и причем синергическим образом. Предлагается терапия HBV, включающая введение интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка в HBV-инфицированную клетку или пациенту, инфицированному HBV.

Изобретение можно легче понять в свете выбранных терминов, определенных ниже.

Используемый в настоящем описании термин "CD40" относится к "кластеру дифференцировки 40", члену надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR). CD40 представляет собой костимулирующий белок, обнаруживаемый на антигенпрезентирующих клетках (например, В-клетки, дендритные клетки, моноциты), гемопоэтических предшественниках, эндотелиальных клетках, гладкомышечных клетках, эпителиальных клетках, а также в большинстве опухолей человека (Grewal & Flavell, *Ann. Rev. Immunol.*, 1996, 16: 111-35; Toes & Schoenberger, *Seminars in Immunology*, 1998, 10(6):443-8). Связывание природного лиганда CD154 (CD40L) на клетках TH с CD40 активирует антигенпрезентирующие клетки и индуцирует различные последующие эффекты. Белки-адаптеры фактора, ассоциированные с TNF-рецептором, TRAF1, TRAF2, TRAF6 и TRAF5, взаимодействуют с CD40 и служат медиаторами сигнальной трансдукции. В конечном счете, передача сигналов CD40 активирует как канонический, так и неканонический пути NF- $\kappa$ B.

### Агонистические антитела против CD40 и их антигенсвязывающие фрагменты

Используемый в настоящем описании термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулина, включающим четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно VH или VH) и константную область тяжелой цепи (CH или CH). Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно VL или VL) и константную область легкой цепи (CL или CL). Константная область легкой цепи содержит один домен (CL1). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые "областями, определяющими комплементарность (CDR)", перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми "каркасными областями" (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Каркасные области могут помочь в поддержании надлежащей конформации CDR для обеспечения связывания между антигенсвязывающей областью и антигеном.

Наиболее часто используемым иммуноглобулином для терапевтических целей является иммуноглобулин G (или IgG), тетрамерный гликопротеин. Во встречающемся в природе иммуноглобулине каж-

дый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну легкую (примерно 25 кДа) и одну тяжелую цепь (примерно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельную область примерно из 100-110 или более аминокислот, в первую очередь ответственную за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, в первую очередь отвечающую за эффекторную функцию. Иммуноглобулины можно отнести к разным классам в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей.

Тяжелые цепи классифицируются как мю ( $\mu$ ), дельта ( $\delta$ ), гамма ( $\gamma$ ), альфа ( $\alpha$ ) и эпсилон ( $\epsilon$ ) и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. Некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы или изотипы, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Различные изотипы имеют разные эффекторные функции; например, изотипы IgG1 и IgG3 обладают антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC). В предпочтительных вариантах осуществления агонистические антитела против CD40 или их агонистические антигенсвязывающие фрагменты, содержащиеся в интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белках по изобретению, относятся к классу IgG. В более предпочтительных вариантах осуществления агонистические антитела против CD40 или их агонистические антигенсвязывающие фрагменты, содержащиеся в интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белках по изобретению, относятся к подклассам IgG1 или IgG3. В особо предпочтительных вариантах осуществления агонистические антитела против CD40 или их агонистические антигенсвязывающие фрагменты, содержащиеся в интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белках согласно изобретению, относятся к подклассу IgG1. В других более предпочтительных вариантах осуществления агонистические антитела против CD40 или их агонистические антигенсвязывающие фрагменты, содержащиеся в интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белках по изобретению, относятся к подклассам IgG2 или IgG4. В особо предпочтительных вариантах осуществления агонистические антитела против CD40 или их агонистические антигенсвязывающие фрагменты, содержащиеся в интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белках согласно изобретению, относятся к подклассу IgG2.

Легкие цепи человека классифицируются как легкие цепи каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления агонистические антитела против CD40 или их агонистические антигенсвязывающие фрагменты, содержащиеся в интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белках по изобретению, содержат легкую цепь класса  $\kappa$ . В других вариантах осуществления агонистические антитела против CD40 или их агонистические антигенсвязывающие фрагменты, содержащиеся в интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белках по изобретению, содержат легкую цепь класса  $\lambda$ . В легкой и тяжелой цепях вариабельная и константная области соединены областью "J", состоящей примерно из 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь дополнительно включает область "D", состоящая еще примерно из 10 аминокислот. См. в целом, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989)).

Термин "антитело" дополнительно включает, но не ограничивается ими, моноклональные антитела, биспецифические антитела, миниантитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые "миметиками антител"), химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела и их фрагменты, соответственно. Если не указано иное, термин "антитело" включает, помимо антител, содержащих две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, их производные, варианты, антигенсвязывающие фрагменты и мутеины, примеры которых описаны ниже.

Используемый в настоящем описании термин "агонистическое антитело CD40" или "агонистическое антитело против CD40" относится к антителу, которое связывается с CD40 и опосредует передачу сигнала CD40. В предпочтительном варианте осуществления оно связывается с CD40 человека. Как описано ниже, связывание с CD40 можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса, предпочтительно с использованием системы BIAcore®. Агонистическое антитело против CD40 может повышать одну или более активностей CD40 по меньшей мере примерно на 20% при добавлении к клетке, ткани или организму, экспрессирующим CD40. В некоторых вариантах осуществления антитело активирует активность CD40 по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 85%. Активность CD40 агонистического антитела против CD40 может быть измерена с использованием анализа положительной регуляции поверхностных молекул клеток цельной крови или с использованием анализа репортерных клеток *in vitro*, например, с использованием клеток HEK-Blue™ CD40L (InvivoGen Cat. #: hkb-cd40), как более подробно описано в примере I. Эти репортерные клетки были созданы путем стабильной трансфекции клеток HEK293 человеческим геном CD40 и конструкцией NFκB-индуцируемой секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) для измерения активности агонистов CD40. Стимуляция CD40 приводит к активации NFκB и, таким образом, к продукции SEAP, которую можно обнаружить в супернатанте с использованием хромогенных субстратов, таких как QUANTI-Blue™.

В контексте настоящего изобретения интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки активируют как CD40, так и путь IFN. В некоторых вариантах осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок активирует путь CD40 с EC50 менее 400, 300, 200, 150,

100, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 или 15 нг/мл. В более конкретных вариантах осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок активирует путь CD40 с EC50 в диапазоне от 10 до 200 нг/мл. В еще более конкретных вариантах осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок активирует путь CD40 с EC50 в диапазоне от 10 до 50 нг/мл, предпочтительно от 10 до 30 нг/мл.

Примеры подходящих агонистических антител против CD40 включают, но не ограничиваются ими, CP870,893 (Pfizer/Roche), SGN-40 (Seattle Genetics), ADC-1013 (Janssen/Alligator BioSciences), Chi Lob 7/4 (University Саутгемптона), дацетумумаб (Seattle Genetics), APX005M (Apexigen, Inc.), 3G5 (Celldex) и CDX-1140 (Celldex). Примеры последовательностей легкой и тяжелой цепей агонистического антитела против CD40 CP870,893 показаны в табл. 7. Примеры последовательностей легкой и тяжелой цепей агонистического антитела против CD40 3G5 показаны в табл. 8.

Используемый в настоящем описании термин "агонистический антигенсвязывающий фрагмент" агонистического антитела против CD40 относится к фрагменту агонистического антитела против CD40, который сохраняет одну или более функциональных активностей исходного антитела, таких как способность связываться и действовать как агонист передачи сигналов CD40 в клетке, например, он опосредует сигнальный путь CD40. Такой фрагмент может конкурировать с интактным антителом за связывание с CD40.

Агонистические антигенсвязывающие фрагменты агонистического антитела против CD40 могут быть получены методами рекомбинантной ДНК или могут быть получены ферментативным или химическим расщеплением антитела против CD40. Агонистические антигенсвязывающие фрагменты включают, но не ограничиваются ими, Fab-фрагмент, диантитело (вариабельный домен тяжелой цепи на том же полипептиде, что и вариабельный домен легкой цепи, соединенный с помощью короткого пептидного линкера, слишком короткого для образования пары между двумя доменами в одной цепи), Fab'-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fv-фрагмент, доменные антитела и одноцепочечные антитела, и которые могут быть получены из любого источника млекопитающих, включая, но не ограничиваясь этим, человека, мышь, крысу, верблюда или кролика.

Термин "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к части легкой и/или тяжелой цепи антитела, обычно включающей примерно от 120 до 130 N-концевых аминокислот в тяжелой цепи и примерно от 100 до 110 N-концевых аминокислот в легкой цепи. Вариабельные области разных антител сильно различаются по аминокислотной последовательности даже среди антител, происходящих от одного и того же вида или одного класса. Примеры последовательностей доменов VL и VH агонистического антитела против CD40 CP870,893 показаны в табл. 1. Вариабельная область антитела обычно определяет специфичность конкретного антитела в отношении его мишени, поскольку она содержит CDR. В табл. 1 также показаны иллюстративные последовательности CDR агонистического антитела против CD40 CP870,893.

Таблица 1 Вариабельные области тяжелой/легкой цепи и CDR агонистического антитела против CD40 CP870,893. Последовательности, выделенные жирным курсивом, соответствуют областям CDR в соответствии с определением Kabat.1

Области антитела против CD40	Последовательность
антитело против CD40, V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYSWLAWY



домен (SEQ ID NO 51)	QQKPGKAPNLLIY <b>TASTLQ</b> SGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC <b>QQANIFPL</b> TFGGGTKVEIK
антитело против CD40, CDRL1 (SEQ ID NO 52)	RASQGIYSWLA
антитело против CD40, CDRL2 (SEQ ID NO 53)	TASTLQS
антитело против CD40, CDRL3 (SEQ ID NO 54)	QQANIFPLT
антитело против CD40, V <sub>H</sub> домен (SEQ ID NO 55)	<b>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV</b> SCKASGYTFT <b>GYYM</b> <b>HWVRQAPGQGLEWMGW</b> <b>INPDSGGTNYA</b> <b>QKFQGR</b> <b>VTMTRDTSISTAYMELNRL</b> RSDDTAVYY <b>CARDQPL</b> <b>GYCTNGVCSYFDY</b> WGQGLT <b>VTVSS</b>
антитело против CD40, CDRH1 (SEQ ID NO 56)	TGYMH
антитело против CD40, CDRH2 (SEQ ID NO 57)	WINPDSGGTNYA <b>QKFQG</b>
антитело против CD40, CDRH3 (SEQ ID NO 58)	DQPLGYCTNGVCSYFDY

Разграничение CDR и идентификацию остатков, содержащих сайт связывания антитела, можно осуществить путем определения структуры антитела и/или определения структуры комплекса антитело-лиганд. Это может быть выполнено любым из множества методов, известных специалистам в данной области, таких как рентгеновская кристаллография. Для идентификации или аппроксимации участков CDR можно использовать различные методы анализа. Примеры таких методов включают, но не ограничиваются ими, определение Kabat, определение Chothia, определение AbM и определение контакта.

Определение Kabat является стандартом для нумерации остатков в антителе и обычно используется для идентификации областей CDR. См., например, Johnson & Wu, *Nucleic Acids Res.* 28: 214-8 (2000). Определение Chothia аналогично определению Kabat, но определение Chothia учитывает положения определенных структурных петлевых областей. См., например, Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901-17 (1986); Chothia et al., *Nature*, 342: 877-83 (1989). Определение AbM использует интегрированный набор компьютерных программ, произведенных Oxford Molecular Group, которые моделируют структуру антител. См., например, Martin et al., *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 86:9268-9272 (1989); "AbMTM, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies", Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd. Определение AbM моделирует третичную структуру антитела из первичной последовательности с использованием комбинации информационных баз данных и методов ab initio, таких как описанные Samudrala et al., "Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach", in *PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.*, 3:194-198 (1999). Определение контакта основано на анализе имеющихся сложных кристаллических структур. См., например, MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 5:732-45 (1996).

В некоторых вариантах осуществления определяющие комплементарность области (CDR) переменных областей легкой и тяжелой цепей агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента могут быть трансплантированы к каркасным областям (FR) того же или другого вида. В некоторых вариантах осуществления CDR переменных областей легкой и тяжелой цепей агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента могут быть трансплантированы к консенсусным FR человека. Для создания консенсусных FR человека в некоторых вариантах осуществления FR из нескольких аминокислотных последовательностей тяжелой или легкой цепи человека выравнивают для идентификации консенсусной аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления FR тяжелой цепи или легкой цепи агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента заменены FR из другой тяжелой цепи или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления редкие аминокислоты в FR тяжелой и легкой цепей агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента не заменяются, в то время как остальные аминокислоты FR заменяются. Редкие аминокислоты представляют собой специфические аминокислоты, которые находятся в положениях, в

которых они обычно не встречаются в FR. В некоторых вариантах осуществления трансплантированные вариабельные области агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента можно использовать с константной областью, которая отличается от константной области агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления трансплантированные вариабельные области являются частью одноцепочечного Fv-антитела. Трансплантация CDR описана, например, в патентах США № 6180370, 6054297, 5693762, 5859205, 5693761, 5565332, 5585089 и 5530101, а также в Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988), Winter, FEBS Letts., 430:92-94 (1998), которые настоящим включены в качестве ссылки для любой цели.

Область "Fc" обычно содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены CH2 и CH3 антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и гидрофобными взаимодействиями доменов CH3.

"Fab-фрагмент" содержит одну полноразмерную легкую цепь, а также CH1 и вариабельные области одной тяжелой цепи (комбинация областей VH и CH1 упоминается в настоящем документе как "тяжелая цепь fab-области").

"Fab'-фрагмент" включает одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи, которая содержит домен VH и домен CH1, а также область между доменами CH1 и CH2, так что между двумя тяжелыми цепями может образоваться дисульфидная связь между цепями из двух Fab'-фрагментов с образованием молекулы F(ab')<sub>2</sub>.

"Фрагмент F(ab')<sub>2</sub>" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами CH1 и CH2, так что между двумя тяжелыми цепями образуется межцепочечная дисульфидная связь. Таким образом, фрагмент F(ab')<sub>2</sub> состоит из двух фрагментов Fab', которые удерживаются вместе дисульфидной связью между двумя тяжелыми цепями.

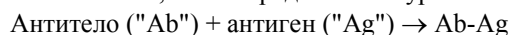
"Fv-область" включает вариабельные области как тяжелой, так и легкой цепей, но не содержит константных областей.

"Одноцепочечные антитела" представляют собой молекулы Fv, в которых вариабельные области тяжелой и легкой цепей соединены гибким линкером с образованием одной полипептидной цепи, которая образует антигенсвязывающую область. Одноцепочечные антитела подробно обсуждаются в публикации международной патентной заявки № WO 88/01649 и в патентах США №№ 4946778 и 5260203, описание которых включено в качестве ссылки.

"Доменное антитело" представляет собой иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только вариабельную область тяжелой цепи или вариабельную область легкой цепи. В некоторых случаях две или более областей VH ковалентно соединяются с пептидным линкером для создания двухвалентного доменного антитела. Две области VH двухвалентного доменного антитела могут быть нацелены на один и тот же или разные антигены.

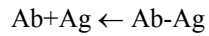
Антитело или антигенсвязывающий белок, такой как интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок по изобретению, предпочтительно связывается со своим антигеном-мишенью с константой диссоциации ( $K_d$ )  $\leq 10^{-7}$  М. Антитело или антигенсвязывающий белок связывает свой антиген с "высокой аффинностью", когда  $K_d$  составляет  $\leq 5 \times 10^{-9}$  М, и с "очень высокой аффинностью", когда  $K_d$  составляет  $\leq 5 \times 10^{-10}$  М. Более предпочтительно антитело или антигенсвязывающий белок имеют  $K_d \leq 10^{-9}$  М. В некоторых вариантах осуществления скорость диссоциации составляет  $< 1 \times 10^{-5}$ . В других вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий белок будут связываться с CD40 человека с  $K_d$  от примерно  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  М, а в еще одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий белок будут связываться с  $K_d \leq 5 \times 10^{-10}$ . Как будет понятно специалисту в данной области, в некоторых вариантах осуществления любой или все антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с CD40. Предпочтительно указанные константы определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса, более предпочтительно с использованием системы BIAcore®.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс" означает оптическое явление, которое позволяет анализировать биоспецифические взаимодействия в реальном времени путем детектирования изменений концентрации белков в матрице биосенсора, например, с использованием системы BIAcore® (BIAcore International AB, компания GE Healthcare, Уппсала, Швеция и Пискатауэй, Нью-Джерси). Дополнительные описания см. в Jönsson et al. (1993) Ann. Biol., Clin. 51:19-26. Термин "Kon" означает константу скорости ассоциации связывающего белка (например, антитела или антигенсвязывающего белка) с антигеном с образованием, например, комплекса антигенсвязывающий белок/антиген. Термин "Kon" или "on-rate" также означает "константу скорости ассоциации" или "ka", как используется в настоящем описании взаимозаменяемо. Это значение, обозначающее скорость связывания связывающего белка с его антигеном-мишенью или скорость образования комплекса между связывающим белком, например, антителом или антигенсвязывающим белком и антигеном, также представлено уравнением ниже:



Термин "Koff" или "скорость диссоциации" означает константу скорости диссоциации для диссо-

циации или "константу скорости диссоциации" связывающего белка (например, антитела или антигенсвязывающего белка) из, например, комплекса антигенсвязывающий белок/антиген, как известно в данной области. Это значение обозначает скорость диссоциации связывающего белка, например, антитела или антигенсвязывающего белка, из антигена-мишени или разделения комплекса Ab-Ag с течением времени на свободное антитело и антиген, как показано в приведенном ниже уравнении:



Термины "Kd" и "равновесная константа диссоциации" означают значение, полученное при измерении титрования в равновесии или путем деления константы скорости диссоциации (Koff) на константу скорости ассоциации (Kon). Константа скорости ассоциации, константа скорости диссоциации и константа равновесной диссоциации используются для представления аффинности связывания связывающего белка (например, антитела или антигенсвязывающего белка) к антигену. Способы определения констант скорости ассоциации и диссоциации хорошо известны в данной области. Использование методов на основе флуоресценции обеспечивает высокую чувствительность и возможность исследовать образцы в физиологических буферах в состоянии равновесия. Можно использовать другие экспериментальные подходы и инструменты, такие как анализ BIAcore® (анализ биомолекулярного взаимодействия) (например, прибор, доступный от BIAcore International AB, компании GE Healthcare, Уппсала, Швеция). Кроме того, анализ KinExA® (анализ кинетического исключения), доступный от Sapidyne Instruments (Boise, Id.), также можно использовать.

Антигенсвязывающий белок по изобретению может связываться с одной мишенью с аффинностью по меньшей мере на один порядок выше, предпочтительно по меньшей мере на два порядка выше, чем для второй мишени.

Термин "мишень" относится к молекуле или части молекулы, способной связываться с антигенсвязывающим белком. В некоторых вариантах осуществления мишень может иметь один или более эпитопов. Поэтому будет понятно, что мишень может служить "антигеном" для "антигенсвязывающего белка" по настоящему изобретению.

Термин "эпитоп" включает любую детерминанту, способную связываться с антигенсвязывающим белком, таким как антитело. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связана с антигенсвязывающим белком, нацеленным на этот антиген, и, когда антиген представляет собой белок, то он включает специфические аминокислоты, которые непосредственно контактируют с антигенсвязывающим белком. Чаще всего эпитопы присутствуют на белках, но в некоторых случаях могут присутствовать на других типах молекул, таких как нуклеиновые кислоты. Эпитопные детерминанты могут включать химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические характеристики заряда. Как правило, антитела, специфичные к конкретному антигену-мишени, предпочтительно/специфически распознают эпитоп на антигене-мишени в сложной смеси белков и/или макромолекул.

В иллюстративных вариантах осуществления агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, образующий часть (I) интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белков по изобретению, содержит три определяющих комплементарность области легкой цепи (CDR), которые по меньшей мере на 90% идентичны последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO: 3; и три CDR тяжелой цепи, которые по меньшей мере на 90% идентичны последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO: 6. Агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент может также содержать три определяющих комплементарность области легкой цепи (CDR), которые идентичны последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO: 3; и три CDR тяжелой цепи, которые идентичны последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO: 6. В таких вариантах осуществления каждая CDR определена в соответствии с определением Kabat, определением Chothia, определением AbM или контактным определением CDR; предпочтительно, где каждая CDR определена в соответствии с определением CDR Kabat или определением CDR Chothia. В конкретных вариантах осуществления каждая CDR определена в соответствии с определением Kabat. В других конкретных вариантах осуществления каждая CDR определена в соответствии с определением Chothia.

Альтернативно, агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, образующий часть (I) интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белков по изобретению, может содержать (a) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 56, CDRH2, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 57, и CDRH3, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 58; и (b) легкую цепь или ее фрагмент, содержащую CDRL1, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 52, CDRL2, которая по меньшей мере на 90% по



65, или последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную им.

В более конкретных вариантах осуществления агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность SEQ ID NO: 59 или последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную ей; и/или тяжелую цепь (HC), которая содержит последовательность SEQ ID NO: 61 или последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную ей.

В других более конкретных вариантах осуществления агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность SEQ ID NO: 59 или последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную ей; и/или тяжелую цепь (HC), которая содержит последовательность SEQ ID NO: 63 или последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную ей.

В других более конкретных вариантах осуществления агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность SEQ ID NO: 59 или последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную ей; и/или тяжелую цепь (HC), которая содержит последовательность SEQ ID NO: 65 или последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную ей.

#### **Варианты и производные интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка или его компонентов**

"Вариант" полипептида (например, интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, антитело, антигенсвязывающий белок или IFN или их компоненты) содержит аминокислотную последовательность, где один, два, три, четыре, пять или более аминокислотных остатков вставлены, делетированы и/или заменены в аминокислотной последовательности по сравнению с другой полипептидной последовательностью. Предпочтительно вариант содержит до десяти вставок, делеций и/или замен, более предпочтительно до восьми вставок, делеций и/или замен. Более конкретно, вариант может содержать до десяти, более предпочтительно, до восьми вставок. Вариант также может содержать до десяти, более предпочтительно до восьми делеций. В еще более предпочтительных вариантах осуществления вариант содержит до десяти замен, наиболее предпочтительно до восьми замен. В некоторых вариантах осуществления эти замены представляют собой консервативные замены аминокислот, как описано ниже.

"Вариант" полинуклеотидной последовательности (например, РНК или ДНК) содержит одну или более мутаций в полинуклеотидной последовательности по сравнению с другой полинуклеотидной последовательностью, при этом один, два, три, четыре, пять или более остатков нуклеиновой кислоты вставлены, делетированы и/или заменены в последовательности нуклеиновой кислоты. Предпочтительно вариант содержит до десяти вставок, делеций и/или замен, более предпочтительно до восьми вставок, делеций и/или замен. Более конкретно, вариант может содержать до десяти, более предпочтительно, до восьми вставок. Вариант также может содержать до десяти, более предпочтительно до восьми делеций. В еще более предпочтительных вариантах осуществления вариант содержит до десяти замен, наиболее предпочтительно до восьми замен. Указанные одна, две, три, четыре, пять или более мутаций могут вызывать одну, две, три, четыре, пять или более аминокислотных замен в аминокислотной последовательности, которую кодирует вариант, по сравнению с другой аминокислотной последовательностью (т.е. "немолчащая мутация"). Варианты также включают последовательности нуклеиновых кислот, в которых один, два, три, четыре, пять или более кодонов заменены их синонимами, что не вызывает замены аминокислот и поэтому называется "молчащей мутацией".

Термин "идентичность" или "гомология" в контексте вариантов полипептидных или нуклеотидных последовательностей относится к взаимосвязи между последовательностями двух или более полипептидных молекул или двух или более молекул нуклеиновых кислот, определяемой путем выравнивания и сравнения последовательностей. "Процент идентичности" означает процент идентичных остатков между аминокислотами или нуклеотидами в сравниваемых молекулах и рассчитывается на основе размера наименьшей из сравниваемых молекул. Предпочтительно идентичность определяют по всей длине последовательности. Понятно, что выражение "идентично по меньшей мере на 80%" включает варианты осуществления, в которых заявленная последовательность по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична эталонной последовательности. Выражение "идентично по меньшей мере на 90%" включает варианты осуществления, в которых заявленная последовательность по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична эталонной последовательности.

Для расчета процентной идентичности пробелы в выравниваниях (если таковые имеются) предпочтительно устраняются с помощью конкретной математической модели или компьютерной программы (т.е. "алгоритма"). Способы, которые можно использовать для определения идентичности выровненных нуклеиновых кислот или полипептидов, включают способы, описанные в *Computational Molecular Biology* (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; *Biocomputing Informatics and Genome Projects*, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, New York: Academic Press; *Sequence Analysis Primer*, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; and Carillo et al., 1988, *SIAM J. Applied Math.* 48:1073.

При вычислении процента идентичности сравниваемые последовательности обычно выравниваются таким образом, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между последовательностями. Одним из примеров компьютерной программы, которую можно использовать для определения процента идентичности, является программный пакет GCG, включающий GAP (Devereux et al., 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI). Компьютерный алгоритм GAP используется для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых необходимо определить процент идентичности последовательности. Последовательности выравниваются для оптимального соответствия их соответствующей аминокислоте или нуклеотиду ("согласованный интервал", как определено алгоритмом). Штраф за открытие пробела (который рассчитывается как  $3x$  средняя диагональ, где "средняя диагональ" представляет собой среднее значение диагонали используемой матрицы сравнения; "диагональ" представляет собой оценку или число, присвоенное каждому идеальному совпадению аминокислот с помощью конкретной матрицы сравнения) и штраф за расширение пробела (который обычно  $1/10$  штрафа за открытие пробела), а также матрица сравнения, такая как PAM 250 или BLOSum 62, используются вместе с алгоритмом. В некоторых вариантах осуществления стандартная матрица сравнения (см. Dayhoff et al., 1978, *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5:345-352 для матрицы сравнения PAM 250; Henikoff et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:10915-10919 для матрицы сравнения BLOSum 62) также используется с помощью алгоритма.

Ниже приведены примеры параметров, которые можно использовать для определения процента идентичности полипептидов или нуклеотидных последовательностей с использованием программы GAP:

Алгоритм: Needleman et al., 1970, *J. Mol. Biol.*, 48:443-453

Матрица сравнения: BLOSum 62 от Henikoff et al., 1992, выше

Штраф за пробел: 12 (но без штрафа за концевые пробелы)

Штраф за длину пробела: 4

Порог сходства: 0

Некоторые схемы выравнивания для выравнивания двух аминокислотных последовательностей могут привести к совпадению только короткой области двух последовательностей, и эта небольшая выровненная область может иметь очень высокую идентичность последовательности, даже если между двумя полноразмерными последовательностями нет существенной взаимосвязи. Соответственно, выбранный метод выравнивания (программа GAP) может быть скорректирован, если это желательно, для получения выравнивания, которое охватывает по меньшей мере 50 или по меньшей мере 100, предпочтительно всю длину, смежных аминокислот целевого полипептида.

Консервативные аминокислотные замены могут охватывать не встречающиеся в природе аминокислотные остатки, которые обычно встраиваются путем химического синтеза пептидов, а не путем синтеза в биологических системах. К ним относятся пептидомиметики и другие обращенные или инвертированные формы аминокислотных фрагментов.

Встречающиеся в природе остатки можно разделить на классы на основе общих свойств боковой цепи:

- 1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 3) кислые: Asp, Glu;
- 4) основные: His, Lys, Arg;
- 5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro; и
- 6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Например, неконсервативные замены могут включать замену члена одного из этих классов на член другого класса. Такие замещенные остатки могут быть введены, например, в области человеческого антитела, которые гомологичны нечеловеческим антителам, или в негомологичные области молекулы.

При внесении изменений в интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок в соответствии с некоторыми вариантами осуществления можно учитывать гидропатический индекс аминокислот. Каждой аминокислоте был присвоен индекс гидропатичности на основе ее характеристик гидрофобности и заряда. Это: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспарат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5).

Важность гидропатического индекса аминокислоты для придания белку интерактивной биологической функции известна специалистам в данной области. Kyte et al., J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982). Известно, что некоторые аминокислоты могут быть заменены другими аминокислотами, имеющими аналогичный гидропатический индекс или показатель, и при этом сохранять аналогичную биологическую активность. При внесении изменений, основанных на гидропатическом индексе, в некоторых вариантах осуществления включают замену аминокислот, гидропатические индексы которых находятся в пределах  $\pm 2$ . В некоторых вариантах осуществления включают те, которые находятся в пределах  $\pm 1$ , а в некоторых вариантах осуществления включают те, которые находятся в пределах  $\pm 0,5$ .

Также в данной области техники понятно, что замена подобных аминокислот может быть эффективно осуществлена на основе гидрофильности. В некоторых вариантах осуществления наибольшая локальная средняя гидрофильность белка, определяемая гидрофильностью его соседних аминокислот, коррелирует с его иммуногенностью и антигенностью, т.е. с биологическим свойством белка.

Этим аминокислотным остаткам были присвоены следующие значения гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспарат (+3,0  $\pm$  1); глутамат (+3,0  $\pm$  1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5  $\pm$  1); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5) и триптофан (-3,4). При внесении изменений, основанных на сходных значениях гидрофильности, в некоторых вариантах осуществления включают замену аминокислот, значения гидрофильности которых находятся в пределах  $\pm 2$ , в некоторых вариантах осуществления включают аминокислоты, значения которых находятся в пределах  $\pm 1$ , а в некоторых вариантах осуществления включают аминокислоты, значения которых находятся в пределах  $\pm 0,5$ .

Примеры аминокислотных замен приведены в табл. 2.

Таблица 2. Аминокислотные замены.2

Исходные остатки	Иллюстративные замены	Предпочтительные замены
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Норлейцин	Leu
Leu	Норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 диаминомасляная кислота, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala, Gly	Ala
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Норлейцин	Leu

В свете настоящего изобретения квалифицированный специалист сможет определить подходящие варианты интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белков, как изложено в настоящем документе, с использованием хорошо известных методов. В некоторых вариантах осуществления специалист в данной области может идентифицировать подходящие области молекулы, которые можно изменить без нарушения активности путем нацеливания на области, которые, как считается, не важны для активности. В некоторых вариантах осуществления можно идентифицировать остатки и части молекул, которые являются консервативными среди сходных полипептидов. В некоторых вариантах осуществления даже области, которые могут быть важны для биологической активности или структуры, могут быть подвергнуты консервативным аминокислотным заменам без нарушения биологической активности или без неблагоприятного воздействия на структуру полипептида.

Кроме того, специалист в данной области может провести обзор структурно-функциональных исследований, выявляющих остатки в сходных полипептидах, которые важны для активности или структуры. Ввиду такого сравнения можно предсказать важность аминокислотных остатков в белке, которые соответствуют аминокислотным остаткам, важным для активности или структуры в сходных белках. Специалист в данной области может выбрать химически сходные аминокислотные замены для таких

спрогнозированных важных аминокислотных остатков.

Специалист в данной области может также проанализировать трехмерную структуру и аминокислотную последовательность по отношению к этой структуре в сходных белках или белковых доменах. Принимая во внимание такую информацию, специалист в данной области может спрогнозировать выравнивание аминокислотных остатков интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка, антигена или его антигенсвязывающего фрагмента или интерферона или его функционального фрагмента, как описано в настоящем документе, в отношении его трехмерной структуры. В некоторых вариантах осуществления специалист в данной области может решить не вносить радикальные изменения в аминокислотные остатки, которые, как предполагается, находятся на поверхности белка, поскольку такие остатки могут быть вовлечены в важные взаимодействия с другими молекулами. Кроме того, специалист в данной области может создать тестовые варианты, содержащие одну аминокислотную замену в каждом желаемом аминокислотном остатке. Затем варианты могут быть подвергнуты скринингу с использованием анализов активности, известных специалистам в данной области. Такие варианты можно использовать для сбора информации о подходящих вариантах. Например, если обнаружено, что изменение конкретного аминокислотного остатка приводит к нарушению, нежелательному снижению или неприемлемой активности, вариантов с таким изменением можно избежать. Другими словами, на основе информации, полученной в результате таких экспериментов, специалист в данной области техники может легко определить аминокислоты, в которых следует избегать дальнейших замен либо отдельно, либо в комбинации с другими мутациями.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления замены аминокислот представляют собой замены, которые: (1) снижают восприимчивость к протеолизу, (2) снижают восприимчивость к окислению, (3) изменяют аффинность связывания для образования белковых комплексов, (4) изменяют аффинность связывания и/или (5) придают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких полипептидов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в природной последовательности (в некоторых вариантах осуществления в части полипептида за пределами домена(ов), образующих межмолекулярные контакты, могут быть выполнены одна или несколько аминокислотных замен (в некоторых вариантах осуществления консервативные аминокислотные замены). В некоторых вариантах осуществления консервативная аминокислотная замена обычно не может существенно изменить структурные характеристики исходной последовательности (например, замещающая аминокислота не должна разрывать спираль, встречающуюся в исходной последовательности, или нарушать другие типы вторичной структуры, характеризующие исходную последовательность). Примеры известных в данной области техники вторичных и третичных структур полипептидов описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden & J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); и Thornton et al., *Nature*, 354:105 (1991), каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Термин "производное" относится к молекуле, которая включает химическую модификацию, отличную от вставки, делеции или замены аминокислот (или нуклеиновых кислот). В некоторых вариантах осуществления производные содержат ковалентные модификации, включая, но не ограничиваясь этим, химическую связь с полимерами, липидами или другими органическими или неорганическими остатками. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированный интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок может иметь более длительный период полувыведения из кровотока, чем интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, который не является химически модифицированным. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированный интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок может обладать улучшенной способностью нацеливания на желаемые клетки, ткани и/или органы. В некоторых вариантах осуществления производное интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка, ковалентно модифицировано для включения одного или более присоединений водорастворимого полимера, включая, но не ограничиваясь этим, полиэтиленгликоль, полиоксиэтиленгликоль или полипропиленгликоль. См., например, патенты США №: 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 и 4179337. В некоторых вариантах осуществления производное интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка содержит один или более полимеров, включая, но не ограничиваясь ими, монометоксиполиэтиленгликоль, декстран, целлюлозу или другие полимеры на основе углеводов, поли-(N-винилпирролидон)-полиэтилен гликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимер полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин) и поливиниловый спирт, а также смеси таких полимеров.

В некоторых вариантах осуществления производное интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка, как описано в настоящем документе, ковалентно модифицировано субъединицами полиэтиленгликоля (ПЭГ). В некоторых вариантах осуществления один или более водорастворимых полимеров связаны в одном или более определенных положениях, например, на N-конце производного. В некоторых вариантах осуществления один или более водорастворимых полимеров случайным образом присоединены к одной или более боковым цепям производного. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ используют для улучшения терапевтической способности интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего



вающего белка. Некоторые такие способы обсуждаются, например, в патенте США № 6133426, который включен сюда в качестве ссылки для любых целей.

В некоторых вариантах осуществления варианты интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка включают варианты гликозилирования, в которых количество и/или тип сайта гликозилирования изменены по сравнению с аминокислотными последовательностями исходного полипептида. В некоторых вариантах осуществления варианты белка содержат большее количество сайтов N-связанного гликозилирования, чем нативный белок. В других вариантах осуществления варианты белка содержат меньшее количество сайтов N-гликозилирования, чем нативный белок. Сайт N-связанного гликозилирования характеризуется последовательностью: Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где аминокислотный остаток, обозначенный как X, может быть любым аминокислотным остатком, кроме пролина. Замена аминокислотных остатков для создания этой последовательности обеспечивает потенциальный новый сайт для добавления N-связанной углеводной цепи. Альтернативно, замены, устраняющие эту последовательность, удаляют существующую N-связанную углеводную цепь. Также предложена реарранжировка N-связанных углеводных цепей, при которой удаляются один, два, три, четыре, пять или более сайтов N-связанного гликозилирования (как правило, встречающихся в природе) и создается один или более новых N-связанных сайтов. Дополнительные предпочтительные варианты включают цистеиновые варианты, в которых один или более остатков цистеина делегирован или замещен другой аминокислотой (например, серином) по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью. Цистеиновые варианты могут быть полезны, когда антитела необходимо преобразовать в биологически активную конформацию, например, после выделения нерастворимых телец включения. Цистеиновые варианты обычно имеют меньше остатков цистеина, чем нативный белок, и обычно имеют их четное количество, чтобы свести к минимуму взаимодействия, возникающие из-за неспаренных цистеинов.

#### **HBV и маркер HBV**

Используемый в настоящем описании термин "вирус гепатита В" или "HBV" относится к двухцепочечному ДНК-вирусу, вызывающему гепатит В, который принадлежит к семейству близкородственных ДНК-вирусов, называемых гепаднавирусами. Гепаднавирусы предпочитают инфицировать клетки печени, но небольшое количество гепаднавирусной ДНК можно обнаружить в почках, поджелудочной железе и мононуклеарных клетках. Однако инфекция в этих местах не связана с внепеченочным заболеванием.

Вирион HBV, т.е. частица Дейна, состоит из внешней липидной оболочки и икосаэдрического ядра нуклеокапсида, состоящего из белка. Нуклеокапсид заключает в себе вирусную ДНК и ДНК-полимеразу, которая обладает активностью обратной транскриптазы аналогично ретровирусам. Внешняя оболочка содержит встроенные белки, которые участвуют в связывании вируса с чувствительными клетками и проникновении в них. Вирус является одним из самых маленьких оболочечных вирусов животных с диаметром вириона 42 нм, но существуют плеоморфные формы, включая нитевидные и сферические тела без ядра. Эти частицы не заразны и состоят из липида и белка, образующих часть поверхности вириона, который называется поверхностным антигеном (HBsAg) и вырабатывается в избытке в течение жизненного цикла вируса. HBV включает HBsAg, HBcAg (и его вариант сплайсинга HBeAg), ДНК-полимеразу и Hbх. HBV является одним из немногих известных неретровирусных вирусов, в процессе репликации которых используется обратная транскрипция.

Нуклеокапсид HBV содержит относительно небольшую и частично дуплексную кольцевую ДНК размером 3,2 т.п.н., вирусную полимеразу и коровый белок. В геноме всего четыре длинные открытые рамки считывания. Пре-SS (пре-поверхностно-поверхностная) область генома кодирует три вирусных поверхностных антигена за счет дифференциальной инициации трансляции в каждом из трех иницирующих кодонов, которые находятся в рамке.

Наиболее распространенным белком HBV является белок S с молекулярной массой 24 кДа (известный как HBsAg). Область pre-C-C (pre-core-core) кодирует HBcAg (ядерный антиген HBV) и HBeAg (антиген e HBV). HBeAg не требуется для репликации вируса и не играет никакой роли в сборке вируса, но, тем не менее, является полезным индикатором активной репликации вируса. Поскольку HBeAg секретируется инфицированными HBV гепатоцитами, его можно детектировать в крови с помощью стандартных диагностических тестов (таких как ИФА) и, таким образом, использовать в качестве лабораторного маркера вирусной инфекции HBV (Testoni et al., Serum hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA. *J. Hepatol.* 2019, 70,615-625. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2018.11.030>).

P-кодирующая область специфична для вирусной полимеразы, многофункционального фермента, участвующего в синтезе ДНК и инкапсуляции РНК. Открытая рамка считывания X кодирует вирусный белок X (Hbх), который модулирует передачу сигнала от клетки-хозяина и может прямо или косвенно влиять на экспрессию генов хозяина и вируса.

Считается, что жизненный цикл HBV начинается, когда вирус прикрепляется к мембране клетки-хозяина через белки оболочки. Было высказано предположение, что HBV связывается с рецептором на плазматической мембране, который преимущественно экспрессируется на гепатоцитах человека через домен pre-S1 белка большой оболочки в качестве начальной стадии инфекции HBV. Однако природа рецептора остается спорной. Затем вирусная мембрана сливается с клеточной мембраной, и вирусный геном высвобождается в клетки.

Репликация HBV может регулироваться различными факторами, включая гормоны, факторы роста и цитокины. После того, как вирусный геном достигает ядра, механизм репарации клеточной ДНК преобразует частичную двухцепочечную ДНК (дцДНК; также называемую расслабленной кольцевой ДНК HBV (кДНК)), геном в ковалентно замкнутую кольцевую ДНК (кзкДНК). Полученная кзкДНК является матрицей для РНК-хозяина Pol-II для дальнейшей транскрипции прегеномной РНК и субгеномной РНК (Allweiss L и Dandri M, The Role of cccDNA in HBV Maintenance. *Viruses* 2017, 9(6):156; doi:10.3390/v9060156; Nur K. Mohd-Ismail, Zijie Lim, Jayantha Gunaratne and Yee-Joo Tan, Mapping the Interactions of HBV cccDNA with Host Factors. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(17):4276; doi:10.3390/ijms20174276).

Прегеномная РНК бифункциональна, она служит как в качестве матрицы для синтеза вирусной ДНК, так и в качестве мессенджера для трансляции рге-С, С и Р. Субгеномные РНК функционируют исключительно для трансляции оболочки и белка Х. Вся вирусная РНК транспортируется в цитоплазму, где при ее трансляции образуются белки оболочки, ядра и полимеразы вируса, а также HBx и HBcAg.

Ядерные частицы HBV собираются в цитозоле, и во время этого процесса одна молекула прегеномной РНК включается в собирающийся вирусный кор. После капсидирования вирусной РНК начинается обратная транскрипция. Синтез двух цепей вирусной ДНК происходит последовательно. Первая цепь ДНК состоит из инкапсулированной матрицы РНК; во время или после синтеза этой цепи происходит деградация матрицы РНК и продолжается синтез второй цепи ДНК с использованием в качестве матрицы вновь полученной первой цепи ДНК. Некоторые ядра, несущие зрелый геном, транспортируются обратно в ядро, где их новоиспеченные геномы ДНК могут быть преобразованы в кзкДНК для поддержания стабильного внутриядерного пула транскрипционных матриц.

Белки поверхностного антигена HBV (HBsAg) изначально синтезируются и полимеризуются в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме. Эти белки транспортируются в компартменты post-ER и рге-Golgi, где следует отпочкование нуклеокапсида. Собранный вирион HBV и субвирусные частицы транспортируются к аппарату Гольджи для дальнейшей модификации гликанов поверхностных белков, а затем секретируются из клетки-хозяина для завершения жизненного цикла.

Интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки, нуклеиновые кислоты, векторы, векторные системы, способы и композиции, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения инфекции HBV. Используемые в настоящем описании термины "лечить инфекцию HBV" и "лечение инфекции HBV" относятся к одному или более из: (i) снижения вирусной нагрузки/титра вируса HBV; (ii) снижения транскрипции кзкДНК; (iii) снижения уровня прегеномной РНК в клетках; (iv) ослабления одного или более заболеваний, связанных с HBV; и (v) ослабление одного или более связанных с HBV симптомов у пациента.

Термины "вирусная нагрузка" и "титр вируса" относятся к количеству вирусных частиц в клетке, органе или телесной жидкости, такой как кровь или сыворотка. Вирусная нагрузка или вирусный титр часто выражается в виде вирусных частиц или инфекционных частиц на мл в зависимости от типа анализа. Сегодня вирусная нагрузка обычно измеряется в международных единицах на миллилитр (МЕ/мл). Вирусную нагрузку или титр вируса можно также определить как эквивалент так называемого вирусного генома. Более высокая вирусная нагрузка, титр или вирусная нагрузка часто коррелируют с тяжестью активной вирусной инфекции. Соответственно, снижение вирусной нагрузки или титра вируса коррелирует с уменьшением количества инфекционных вирусных частиц, например, в сыворотке. Вирусную нагрузку обычно определяют с помощью тестов на основе амплификации нуклеиновых кислот (NAT или NAAT). В тестах NAT/NAAT используется, например, ПЦР, (количественная) полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР или кОТ-ПЦР), амплификация на основе последовательностей нуклеиновых кислот (NASBA) или анализы на основе зондов. Описаны анализы ПЦР в реальном времени для количественного определения ДНК вируса гепатита В, например, в Liu et al., *Virol J* 14, 94 (2017) doi:10.1186/s12985-017-0759-8. Из-за простоты детектирования вирусной ДНК с помощью ПЦР вирусная нагрузка полезна в клинических условиях для контроля успеха во время лечения. Вирусная нагрузка >10000 копий/мл (2000 МЕ/мл) является сильным предиктором риска гепатоцеллюлярной карциномы, независимо от статуса HBeAg.

Термины "пациент" и "субъект" используются взаимозаменяемо и включают людей и животных, не являющихся людьми, предпочтительно людей, а также лиц с официально диагностированными расстройствами, лиц без официально признанных расстройств, лиц, получающих медицинскую помощь, лиц, подверженных риску развития расстройств и т.д.

В конкретных вариантах осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, нуклеиновые кислоты, векторы, векторные системы, способы и композиции, описанные в настоящем документе, можно использовать для снижения вирусной нагрузки/титра вируса HBV в HBV-инфицированной клетке (например, в клетке культуры, в органе, инфицированном HBV, или у больного, инфицированного HBV). Вирусная нагрузка/титр вируса HBV могут быть снижены примерно на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% по сравнению с необработанной клеточной культурой, инфицированной HBV, или с тем же пациентом до лечения. В некоторых вариантах осуществления вирусная нагрузка/титр вируса HBV снижается по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на

40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%. Предпочтительно, чтобы вирусная нагрузка/титр вируса HBV снижались по меньшей мере на 35%, более предпочтительно по меньшей мере на 50%. В некоторых вариантах осуществления вирусную нагрузку/титр вируса определяют с помощью ПЦР или количественной ОТ-ПЦР.

В конкретных вариантах осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, нуклеиновые кислоты, векторы, векторные системы, способы и композиции, описанные в настоящем документе, можно использовать для снижения транскрипции кзкДНК HBV в HBV-инфицированной клетке (например, в клеточной культуре, в HBV-инфицированном органе или у HBV-инфицированного пациента). Транскрипция кзкДНК может быть снижена примерно на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% по сравнению с необработанной культурой клеток, инфицированной HBV, или с тем же пациентом до лечения. В некоторых вариантах осуществления транскрипция кзкДНК HBV снижается по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%. Предпочтительно транскрипция кзкДНК HBV снижается по меньшей мере на 35%, более предпочтительно по меньшей мере на 50%. В некоторых вариантах осуществления транскрипцию кзкДНК HBV определяют с помощью ПЦР или кПЦР.

В конкретных вариантах осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, нуклеиновые кислоты, векторы, векторные системы, способы и композиции, описанные в настоящем документе, можно использовать для снижения уровня прегеномной РНК HBV в HBV-инфицированной клетке (например, в культуре клеток, в органе, инфицированном HBV, или у больного, инфицированного HBV). Уровни прегеномной РНК HBV могут быть снижены примерно на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% по сравнению с необработанной клеточной культурой, инфицированной HBV, или с тем же пациентом до лечения. В некоторых вариантах осуществления уровень прегеномной РНК HBV снижается по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%. Предпочтительно уровень прегеномной РНК HBV снижается по меньшей мере на 35%, более предпочтительно по меньшей мере на 50%. В некоторых вариантах осуществления уровень прегеномной РНК HBV определяют с помощью количественной ОТ-ПЦР.

Используемый в настоящем описании термин "расстройство, связанное с HBV" относится к расстройству, которое возникает в результате инфицирования пациента HBV. Расстройства, связанные с HBV, включают, но не ограничиваются ими, острый гепатит, хронический гепатит, желтушный гепатит, фульминантный гепатит, субфульминантный гепатит и симптомы и/или осложнения, возникающие в результате любого из этих расстройств.

Используемый в настоящем описании термин "связанный с HBV симптом", "симптом инфекции HBV" или "осложнение, связанное с HBV" включает одну или более физических дисфункций, связанных с инфекцией HBV. Симптомы и осложнения HBV включают, но не ограничиваются этим, цирроз печени, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), мембранозный гломерулонефрит (MGN), смерть, острый некротизирующий васкулит (узелковый полиартериит), мембранозный гломерулонефрит, папулезный акродерматит у детей (синдром Джанотти-Крости), HBV-ассоциированную нефропатию (например, мембранозный гломерулонефрит), иммуноопосредованные гематологические нарушения (например, эссенциальная смешанная криоглобулинемия, апластическая анемия), портальная гипертензия, асцит, энцефалопатия, желтуха, зуд, бледный стул, стеаторея, узелковый полиартериит, гломерулярная болезнь, аномальные уровни ALT, аномальные уровни AST, аномальные уровни щелочной фосфатазы, повышение уровня билирубина, анорексия, недомогание, лихорадка, тошнота, рвота и тому подобное.

#### **Интерфероны**

Используемый в настоящем описании термин "интерферон" или "IFN" относится к цитокину или его производному, который обычно продуцируется и высвобождается клетками в ответ на присутствие патогена или опухолевой клетки. IFN включают IFN типа I (например, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$ , IFN $\tau$ , IFN $\zeta$  и IFN $\omega$ ), IFN типа II (например, IFN $\gamma$ ) и IFN типа III (например, IFN $\lambda$ 1, IFN $\lambda$ 2 и IFN $\lambda$ 3). Термин "интерферон" или "IFN" включает, помимо прочего, полноразмерный IFN, его вариант или производное (например, химически (например, пегилированное) модифицированное производное или мутеин), или его функционально активный фрагмент, который сохраняет одну или более сигнальных активностей полноразмерного IFN.

Используемый в настоящем описании термин "функциональный фрагмент" относится к фрагменту

вещества, который сохраняет одну или более функциональных активностей исходного вещества. Например, функциональный фрагмент интерферона относится к фрагменту интерферона, который сохраняет функцию IFN, как описано в настоящем документе, например, он опосредует передачу сигналов пути IFN.

IFN может повышать активность одного или более рецепторов IFN по меньшей мере примерно на 20% при добавлении к клетке, ткани или организму, экспрессирующим родственный рецептор IFN (IFNAR для IFN $\alpha$ , IFNBR для IFN $\beta$  и т.д.). В некоторых вариантах осуществления интерферон активирует активность рецептора IFN по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 85%. Активность IFN (т.е. "активность IFN") может быть измерена, например, используя анализ репортерных клеток *in vitro*, например, с использованием клеток HEK-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  (InvivoGen, Cat. #: hkb-ifn $\alpha\beta$ ), HEK-Blue™ IFN- $\lambda$  (InvivoGen, cat. #: hkb-ifnl) или клеток HEK-Blue™Dual IFN- $\gamma$  (InvivoGen, cat. #: hkb-ifng), как более подробно описано в примере I. Эти репортерные клетки были получены путем стабильной трансфекции клеток HEK293 человеческими генами рецептора IFN и конструкцией секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP), контролируемой респонсивным элементом, стимулируемым IFN, для измерения активности интерферонов. IFN-клетки HEK-Blue™ предназначены для мониторинга активации путей JAK/STAT/ISGF3, индуцированных интерферонами типа I, типа II или типа III. Активация этих путей индуцирует продукцию и высвобождение SEAP.

В контексте настоящего изобретения интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки активируют как путь CD40, так и путь IFN. В некоторых вариантах осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок активирует путь IFN с EC50 менее 100, 60, 50, 40, 30, 20, 10 или 1 нг/мл, предпочтительно с EC50 менее 11 нг/мл, более предпочтительно с EC50 менее 6 нг/мл. В некоторых из этих вариантов осуществления путь IFN представляет собой путь IFN $\alpha$  (интерферон-альфа), IFN $\beta$  (интерферон-бета), IFN $\epsilon$  (интерферон-эпсилон), IFN $\omega$  (интерферон омега), IFN $\gamma$  (интерферон-гамма) или IFN $\lambda$  (интерферон-лямбда).

В соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, описанный в настоящем документе, содержит полноразмерный IFN, его вариант или производное (например, химически (например, пегилированное) модифицированное производное или мутеин), или его функционально активный фрагмент, который сохраняет одну или более сигнальных активностей полноразмерного IFN. В некоторых вариантах осуществления IFN представляет собой человеческий IFN.

В некоторых вариантах осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, как описано в настоящем документе, содержит IFN или его функциональный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из IFN типа I, IFN типа II и IFN типа III, или их функциональных фрагментов.

В конкретных вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN типа I или их функциональный фрагмент. В конкретных вариантах осуществления IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\omega$  или IFN $\epsilon$  или их функциональный фрагмент. В более конкретных вариантах осуществления IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$  или IFN $\beta$  или их функциональный фрагмент. В других более конкретных вариантах осуществления IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN  $\alpha$  или его функциональный фрагмент. В других более конкретных вариантах осуществления IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN  $\beta$  или его функциональный фрагмент. В других более конкретных вариантах осуществления IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\omega$  или его функциональный фрагмент. В других более конкретных вариантах осуществления IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\epsilon$  или его функциональный фрагмент.

В конкретных вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IFN $\lambda$ , IFN $\epsilon$  или IFN $\omega$  или их функциональный фрагмент. В конкретных вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$  или IFN $\beta$  или их функциональный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$  или его функциональный фрагмент. В более конкретных вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$ 2a или его функциональный фрагмент. IFN $\alpha$ 2a может содержать последовательность SEQ ID NO: 17, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

В некоторых вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\beta$  или его функциональный фрагмент. IFN $\beta$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 14 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%. IFN $\beta$  или его функциональный фрагмент может содержать одну или две аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 14, выбранные из C17S и N80Q. В некоторых вариантах осуществления IFN $\beta$  или его функциональный фрагмент содержит

аминокислотную замену С17S относительно SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления IFN $\beta$  содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В других вариантах осуществления IFN $\beta$  содержит аминокислотные замены С17S и N80Q относительно SEQ ID NO: 14. В других вариантах осуществления IFN $\beta$  содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\gamma$  или IFN $\lambda$  или их функциональный фрагмент. В конкретных вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\gamma$  или его функциональный фрагмент. В более конкретных вариантах осуществления IFN $\gamma$  содержит последовательность SEQ ID NO: 19 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%. В других конкретных вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\lambda$  или его функциональный фрагмент. В более конкретных вариантах осуществления IFN $\lambda$  или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\lambda$ 2 или его функциональный фрагмент. IFN $\lambda$ 2 может содержать последовательность SEQ ID NO: 18, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

В некоторых вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\epsilon$  или его функциональный фрагмент. IFN $\epsilon$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 80, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

В некоторых вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\omega$  или его функциональный фрагмент. IFN $\omega$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 79, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

В некоторых вариантах осуществления изменяется уровень экспрессии одного или более биомаркеров сигнального пути IFN, т.е. повышенная или пониженная регуляция, в HBV-инфицированных клетках, обработанных интерферон-ассоциированным антигенсвязывающим белком, описанным в настоящем документе. В соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами осуществления уровень экспрессии одного или более биомаркеров пути IFN повышается в HBV-инфицированных клетках, обработанных интерферон-ассоциированным антигенсвязывающим белком, описанным в настоящем документе. В этом контексте "биомаркер" следует понимать как характеристику, которая объективно измеряется и оценивается как показатель нормальных биологических процессов, патогенных процессов или фармакологических ответов на терапевтическое вмешательство.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления подходящий биомаркер пути IFN, представленный в настоящем документе, представляет собой хемокин, например хемокин С-Х-С, выбранный из группы, состоящей из CXCL9, CXCL10 и CXCL11. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления подходящим биомаркером, индуцируемым IFN-путем, является CXCL9, CXCL10 и/или CXCL11, а также стимулируемый интерфероном ген ISG20. Индукцию или высвобождение цитокинов можно количественно определить с использованием методов, известных в данной области, таких как ИФА. В качестве альтернативы, индукция также может быть определена с использованием анализов на основе РНК, таких как RNAseq или qRT-PCR. В некоторых вариантах осуществления положительная регуляция может относиться по меньшей мере к 1,5-кратному, по меньшей мере к 2-кратному, по меньшей мере к 2,5-кратному, по меньшей мере, к 3-кратному, по меньшей мере к 4-кратному, по меньшей мере к 5-кратному или, по меньшей мере к 10-кратному увеличению экспрессии или секреции этих цитокинов.

В этих или других иллюстративных вариантах осуществления уровень экспрессии провоспалительных цитокинов, например, IL10, IL1 $\beta$  и/или IL2 значительно не активируется в клетках цельной крови человека при обработке интерферон-ассоциированным антигенсвязывающим белком по изобретению. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии IL-10 незначительно повышается в клетках цельной крови человека при обработке интерферон-ассоциированным антигенсвязывающим белком по изобретению. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии IL1 $\beta$  незначительно повышается в клетках цельной крови человека при обработке интерферон-ассоциированным антигенсвязывающим белком по изобретению. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии IL2 незначительно повышается в HBV-инфицированных клетках при обработке интерферон-ассоциированным антигенсвязывающим белком по изобретению. В некоторых вариантах осуществления уровни экспрессии IL10 и IL1 $\beta$  значительно не повышаются в HBV-инфицированных клетках при обработке интерферон-ассоциированным антигенсвязывающим белком по изобретению. В некоторых вариантах осуществления уровни экспрессии IL10 и IL2 значительно не повышаются в HBV-инфицированных клетках при обработке интерферон-ассоциированным антигенсвязывающим белком по изобретению. В некоторых вариантах осуществления уровни экспрессии IL1 $\beta$  и IL2 значительно не повышаются в HBV-инфицированных клетках при обработке интерферон-ассоциированным антигенсвязывающим белком по изобретению. В некоторых вариантах осуществления уровни экспрессии IL10, IL1 $\beta$  и IL2 значительно не повышаются в HBV-инфицированных клетках при обработке интерферон-ассоциированным антигенсвязывающим белком по изобретению.

#### **Интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки**

Термин "ассоциированный", используемый в настоящем документе, обычно относится к ковалентной или нековалентной связи двух (или более) молекул. Ассоциированные белки создаются путем со-

единения двух или более различных пептидов или белков, в результате чего получается белок с одним или более функциональными свойствами, полученными из каждого из исходных белков. В контексте настоящего изобретения интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки активируют как путь CD40, так и путь IFN. Ассоциированный белок охватывает мономерные и мультимерные, например, димерные, тримерные, тетрамерные или подобные, комплексы различных ассоциированных или слитых белков. В этом контексте нековалентная связь возникает в результате сильных взаимодействий между двумя областями поверхности белка, обычно посредством ионных, ван-дер-ваальсовых и/или водородных связей. Ковалентная связь, с другой стороны, требует наличия реальных химических связей, таких как пептидные связи, дисульфидные мостики и т.д. Используемый в настоящем описании термин "слитый" обычно относится к соединению двух или более различных пептидов или белков ковалентным образом посредством пептидной связи. Таким образом, "слитый белок" относится к отдельному белку, созданному путем соединения двух или более различных пептидов или белков с помощью пептидной связи с одним или более функциональными свойствами, полученными от каждого из исходных белков. В некоторых вариантах осуществления два или более различных пептида или белка могут быть слиты друг с другом посредством одного или более пептидных линкеров ("L").

Во всех аспектах изобретения интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой белок, содержащий агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и IFN или его функциональный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент нековалентно связан с агонистическим антителом против CD40 или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом. В более конкретных вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент нековалентно связан с агонистическим антителом против CD40 или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом посредством ионных взаимодействий, Ван-дер-Ваальсовых и/или водородных связей.

В других вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент ковалентно связан с агонистическим антителом против CD40 или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом. В предпочтительных вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с агонистическим антителом против CD40 или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом. IFN или его функциональный фрагмент может быть слит с легкой цепью агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с N-концом легкой цепи агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В других вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с C-концом легкой цепи агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. IFN или его функциональный фрагмент также может быть слит с тяжелой цепью агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с N-концом тяжелой цепи агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В других вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с C-концом тяжелой цепи агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В любом из этих вариантов осуществления агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и IFN или его функциональный фрагмент могут быть слиты друг с другом через линкер.

Термин "линкер" или "L", используемый в настоящем описании, относится к любому фрагменту, который ковалентно соединяет одно или более агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент с одним или более интерфероном или его функциональным фрагментом. В типичных вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер. Термин "пептидный линкер", используемый в настоящем описании, относится к пептиду, адаптированному для связывания двух или более фрагментов. Упомянутый в настоящем описании пептидный линкер может иметь одно или более свойств, описанных ниже. Последовательности пептидного линкера в соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами осуществления представлены в табл. 7.

Пептидный линкер может иметь любую длину, т.е. содержать любое количество аминокислотных остатков. В иллюстративных вариантах осуществления линкер содержит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 аминокислот. Линкер может содержать по меньшей мере 4 аминокислоты. Линкер может содержать по меньшей мере 11 аминокислот. Линкер может содержать по меньшей мере 12 аминокислот. Линкер может содержать по меньшей мере 13 аминокислот. Линкер может содержать по меньшей мере 15 аминокислот. Линкер может содержать по меньшей мере 20 аминокислот. Линкер может содержать по меньшей мере 21 аминокислоту. Линкер может содержать по меньшей мере 24 аминокислоты.

Линкер обычно имеет достаточную длину, чтобы обеспечить достаточную степень гибкости для предотвращения вмешательства связанных частей в активность друг друга, например, способность фрагмента связываться с рецептором. В иллюстративных вариантах осуществления линкер содержит до 10, до 20, до 30, до 40, до 50, до 60, до 70, до 80, до 90 или до 100 аминокислот. Линкер может содержать до 80 аминокислот. Линкер может содержать до 40 аминокислот. Линкер может содержать до 24 аминокис-

лот. Линкер может содержать до 21 аминокислоты. Линкер может содержать до 20 аминокислот. Линкер может содержать до 15 аминокислот. Линкер может содержать до 13 аминокислот. Линкер может содержать до 12 аминокислот. Линкер может содержать до 11 аминокислот. Линкер может содержать до 4 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из группы, включающей жесткие, гибкие и/или образующие спираль линкеры. Понятно, что линкеры, образующие спираль, также могут быть жесткими линкерами, поскольку  $\alpha$ -спираль имеет меньше степеней свободы, чем пептид, принимающий более случайную конформацию спирали. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой жесткий линкер. Типовой жесткий линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 20. Дополнительные типичные жесткие линкеры содержат последовательность SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23. В родственных вариантах осуществления линкер представляет собой образующий спираль линкер. Примеры образующих спираль линкеров содержат последовательность SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23. В других вариантах осуществления линкер представляет собой гибкий линкер. Примеры гибких линкеров содержат последовательность SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 26.

Линкер также может иметь различные химические свойства. Линкер может быть выбран из кислых, основных или нейтральных линкеров. Обычно кислые линкеры содержат одну или более кислых аминокислот, таких как Asp или Glu. Основные линкеры обычно содержат одну или более основных аминокислот, таких как Arg, His и Lys. Оба типа аминокислот очень гидрофильны. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой кислый линкер. Примеры кислых линкеров содержат последовательность SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23. В других вариантах осуществления линкер представляет собой основной линкер. В других вариантах осуществления линкер представляет собой нейтральный линкер. Примеры нейтральных линкеров содержат последовательность SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 26.

В предпочтительных вариантах осуществления линкер представляет собой Gly-Ser или линкер Gly-Ser-Thr, состоящий из нескольких остатков глицина, серина и, где применимо, треонина. В некоторых из этих вариантов осуществления линкер содержит аминокислоты глицин и серин. В более конкретных вариантах осуществления линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления линкер дополнительно содержит аминокислоту треонин. В более конкретном варианте осуществления линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 21.

В типичных вариантах осуществления настоящего изобретения интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок содержит линкер, содержащий последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 20-26, предпочтительно из последовательностей SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 26. В предпочтительном варианте осуществления линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 24. В другом предпочтительном варианте осуществления линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 25. В другом предпочтительном варианте осуществления линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 26.

В различных вариантах осуществления любого из аспектов изобретения интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок не содержит аминокислот, отличных от аминокислот, образующих (I) указанное агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и (II) указанный IFN или его функциональный фрагмент. В родственных вариантах осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок не содержит аминокислот, отличных от аминокислот, образующих (I) указанное агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, (II) указанный IFN или его функциональный фрагмент и (III) указанный линкер.

Иллюстративные варианты осуществления, представляющие различные конфигурации (I) агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, (II) интерферона (IFN) или его функционального фрагмента и (III) линкера, описаны ниже.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с С-концом тяжелой цепи агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер, как указано в табл. 3А или табл. 3В. В этих вариантах осуществления тяжелая цепь агонистического антитела против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент может содержать последовательность SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 61 или SEQ ID NO: 63. IFN $\alpha$ 2a может содержать последовательность SEQ ID NO: 17. IFN $\beta$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16. IFN $\beta$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 14. IFN $\beta$ \_C17S может содержать последовательность SEQ ID NO: 15. IFN $\beta$ \_C17S, N80Q может содержать последовательность SEQ ID NO: 16. IFN $\gamma$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 19. IFN $\lambda$ 2 может содержать последовательность SEQ ID NO: 18. IFN $\epsilon$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 80. IFN $\omega$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 79. Упомянутые линкеры перечислены в табл. 7.

В вариантах осуществления, где IFN слит с С-концом тяжелой цепи агонистического антитела про-

тив CD40 или с его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом, интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок дополнительно содержит легкую цепь агонистического антитела против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент. В более конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 49, а легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 49 в SEQ ID NO: 3. В других более конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 61 или SEQ ID NO: 63, а легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 59.

Таблица 3 Интерферон или его функциональный фрагмент, слитый с С-концом тяжелой цепи антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента

<b>Δ</b>	IFN $\alpha$ 2a	IFN $\beta$	IFN $\beta$ _C17S	IFN $\beta$ _C17S, N80Q	IFN $\gamma$	IFN $\lambda$ 2
<b>RL линкер</b>	антиCD40_H C--RL--IFN $\alpha$ 2a	антиCD40_HC--RL--IFN $\beta$	антиCD40_HC--RL--IFN $\beta$ _C17S	антиCD40_HC--RL--IFN $\beta$ _C17S, N80Q	антиCD40_HC--RL--IFN $\gamma$	антиCD40_H C--RL--IFN $\lambda$ 2
<b>GST линкер</b>	антиCD40_H C--GST--IFN $\alpha$ 2a	антиCD40_HC--GST--IFN $\beta$	антиCD40_HC--GST--IFN $\beta$ _C17S	антиCD40_HC--GST--IFN $\beta$ _C17S, N80Q	антиCD40_HC--GST--IFN $\gamma$	антиCD40_H C--GST--IFN $\lambda$ 2
<b>HL линкер</b>	антиCD40_H C--HL--IFN $\alpha$ 2a	антиCD40_HC--HL--IFN $\beta$	антиCD40_HC--HL--IFN $\beta$ _C17S	антиCD40_HC--HL--IFN $\beta$ _C17S, N80Q	антиCD40_HC--HL--IFN $\gamma$	антиCD40_H C--HL--IFN $\lambda$ 2
<b>HL2 линкер</b>	антиCD40_H C--HL2--IFN $\alpha$ 2a	антиCD40_HC--HL2--IFN $\beta$	антиCD40_HC--HL2--IFN $\beta$ _C17S	антиCD40_HC--HL2--IFN $\beta$ _C17S, N80Q	антиCD40_HC--HL2--IFN $\gamma$	антиCD40_H C--HL2--IFN $\lambda$ 2
<b>(G4S)2 линкер</b>	антиCD40_H C--(G4S)2--IFN $\alpha$ 2a	антиCD40_HC--(G4S)2--IFN $\beta$	антиCD40_HC--(G4S)2--IFN $\beta$ _C17S	антиCD40_HC--(G4S)2--IFN $\beta$ _C17S, N80Q	антиCD40_HC--(G4S)2--IFN $\gamma$	антиCD40_H C--(G4S)2--IFN $\lambda$ 2
<b>(G4S)3 линкер</b>	антиCD40_H C--(G4S)3--IFN $\alpha$ 2a	антиCD40_HC--(G4S)3--IFN $\beta$	антиCD40_HC--(G4S)3--IFN $\beta$ _C17S	антиCD40_HC--(G4S)3--IFN $\beta$ _C17S, N80Q	антиCD40_HC--(G4S)3--IFN $\gamma$	антиCD40_H C--(G4S)3--IFN $\lambda$ 2
<b>(G4S)4 линкер</b>	антиCD40_H C--(G4S)4--IFN $\alpha$ 2a	антиCD40_HC--(G4S)4--IFN $\beta$	антиCD40_HC--(G4S)4--IFN $\beta$ _C17S	антиCD40_HC--(G4S)4--IFN $\beta$ _C17S, N80Q	антиCD40_HC--(G4S)4--IFN $\gamma$	антиCD40_H C--(G4S)4--IFN $\lambda$ 2

<b>B</b>	IFN $\epsilon$	IFN $\omega$
<b>RL линкер</b>	антиCD40_HC--RL--IFN $\epsilon$	антиCD40_HC--RL--IFN $\omega$
<b>GST линкер</b>	антиCD40_HC--GST--IFN $\epsilon$	антиCD40_HC--GST--IFN $\omega$
<b>HL линкер</b>	антиCD40_HC--HL--IFN $\epsilon$	антиCD40_HC--HL--IFN $\omega$
<b>HL2 линкер</b>	антиCD40_HC--HL2--IFN $\epsilon$	антиCD40_HC--HL2--IFN $\omega$
<b>(G4S)2 линкер</b>	антиCD40_HC--(G4S)2--IFN $\epsilon$	антиCD40_HC--(G4S)2--IFN $\omega$
<b>(G4S)3 линкер</b>	антиCD40_HC--(G4S)3--IFN $\epsilon$	антиCD40_HC--(G4S)3--IFN $\omega$
<b>(G4S)4 линкер</b>	антиCD40_HC--(G4S)4--IFN $\epsilon$	антиCD40_HC--(G4S)4--IFN $\omega$

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с N-концом тяжелой цепи агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер, как указано в табл. 4A или табл. 4B. В этих вариантах осуществления тяжелая цепь агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента может содержать последовательность SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 48., SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 65. IFN $\alpha$ 2a



может содержать последовательность SEQ ID NO: 17. IFN $\beta$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16. IFN $\beta$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 14. IFN $\beta$ \_C17S может содержать последовательность SEQ ID NO: 15. IFN $\beta$ \_C17S, N80Q может содержать последовательность SEQ ID NO: 16. IFN $\gamma$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 19. IFN $\lambda$ 2 может содержать последовательность SEQ ID NO: 18. IFN $\epsilon$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 80. IFN $\omega$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 79. Упомянутые линкеры перечислены в табл. 7.

В вариантах осуществления, где IFN слит с N-концом тяжелой цепи агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок дополнительно содержит легкую цепь агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В более конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 или SEQ ID NO: 50, а легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 3. В других более конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 65, а легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 59.

Таблица 4. Интерферон или его функциональный фрагмент, слитый с N-концом тяжелой цепи антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента

<b>A</b>	<b>IFN<math>\alpha</math>2a</b>	<b>IFN<math>\beta</math></b>	<b>IFN<math>\beta</math>_C17S</b>	<b>IFN<math>\beta</math>_C17S, N80Q</b>	<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>IFN<math>\lambda</math>2</b>
<b>RL линкер</b>	IFN $\alpha$ 2a--RL-- антиCD40_H C	IFN $\beta$ --RL-- антиCD40_ HC	IFN $\beta$ _C17 S--RL-- антиCD4 0_HC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q--RL-- антиCD40_H C	IFN $\gamma$ -- RL-- антиCD4 0_HC	IFN $\lambda$ 2-- RL-- антиCD4 0_HC
<b>GST линкер</b>	IFN $\alpha$ 2a-- GST-- антиCD40_H C	IFN $\beta$ --GST-- антиCD40_ HC	IFN $\beta$ _C17 S--GST-- антиCD4 0_HC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q--GST-- антиCD40_H C	IFN $\gamma$ -- GST-- антиCD4 0_HC	IFN $\lambda$ 2-- GST-- антиCD4 0_HC
<b>HL линкер</b>	IFN $\alpha$ 2a--HL-- антиCD40_H C	IFN $\beta$ --HL-- антиCD40_ HC	IFN $\beta$ _C17 S--HL-- антиCD4 0_HC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q--HL-- антиCD40_H C	IFN $\gamma$ -- HL-- антиCD4 0_HC	IFN $\lambda$ 2-- HL-- антиCD4 0_HC
<b>HL2 линкер</b>	IFN $\alpha$ 2a-- HL2-- антиCD40_H C	IFN $\beta$ --HL2-- антиCD40_ HC	IFN $\beta$ _C17 S--HL2-- антиCD4 0_HC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q--HL2-- антиCD40_H C	IFN $\gamma$ -- HL2-- антиCD4 0_HC	IFN $\lambda$ 2-- HL2-- антиCD4 0_HC
<b>(G4S)2 линкер</b>	IFN $\alpha$ 2a-- (G4S)2-- антиCD40_H C	IFN $\beta$ -- (G4S)2-- антиCD40_ HC	IFN $\beta$ _C17 S-- (G4S)2-- антиCD4 0_HC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-- (G4S)2-- антиCD40_H C	IFN $\gamma$ -- (G4S)2-- антиCD4 0_HC	IFN $\lambda$ 2-- (G4S)2-- антиCD4 0_HC
<b>(G4S)3 линкер</b>	IFN $\alpha$ 2a-- (G4S)3-- антиCD40_H C	IFN $\beta$ -- (G4S)3-- антиCD40_ HC	IFN $\beta$ _C17 S-- (G4S)3-- антиCD4 0_HC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-- (G4S)3-- антиCD40_H C	IFN $\gamma$ -- (G4S)3-- антиCD4 0_HC	IFN $\lambda$ 2-- (G4S)3-- антиCD4 0_HC
<b>(G4S)4 линкер</b>	IFN $\alpha$ 2a-- (G4S)4-- антиCD40_H C	IFN $\beta$ -- (G4S)4-- антиCD40_ HC	IFN $\beta$ _C17 S-- (G4S)4-- антиCD4 0_HC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-- (G4S)4-- антиCD40_H C	IFN $\gamma$ -- (G4S)4-- антиCD4 0_HC	IFN $\lambda$ 2-- (G4S)4-- антиCD4 0_HC

<b>линкер</b>	антиCD40_НС	антиCD40_НС	(G4S)4-- антиCD40_НС	(G4S)4-- антиCD40_НС	антиCD40_НС	антиCD40_НС
---------------	-------------	-------------	-------------------------	-------------------------	-------------	-------------

<b>В</b>	<b>IFNε</b>	<b>IFNω</b>
<b>RL</b> <b>линкер</b> <b>р</b>	IFNε--RL-- антиCD40_НС	IFNω--RL-- антиCD40_НС
<b>GST</b> <b>линкер</b> <b>р</b>	IFNε--GST-- антиCD40_НС	IFNω--GST-- антиCD40_НС
<b>HL</b> <b>линкер</b> <b>р</b>	IFNε--HL-- антиCD40_НС	IFNω--HL-- антиCD40_НС
<b>HL2</b> <b>линкер</b> <b>р</b>	IFNε--HL2-- антиCD40_НС	IFNω--HL2-- антиCD40_НС
<b>(G4S)2</b> <b>линкер</b> <b>р</b>	IFNε-- (G4S)2-- антиCD40_НС	IFNω-- (G4S)2-- антиCD40_НС
<b>(G4S)3</b> <b>линкер</b> <b>р</b>	IFNε-- (G4S)3-- антиCD40_НС	IFNω-- (G4S)3-- антиCD40_НС
<b>(G4S)4</b> <b>линкер</b> <b>р</b>	IFNε-- (G4S)4-- антиCD40_НС	IFNω-- (G4S)4-- антиCD40_НС

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления IFN слит с С-концом легкой цепи агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер, как указано в табл. 5А или табл. 5В. В этих вариантах осуществления легкая цепь агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента может содержать последовательность SEQ ID NO: 3. В других вариантах осуществления легкая цепь может содержать последовательность SEQ ID NO: 59. IFNα<sub>2a</sub> может содержать последовательность SEQ ID NO: 17. IFNβ может содержать последовательность SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16. IFNβ может содержать последовательность SEQ ID NO: 14. IFNβ\_C17S может содержать последовательность SEQ ID NO: 15. IFNβ\_C17S, N80Q может содержать последовательность SEQ ID NO: 16. IFNγ может содержать последовательность SEQ ID NO: 19. IFNλ<sub>2</sub> может содержать последовательность SEQ ID NO: 18. IFNε может содержать последовательность SEQ ID NO: 80. IFNω может содержать последовательность SEQ ID NO: 79. Упомянутые линкеры перечислены в табл. 7.

В вариантах осуществления, где IFN слит с С-концом легкой цепи агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок дополнительно содержит тяжелую цепь агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В более конкретных вариантах осуществления легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 3, а тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 12. В других более конкретных вариантах осуществления легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 59, а тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 65.

Таблица 5. Интерферон или его функциональный фрагмент, слитый с С-концом легкой цепи антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента

<b>А</b>	<b>IFN<math>\alpha</math>2a</b>	<b>IFN<math>\beta</math></b>	<b>IFN<math>\beta</math>_C17S</b>	<b>IFN<math>\beta</math>_C17S, N80Q</b>	<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>IFN<math>\lambda</math>2</b>
<b>RL линкер</b>	антиCD40_LC-RL--IFN $\alpha$ 2a	антиCD40_LC--RL--IFN $\beta$	антиCD40_LC--RL--IFN $\beta$ _C17S	антиCD40_LC--RL--IFN $\beta$ _C17S, N80Q	антиCD40_LC--RL--IFN $\gamma$	антиCD40_LC--RL--IFN $\lambda$ 2
<b>GST линкер</b>	антиCD40_LC--GST--IFN $\alpha$ 2a	антиCD40_LC--GST--IFN $\beta$	антиCD40_LC--GST--IFN $\beta$ _C17S	антиCD40_LC--GST--IFN $\beta$ _C17S, N80Q	антиCD40_LC--GST--IFN $\gamma$	антиCD40_LC--GST--IFN $\lambda$ 2
<b>HL линкер</b>	антиCD40_LC--HL--IFN $\alpha$ 2a	антиCD40_LC--HL--IFN $\beta$	антиCD40_LC--HL--IFN $\beta$ _C17S	антиCD40_LC--HL--IFN $\beta$ _C17S, N80Q	антиCD40_LC--HL--IFN $\gamma$	антиCD40_LC--HL--IFN $\lambda$ 2
<b>HL2 линкер</b>	антиCD40_LC--HL2--IFN $\alpha$ 2a	антиCD40_LC--HL2--IFN $\beta$	антиCD40_LC--HL2--IFN $\beta$ _C17S	антиCD40_LC--HL2--IFN $\beta$ _C17S, N80Q	антиCD40_LC--HL2--IFN $\gamma$	антиCD40_LC--HL2--IFN $\lambda$ 2
<b>(G4S)2 линкер</b>	антиCD40_LC--(G4S)2--IFN $\alpha$ 2a	антиCD40_LC--(G4S)2--IFN $\beta$	антиCD40_LC--(G4S)2--IFN $\beta$ _C17S	антиCD40_LC--(G4S)2--IFN $\beta$ _C17S, N80Q	антиCD40_LC--(G4S)2--IFN $\gamma$	антиCD40_LC--(G4S)2--IFN $\lambda$ 2
<b>(G4S)3 линкер</b>	антиCD40_LC--(G4S)3--IFN $\alpha$ 2a	антиCD40_LC--(G4S)3--IFN $\beta$	антиCD40_LC--(G4S)3--IFN $\beta$ _C17S	антиCD40_LC--(G4S)3--IFN $\beta$ _C17S, N80Q	антиCD40_LC--(G4S)3--IFN $\gamma$	антиCD40_LC--(G4S)3--IFN $\lambda$ 2
<b>(G4S)4 линкер</b>	антиCD40_LC--(G4S)4--IFN $\alpha$ 2a	антиCD40_LC--(G4S)4--IFN $\beta$	антиCD40_LC--(G4S)4--IFN $\beta$ _C17S	антиCD40_LC--(G4S)4--IFN $\beta$ _C17S, N80Q	антиCD40_LC--(G4S)4--IFN $\gamma$	антиCD40_LC--(G4S)4--IFN $\lambda$ 2
<b>В</b>	<b>IFN<math>\epsilon</math></b>	<b>IFN<math>\omega</math></b>				
<b>RL линкер</b>	антиCD40_LC-RL--IFN $\epsilon$	антиCD40_LC--RL--IFN $\omega$				
<b>GST линкер</b>	антиCD40_LC--GST--IFN $\epsilon$	антиCD40_LC--GST--IFN $\omega$				
<b>HL линкер</b>	антиCD40_LC-HL--IFN $\epsilon$	антиCD40_LC--HL--IFN $\omega$				
<b>HL2 линкер</b>	антиCD40_LC-HL2--IFN $\epsilon$	антиCD40_LC--HL2--IFN $\omega$				
<b>(G4S)2 линкер</b>	антиCD40_LC--(G4S)2--IFN $\epsilon$	антиCD40_LC--(G4S)2--IFN $\omega$				
<b>(G4S)3 линкер</b>	антиCD40_LC--(G4S)3--IFN $\epsilon$	антиCD40_LC--(G4S)3--IFN $\omega$				
<b>(G4S)4 линкер</b>	антиCD40_LC--(G4S)4--IFN $\epsilon$	антиCD40_LC--(G4S)4--IFN $\omega$				

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления IFN слит с N-концом легкой цепи агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер, как указано в табл. 6А или табл. 6В. В этих вариантах осуществления легкая цепь агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента может содержать последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 59. IFN $\alpha$ 2a может содержать последовательность SEQ ID NO: 17. IFN $\beta$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16. IFN $\beta$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 14. IFN $\beta$ \_C17S может содержать последовательность SEQ ID NO: 15. IFN $\beta$ \_C17S, N80Q может содержать последовательность SEQ ID NO: 16. IFN $\gamma$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 19. IFN $\lambda$ 2 может содержать последовательность SEQ ID NO: 18. IFN $\epsilon$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 80. IFN $\omega$  может содержать последовательность SEQ ID NO: 79. Упомянутые линкеры перечислены в табл. 7.

В вариантах осуществления, где IFN слит с N-концом легкой цепи агонистического антитела про-

тив CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок дополнительно содержит тяжелую цепь агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В более конкретных вариантах осуществления легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 3, а тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 50. В других более конкретных вариантах осуществления легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 59, а тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 65.

Таблица 6. Интерферон или его функциональный фрагмент, слитый с N-концом легкой цепи антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента

<b>A</b>	<b>IFN<math>\alpha</math>2a</b>	<b>IFN<math>\beta</math></b>	<b>IFN<math>\beta</math>_C17S</b>	<b>IFN<math>\beta</math>_C17S, N80Q</b>	<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>IFN<math>\lambda</math>2</b>
<b>RL</b> <b>линкер</b>	IFN $\alpha$ 2a-- RL-- антиCD40 _LC	IFN $\beta$ --RL-- антиCD40 _LC	IFN $\beta$ _C17S --RL-- антиCD40_ LC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q--RL-- антиCD40_ LC	IFN $\gamma$ --RL-- антиCD40 _LC	IFN $\lambda$ 2-- RL-- антиCD40 _LC
<b>GST</b> <b>линкер</b>	IFN $\alpha$ 2a-- GST-- антиCD40 _LC	IFN $\beta$ -- GST-- антиCD40 _LC	IFN $\beta$ _C17S --GST-- антиCD40_ LC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q--GST-- антиCD40_ LC	IFN $\gamma$ -- GST-- антиCD40 _LC	IFN $\lambda$ 2-- GST-- антиCD40 _LC
<b>HL</b> <b>линкер</b>	IFN $\alpha$ 2a-- HL-- антиCD40 _LC	IFN $\beta$ --HL-- антиCD40 _LC	IFN $\beta$ _C17S --HL-- антиCD40_ LC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q--HL-- антиCD40_ LC	IFN $\gamma$ --HL-- антиCD40 _LC	IFN $\lambda$ 2-- HL-- антиCD40 _LC
<b>HL2</b> <b>линкер</b>	IFN $\alpha$ 2a-- HL2-- антиCD40 _LC	IFN $\beta$ -- HL2-- антиCD40 _LC	IFN $\beta$ _C17S --HL2-- антиCD40_ LC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q--HL2-- антиCD40_ LC	IFN $\gamma$ -- HL2-- антиCD40 _LC	IFN $\lambda$ 2-- HL2-- антиCD40 _LC
<b>(G4S)</b> <b>2</b> <b>линкер</b>	IFN $\alpha$ 2a-- (G4S)2-- антиCD40 _LC	IFN $\beta$ -- (G4S)2-- антиCD40 _LC	IFN $\beta$ _C17S --(G4S)2-- антиCD40_ LC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q--(G4S)2-- антиCD40_ LC	IFN $\gamma$ -- (G4S)2-- антиCD40 _LC	IFN $\lambda$ 2-- (G4S)2-- антиCD40 _LC
<b>(G4S)</b> <b>3</b> <b>линкер</b>	IFN $\alpha$ 2a-- (G4S)3-- антиCD40 _LC	IFN $\beta$ -- (G4S)3-- антиCD40 _LC	IFN $\beta$ _C17S --(G4S)3-- антиCD40_ LC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q--(G4S)3-- антиCD40_ LC	IFN $\gamma$ -- (G4S)3-- антиCD40 _LC	IFN $\lambda$ 2-- (G4S)3-- антиCD40 _LC
<b>(G4S)</b> <b>4</b> <b>линкер</b>	IFN $\alpha$ 2a-- (G4S)4-- антиCD40 _LC	IFN $\beta$ -- (G4S)4-- антиCD40 _LC	IFN $\beta$ _C17S --(G4S)4-- антиCD40_ LC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q--(G4S)4-- антиCD40_ LC	IFN $\gamma$ -- (G4S)4-- антиCD40 _LC	IFN $\lambda$ 2-- (G4S)4-- антиCD40 _LC
<b>B</b>	<b>IFN<math>\epsilon</math></b>	<b>IFN<math>\omega</math></b>				
<b>RL</b> <b>линкер</b>	IFN $\epsilon$ --RL-- антиCD40 LC	IFN $\omega$ --RL-- антиCD40 LC				
<b>GST</b> <b>линкер</b>	IFN $\epsilon$ --GST-- антиCD40 LC	IFN $\omega$ --GST-- антиCD40 LC				
<b>HL</b> <b>линкер</b>	IFN $\epsilon$ --HL-- антиCD40 LC	IFN $\omega$ --HL-- антиCD40 LC				
<b>HL2</b> <b>линкер</b>	IFN $\epsilon$ --HL2-- антиCD40 LC	IFN $\omega$ --HL2-- антиCD40 LC				
<b>(G4S)2</b> <b>линкер</b>	IFN $\epsilon$ --(G4S)2-- антиCD40 LC	IFN $\omega$ --(G4S)2-- антиCD40 LC				
<b>(G4S)3</b> <b>линкер</b>	IFN $\epsilon$ --(G4S)3-- антиCD40 LC	IFN $\omega$ --(G4S)3-- антиCD40 LC				
<b>(G4S)4</b> <b>линкер</b>	IFN $\epsilon$ --(G4S)4-- антиCD40 LC	IFN $\omega$ --(G4S)4-- антиCD40 LC				

Примеры последовательностей, содержащихся в интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белках по изобретению или их предшественниках, перечислены в табл. 7.

В типичных предпочтительных вариантах осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок содержит слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащее последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28-47 или SEQ ID NO: 66-75. В других иллюстративных вариантах осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок содержит слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащее последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 81-88. В иллюстративных предпочтительных вариантах осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащее последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28-47 или SEQ ID NO: 66-75. В других иллюстративных вариантах осуществления





В другом еще более предпочтительном варианте осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок содержит слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический связывающий фрагмент, содержащее последовательность SEQ ID NO: 73. В другом еще более предпочтительном варианте осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический связывающий фрагмент, содержащее последовательность SEQ ID NO: 73.

В другом еще более предпочтительном варианте осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок содержит слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический связывающий фрагмент, содержащее последовательность SEQ ID NO: 74. В другом еще более предпочтительном варианте осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический связывающий фрагмент, содержащее последовательность SEQ ID NO: 74.

В другом еще более предпочтительном варианте осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок содержит слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический связывающий фрагмент, содержащее последовательность SEQ ID NO: 75. В другом еще более предпочтительном варианте осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический связывающий фрагмент, содержащее последовательность SEQ ID NO: 75.

Таблица 7. Последовательности иллюстративного интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка и его компонентов на основе антитела против CD40 CP870,893. Последовательности, выделенные курсивом, соответствуют сигнальным пептидам. Последовательности, выделенные жирным курсивом в SEQ ID NO: 3 и 6, соответствуют областям CDR. Последовательности, выделенные жирным шрифтом, не выделены курсивом, соответствуют линкерам. Мутированные аминокислоты подчеркнуты.

Название/SEQ ID номер	Последовательность
Сигнальный пептид 1 (SEQ ID NO 1)	MGWSCIILFLVATATGVHS
Сигнальный пептид 2 (SEQ ID NO 2)	MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC

легкая цепь антитела против CD40 (SEQ ID NO 3)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQA NIFPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
легкая цепь антитела против CD40 с сигнальным пептидом 1 (SEQ ID NO 4)	MGWSCILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQ GIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSDFTLT TISLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
легкая цепь антитела против CD40 с сигнальным пептидом 2 (SEQ ID NO 5)	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCIDIQMTQSPSSVSASVGDRTITC RASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSG TDFLTISLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
тяжелая цепь антитела против CD40 hlgG2 dK (SEQ ID NO 6)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTK VDKTVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVET CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAIEKTIKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
тяжелая цепь антитела против CD40 hlgG2 dK с сигнальным пептидом 1 (SEQ ID NO 7)	MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGR VTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCS YFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFG TQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPA PIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
тяжелая цепь антитела против CD40 hlgG2 dK с сигнальным	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQK FQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTN GVCSYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGC



пептидом 2 (SEQ ID NO 8)	LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVVTVPS SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
тяжелая цепь антитела против CD40 hIgG2 (SEQ ID NO 9)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWRQAPGQ GLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH TFPAVLQSSGLYLSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKT VERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVV DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPGK
тяжелая цепь антитела против CD40hIgG2 с сигнальным пептидом 1 (SEQ ID NO 10)	MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTGYYMHWRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGR VTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCS YFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPA PIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
тяжелая цепь антитела против CD40 hIgG2 с сигнальным пептидом 2 (SEQ ID NO 11)	MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTGYYMHWRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQK FQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTN GVCSYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVVTVPS SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
тяжелая цепь антитела против CD40 hIgG1 - NNAS (SEQ ID NO 48)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWRQAPGQ GLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH TFPAVLQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNNASRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP

	PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQK SLSLSPGK
тяжелая цепь антитела против CD40 hlgG1 - NNAS-dK (SEQ ID NO 49)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ GLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNNASRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQK SLSLSPG
тяжелая цепь Fab-области антитела против CD40 hlgG2 (SEQ ID NO 12)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ GLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDDK VERKCCVE
тяжелая цепь Fab-области антитела против CD40 hlgG2 с сигнальным пептидом 1 (SEQ ID NO 13)	MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGR VTMTRDTSISTA YMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCS YFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDDKVERKCCVE
тяжелая цепь Fab-области антитела против CD40 hlgG2 --TEV--6His- фрагмент (SEQ ID NO 50)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ GLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDDK VERKCCVEENLYFQSHHHHHH
IFN $\beta$ dM (SEQ ID NO 76)	SYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQ LQFQKEDAALTIYEMLNIFAIQRDSSSTGWNETIVENLLANVY HQNHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYYGRILHYLKAKE YSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN
IFN $\beta$ dM C17S (SEQ ID NO 77)	SYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQ LQFQKEDAALTIYEMLNIFAIQRDSSSTGWNETIVENLLANVY HQNHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYYGRILHYLKAKE YSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN
IFN $\beta$ (SEQ ID NO 14)	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIK QLQFQKEDAALTIYEMLNIFAIQRDSSSTGWNETIVENLLANV YHQNHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYYGRILHYLKAK

	EYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN
IFN $\beta$ C17S (SEQ ID NO 15)	MSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIK QLQQFQKEDAALTIYEMLQNFIFRQDSSSTGWNETIVENLLANV YHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKAK EYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN
IFN $\beta$ C17S, N80Q (SEQ ID NO 16)	MSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIK QLQQFQKEDAALTIYEMLQNFIFRQDSSSTGWQETIVENLLANV YHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKAK EYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN
IFN $\alpha$ 2a (SEQ ID NO 17)	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGN QFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETL LDKFYTELYQQ LNDLEACVIQGVGVTE TPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSP CAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
IFN $\lambda$ 2 (SEQ ID NO 18)	VPVARLHGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLL KDCRCHSRLFPRTWDLRQLQVRERPMALAEALATLKVLEATAD TDPALVDVLDQPLHLHILSQFRACIQPQPTAGPRTRGRLLHHL YRLQEAPKKESPGCLEASVTFNLFRLTRDLNLCV ASGDLCV
IFN $\gamma$ (SEQ ID NO 19)	QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKI MQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKR DDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHEL IQVMAELSPA AKTGKRKRSQ MLFRGRRASQ
IFN $\omega$ (SEQ ID NO 79)	LGCDLPQNHGLLSRNTLVLLHQMRRI SPFLCLKDRRDFRFPQEMV KGSQIQKAHVMSVLHEMLQQIFSLFHTERSAAWNMTLLDQLHT GLHQQLQHLETCLLQVVGEGESAGAISSPALTRR YFQGI RYVLKE KKYSDCAWEVV RMEIMKSLFLSTNMQERLRSKDRDLGSS
IFN $\epsilon$ (SEQ ID NO 80)	LDLKLIFQQRQVNQESLKLNLQTL SIQQCLPHRKNFLLPQKSL S PQQYQKGH TLAILHEMLQQIFSLFRANISLDGWEENHTEKFLIQLH QQLEYLEALMGLEAEKLSGTLGSDNLR LQVKMYFRRIHDYLENQ DYSTCAWAIVQVEISRCLFFVFLTEKLSKQGRPLNDMKQELTTEF RSPR
RL линкер (SEQ ID NO 20)	<b>PAPA</b>
GST линкер (SEQ ID NO 21)	<b>SGGTSGSTSGTGS</b>
HL линкер (SEQ ID NO 22)	<b>AEAAAKEAAKA</b>
HL2 линкер (SEQ ID NO 23)	<b>AEAAAKEAAKAAEAAAKEAAKA</b>
(G4S)2 линкер	<b>GGGGSGGGGS</b>

(SEQ ID NO 24)	
(G4S)3 линкер (SEQ ID NO 25)	<b>GGGGSGGGGSGGGGS</b>
(G4S)4 линкер (SEQ ID NO 26)	<b>GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS</b>
TEV-6His- фрагмент (SEQ ID NO 27)	ENLYFQSHHHHHH
антиCD40_LC-- HL--IFNβ (SEQ ID NO 28)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPN LLIYTAATLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANI FPLTFGGGTGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC <b>AEEAAAKEAAAK</b> AMS YNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQL QQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNENETIVENLLANVYH QINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIHLHYLKAKEY SHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN
антиCD40_LC-- HL--IFNβ_C17S (SEQ ID NO 29)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPN LLIYTAATLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANI FPLTFGGGTGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC <b>AEEAAAKEAAAK</b> AMS YNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQL QQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNENETIVENLLANVYH QINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIHLHYLKAKEY SHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN
антиCD40_hIgG 2_dK_HC--RL-- IFNβ (SEQ ID NO 30)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ GLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKT VERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG <b>PAP</b> AMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRM NFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNENI VENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYG RILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN
антиCD40_hIgG 2_dK_HC--RL-- IFNβ_C17S (SEQ ID NO 31)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ GLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKT

	<p>VERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVEVTCVVV  DVSHEDEPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV  VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP  SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML  DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLS  LSPG<b>PAP</b>AMSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRM  NFDIPEEIKQLQFQKEDAALTIYEMLNIFAIFRQDSSSTGWNETI  VENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYG  RILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN</p>
<p>антиCD40_hIgG  2_dK_HC--HL--  IFNβ  (SEQ ID NO 32)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ  GLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELNRLR  SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSASTKG  PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH  TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKT  VERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVEVTCVVV  DVSHEDEPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV  VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP  SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML  DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLS  LSPG<b>A</b>EA<b>A</b>KE<b>A</b>KA<b>A</b>MSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGR  LEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQFQKEDAALTIYEMLNIFAIFRQD  SSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSS  SLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL  RN</p>
<p>антиCD40_hIgG  2_dK_HC--HL--  IFNβ_C17S  (SEQ ID NO 33)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ  GLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELNRLR  SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSASTKG  PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH  TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKT  VERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVEVTCVVV  DVSHEDEPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV  VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP  SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML  DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLS  LSPG<b>A</b>EA<b>A</b>KE<b>A</b>KA<b>A</b>MSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRL  EYCLKDRMNFDIPEEIKQLQFQKEDAALTIYEMLNIFAIFRQDSS  STGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSL  HLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN</p>
<p>антиCD40_LC--  RL--IFNβ  (SEQ ID NO 34)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPN  LLIYTAATLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQANI  FPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVEFIPPSDEQLKSGTASVVCLLNIFY  PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKAD  YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC<b>PAP</b>AMSYNLLGFLQRS  SNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQFQKEDAAL  TIYEMLNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLE  EKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRV  EILRNIFYFINRLTGYL RN</p>
<p>антиCD40_LC--</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPN  LLIYTAATLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQANI</p>

RL--IFN $\beta$ _C17S (SEQ ID NO 35)	FPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLTKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECAPAPAMSYNLLGFLQRS SNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEIKQLQFQKEDAAL TIYEMLQNFIAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLE EKLEKEDFTRGKLMSSHLKRYYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRV EILRNIFYFINRLTGYLRLN
антиCD40_LC-- GST-- IFN $\beta$ _C17S (SEQ ID NO 36)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPN LLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANI FPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLTKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSSGGTSGTSGTSGSMS YNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEIKQL QQFQKEDAALTIYEMLQNFIAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYH QINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSHLKRYYYGRILHYLKAKEY SHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN
антиCD40_LC-- HL2-- IFN $\beta$ _C17S (SEQ ID NO 37)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPN LLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANI FPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLTKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECAEAAAKEAAKAAE AAAKEAAAKAMSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLK DRMNFDIPEIKQLQFQKEDAALTIYEMLQNFIAIFRQDSSSTGW NETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSHLKR YYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN
антиCD40_hIgG 2_dK_HC-- (G4S)2--IFN $\alpha$ 2a (SEQ ID NO 38)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ GLEWMGWINPDSGGTNYAQKQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKT VERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHPDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGGSGGGGSCDLPQTHSLGSRRTLMMLLAQMRKISLFLCK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWD ETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILAVRKY FQRITLYLKEKYSKAWVEVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
антиCD40_hIgG 2_dK_HC-- (G4S)3--IFN $\alpha$ 2a (SEQ ID NO 39)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ GLEWMGWINPDSGGTNYAQKQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKT VERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHPDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS

	LSPGGGGSGGGSGGGSCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKIS LFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDS SAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSIL AVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRS KE
антиCD40_hIgG 2_dK_HC-- (G4S)4--IFN $\alpha$ 2a (SEQ ID NO 40)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWRQAPGQ GLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGGQTLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKT VERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGSGGGSGGGSGGGSCDLPQTHSLGSRRTLMLLA QMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFN LSTKDSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLM KEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKE
антиCD40_LC-- (G4S)2--IFN $\alpha$ 2a (SEQ ID NO 41)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPN LLIYTAATLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANI FPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSCDLPQ THSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKA ETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLE ACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWE VVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
антиCD40_LC-- (G4S)3--IFN $\alpha$ 2a (SEQ ID NO 42)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPN LLIYTAATLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANI FPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGG SCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGN QFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSAAWDETLDDKIFYTELYQQ LNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSP CAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
антиCD40_LC-- (G4S)4--IFN $\alpha$ 2a (SEQ ID NO 43)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPN LLIYTAATLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANI FPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGG SGGGSCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSAAWDETLDDKIFY TELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLK EKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

IFNβ--(G4S)3-- антиCD40_LC (SEQ ID NO 44)	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIK QLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNENLLANV YHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYGRILHYLKAK EYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRN <b>GGGGSGGGSGGGG</b> SDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQA NIFPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
антиCD40_LC-- (G4S)4--IFNβ (SEQ ID NO 45)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPN LLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANI FPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC <b>GGGGSGGGSGGGG</b> <b>SGGGGMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMN</b> FDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNENIV ENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYGRIL LHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRN
IFNβ--(G4S)3-- антиCD40_HC_I gG1_NNAS_dK (SEQ ID NO 46)	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIK QLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNENIVENLLANV YHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYGRILHYLKAK EYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRN <b>GGGGSGGGSGGGG</b> <b>SQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG</b> QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRL RSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNNASRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYT QKLSLSLSPG
антиCD40_HC_I gG1_NNAS_dK- (G4S)4--IFNβ (SEQ ID NO 47)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ GLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSASTK PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNNASRVV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGMSYNLLGFLQRSSNFQ CQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYE MLQNIFAIFRQDSSSTGWNENIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLE KEDFTRGKLMSSLHLKRYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILR NFYFINRLTGYLRN



антиCD40_hIgG 2 dK_HC--HL-- IFN $\alpha$ 2A (SEQ ID NO 81)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHVWRQAPGQ GLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGGGLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKT VERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGAEAAAKEAAAKACDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCL KDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSAA WDETLDDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTVETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
антиCD40_LC- derivative--HL-- IFN $\alpha$ 2A (SEQ ID NO 82)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPN LLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANI FPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLKAD YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEEKSLSPGAEAAAKEA AAKACDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQ EFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSAAWDETLDDKFYTE LYQQLNDLEACVIQGVGVTVETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKE KKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
антиCD40_LC-- (G4S)4--IFN $\gamma$ (SEQ ID NO 83)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPN LLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANI FPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLKAD YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGG SGGGGSQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWK EESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFN SNKKRDFEKL TNYSVTDLNVQRKAIHELIVMAELSPA AKTGK RKRSQMLFRGRRASQ
антиCD40_hIgG 2 dK_HC-- (G4S)4--IFN $\gamma$ (SEQ ID NO 84)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHVWRQAPGQ GLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGGGLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKT VERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDPYVKEAENLKKYFNAG HSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDD QSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRDFEKL TNYSVTDLNVQRK AIHELIVMAELSPA AKTGKRKRKRSQMLFRGRRASQ

антиCD40_LC-- (G4S)4--IFNλ2 (SEQ ID NO 85)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTTITCRASQGIYSWLAWYQQKPKGKAPN LLIYTAATLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANI FPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLTKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC <b>GGGGSGGGSGGGG</b> <b>SGGGGS</b> VPVARLHGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDA LEESLLLKDCRCHSRLFPRTWDLRQLQVRERPMALAEALATLKV LEATADTDPALVDVLDQPLHLTHHILSQFRACIQPQPTAGPRTRGR LHHWLYRLQEAPKKEPGCLEASVTFNLFRLLTRDLNLCVASGDLC V
антиCD40_hIgG 2 dK_HC-- (G4S)4--IFNλ2 (SEQ ID NO 86)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWRQAPGQ GLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKT VERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSL LSP <b>GGGGSGGGSGGGSGGGGS</b> VPVARLHGALPDARGCHIA QFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLLKDCRCHSRLFPRTWDLRQL QVRERPMALAEALATLKVLEATADTDPALVDVLDQPLHLTHHIL SQFRACIQPQPTAGPRTRGRLLHHWLYRLQEAPKKEPGCLEASVT NLFRLLTRDLNLCVASGDLCV
антиCD40_LC-- (G4S)4--IFNω (SEQ ID NO 87)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTTITCRASQGIYSWLAWYQQKPKGKAPN LLIYTAATLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANI FPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLTKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC <b>GGGGSGGGSGGGG</b> <b>SGGGGS</b> LGCDLPQNHGLLSRNTLVLLHQMRRISPFLCLKDRRDFR FPQEMVKGSQLQKAHVMSVLHEMLQQIFSLFHTERSAAWNMTL LDQLHTGLHQQLQHLETCLLQVVGEGESAGAISSPALTRRYFQGI RVYLKEKKYSDCAWEVVRMEIMKSLFLSTNMQERLRSKDRDLGS S
антиCD40_hIgG 2 dK_HC-- (G4S)4--IFNε (SEQ ID NO 88)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWRQAPGQ GLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKT VERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSL LSP <b>GGGGSGGGSGGGSGGGGS</b> LDLKLIIFQQRQVNQESLKL LNKLQTLISIQCLPHRKNFLLPQKSLSPQYQKGHTLAILHEMLQQ IFSLFRANISLDGWEENHTEKFLIQLHQLEYLEALMGLEAEKLSG TLGSDNLRQLQVKMYFRRIHDYLENQDYSTCAWAIVQVEISRCLEF
	VFSLTEKLSKQGRPLNDMKQELTTEFRSPR

Таблица 8. Последовательности иллюстративного интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка и его компонентов на основе антитела против CD40 3G5. Последовательности, выделенные курсивом, соответствуют сигнальным пептидам. Последовательности, выделенные жирным шрифтом, не выделены курсивом, соответствуют линкерам. Мутированные аминокислоты подчеркнуты.

Название/SEQ ID номер	Последовательность
антиCD40_легкая цепь (SEQ ID NO 59)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTINSLQSEDFAVYYCQQ HNKWITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL TLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
антиCD40_легкая цепь с сигнальным пептидом 1 (SEQ ID NO 60)	MGWSCILFLVATATGVHSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS QSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTINSLQSEDFAVYYCQQHNKWITFGQGRLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
антиCD40_тяжелая цепь hIgG2 dK (SEQ ID NO 61)	QVQLVESGGGVVQPQKSLRRLSCAASGFTFSSNGIHVVRRQAPGK GLEWVAVIWSDGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVD KTVRKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPG
антиCD40_тяжелая цепь hIgG2 dK с сигнальным пептидом 1 (SEQ ID NO 62)	MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVESGGGVVQPQKSLRRLSCAAS GFTFSSNGIHVVRRQAPGKLEWVAVIWSDGSNKIFYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDY WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGT QTYTCNVDHKPSNTKVDKTVRKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP

	APIEKTISKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
Fab-область тяжелой цепи антитела против CD40 hlgG2 (SEQ ID NO 63)	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGK GLEWVAVIWSDGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTV ERKCCVE
Fab-область тяжелой цепи антитела против CD40 hlgG2 с сигнальным пептидом 1 (SEQ ID NO 64)	MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAAS GFTFSSNGIHWVRQAPGKGLEWVAVIWSDGSNKFYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDY WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGT QTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKCCVE
Fab-область тяжелой цепи антитела против CD40 hlgG2 --TEV--6His-фрагмент (SEQ ID NO 65)	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGK GLEWVAVIWSDGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTV ERKCCVEENLYFQSHHHHHH
антиCD40_hlgG2 dK_HC--RL--IFNβdM (SEQ ID NO 66)	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGK GLEWVAVIWSDGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTV ERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG <b>PAPAS</b> YNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLE YCLKDRMNFDIPEEIKLQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDS SSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLS SLHLKRY YGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGY LRN

<p>антиCD40_hIgG2 dK_HC--RL-- IFNβdM_C17S (SEQ ID NO 67)</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGK GLEWVAVIWSDGSNKFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVD KTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG<b>PAPAS</b>YNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLE YCLKDRMNFDIPEEIKLQFQKEDAALTIYEMLNIFAIFRQDS SSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLM SLHLKRYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFFINRLTGY LRN</p>
<p>антиCD40_hIgG2 dK_HC--HL-- IFNβdM (SEQ ID NO 68)</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGK GLEWVAVIWSDGSNKFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVD KTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG<b>AEEAAKEAAKAS</b>YNLLGFLQRSSNFQCQKL LWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKLQFQKEDAALTIYEMLN NIFAIFRQDSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKE DFTRGKLMSSLHLKRYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRN FFINRLTGYLRN</p>
<p>антиCD40_hIgG2 dK_HC--HL-- IFNβdM_C17S (SEQ ID NO 69)</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGK GLEWVAVIWSDGSNKFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVD KTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG<b>AEEAAKEAAKAS</b>YNLLGFLQRSSNFQSQKL LWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKLQFQKEDAALTIYEMLN NIFAIFRQDSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKE DFTRGKLMSSLHLKRYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRN FFINRLTGYLRN</p>

антиCD40_LC--HL2--IFN $\beta$ _C17S (SEQ ID NO 70)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTINSLQSEDFAVYYCQQ HNKWITFGQTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSSTL TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC <b>A</b> E <b>A</b> A <b>A</b> KE <b>A</b> <b>A</b> KA <b>A</b> E <b>A</b> AA <b>K</b> E <b>A</b> AA <b>K</b> AMSYNLLGFLQRSSNFQ <b>S</b> QKLLWQLNG RLEYCLKDRMNFDIPEEIKLQ <b>Q</b> FQKEDAALTIYEMLNIFAIFR QDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGK LMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRL TGYLRN
антиCD40_LC--(G4S)3--IFN $\beta$ _C17S (SEQ ID NO 71)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTINSLQSEDFAVYYCQQ HNKWITFGQTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSSTL TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC <b>GGGGSGG</b> <b>GGSGGGGS</b> MSYNLLGFLQRSSNFQ <b>S</b> QKLLWQLNGRLEYCLKD RMNFDIPEEIKLQ <b>Q</b> FQKEDAALTIYEMLNIFAIFRQDSSSTGW NETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLK RYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRN
антиCD40_hIgG2dK_HC--(G4S)2--IFN $\alpha$ 2a (SEQ ID NO 72)	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSNGIHVVRQAPGK GLEWVAVIWSDGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSVVVTPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVD KTVKCCVCCPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPVETC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQM RKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLF STKDSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPL MKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKEYSPCAWEVVRAEIMRSFSL TNLQESLRSKE
антиCD40_hIgG2dK_HC--(G4S)3--IFN $\alpha$ 2a (SEQ ID NO 73)	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSNGIHVVRQAPGK GLEWVAVIWSDGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSVVVTPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVD KTVKCCVCCPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPVETC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSCDLPQTHSLGSRRTL MLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMI QQIFNLFSTKDSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVG VTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKEYSPCAWEVVRAEIM RSFSLSTNLQESLRSKE

антиCD40_hIgG2 dK_HC--(G4S)4-- IFN $\alpha$ 2a  (SEQ ID NO 74)	QVQLVESGGGVVQP GKSLRSLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGK GLEWVAVIWSDGSNK FYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH TFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSNFQTQYTCNVDPKPSNTKVD KTV ERKCCVECP PCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVEVC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTT PPM LDS DGS FFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG SRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV LHEMIQQIFNLFS TKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACV IQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVV RAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
антиCD40_hIgG2 dK_HC--HL-- IFN $\alpha$ 2a  (SEQ ID NO 75)	QVQLVESGGGVVQP GKSLRSLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGK GLEWVAVIWSDGSNK FYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH TFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSNFQTQYTCNVDPKPSNTKVD KTV ERKCCVECP PCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVEVC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTT PPM LDS DGS FFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG A E A A A K E A A A K A C D L P Q T H S L G S R R T L M L L A QMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIF NLFS TKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACV IQGVGTET PLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFS LSTNLQESLRSKE

В предпочтительных вариантах осуществления интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем документе, представляют собой слитые с интерфероном антигенсвязывающие белки, содержащие полипептиды, полученные из полипептидов, которые указаны в табл. 9, конкретно, в табл. 9A или табл. 9B, более конкретно в табл. 9A ниже, и особенно из полипептидов SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 43 выше. В предпочтительных вариантах осуществления интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем документе, представляют собой слитые с интерфероном антигенсвязывающие белки, состоящие из полипептидов, полученных из полипептидов, указанных в табл. 9, конкретно, в табл. 9A или табл. 9B, более конкретно в табл. 9A ниже, и особенно из полипептидов SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 43 выше. В более предпочтительных вариантах осуществления слитое с интерфероном антитело содержит последовательности SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 3. В других более предпочтительных вариантах осуществления слитое с интерфероном антитело содержит последовательности SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 3. В других более предпочтительных вариантах осуществления слитое с интерфероном антитело содержит последовательности SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 3. В других более предпочтительных вариантах осуществления слитое с интерфероном антитело содержит последовательности SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 9. В других более предпочтительных вариантах осуществления слитое с интерфероном антитело содержит последовательности SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 9. В других более предпочтительных вариантах осуществления слитое с интерфероном антитело содержит последовательности SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 9.

Таблица 9. Комбинации полипептидов, обнаруженные в предпочтительных слитых с интерфероном антигенсвязывающих белках по изобретению на основе антитела против CD40 CP870,893, их средние значения EC<sub>50</sub> в отношении активации путей CD40 и IFN и их продуктивности (т.е., выход на литр культуры). Каждая комбинация последовательностей, как указано, содержится дважды в соответствующем IFA. CH: супернатант.

A

Слитое с интерфероном антитело (IFA)	Комбинация последовательностей	CD40 EC <sub>50</sub> (нг/мл)	IFN $\beta$ EC <sub>50</sub> (нг/мл)	IFN $\alpha$ EC <sub>50</sub> (нг/мл)	Продуктивность (мг/л)
IFA1	(SEQ ID NO 28) + (SEQ ID NO 9)	74,1	1,64		16,7
IFA2	(SEQ ID NO 29) + (SEQ ID NO 9)	111	0,14		17,8
IFA8	(SEQ ID NO 30) + (SEQ ID NO 3)	39,7	2,9		6,45
IFA9	(SEQ ID NO 31) + (SEQ ID NO 3)	42,6	0,7		3,4
IFA10	(SEQ ID NO 32) + (SEQ ID NO 3)	26,5	4,5		6,9
IFA11	(SEQ ID NO 33) + (SEQ ID NO 3)	42,8	1,78		5,1
IFA12	(SEQ ID NO 34) + (SEQ ID NO 9)	105	3,64		21,2
IFA13	(SEQ ID NO 35) + (SEQ ID NO 9)	192	0,7		11,5
IFA19	(SEQ ID NO 36) + (SEQ ID NO 9)	110	1,3		5,6



IFA20	(SEQ ID NO 37) + (SEQ ID NO 9)	182	2,34		4,2
IFA25	(SEQ ID NO 38) + (SEQ ID NO 3)	13,3		5,1	21
IFA26	(SEQ ID NO 39) + (SEQ ID NO 3)	15,35		4	8,6
IFA27	(SEQ ID NO 40) + (SEQ ID NO 3)	17		2,4	9,3
IFA28	(SEQ ID NO 41) + (SEQ ID NO 9)	12,8		4,5	75
IFA29	(SEQ ID NO 42) + (SEQ ID NO 9)	11,1		2	56,6
IFA30	(SEQ ID NO 43) + (SEQ ID NO 9)	11,3		1,6	46,6
IFA34	(SEQ ID NO 44) + (SEQ ID NO 49)	Активный (SN)	активный (SN)		Нет значительной продуктивности
IFA35	(SEQ ID NO 45) + (SEQ ID NO 49)	Активный (SN)	активный (SN)		Нет значительной продуктивности
IFA36	(SEQ ID NO 46) + (SEQ ID NO 3)	активный (SN)	активный (SN)		Нет значительной продуктивности
IFA37	(SEQ ID NO 47) + (SEQ ID NO 3)	Активный (SN)	активный (SN)		Нет значительной продуктивности

## B

Слитое с интерфероном антитело (IFA)	Комбинация последовательностей	CD40 EC <sub>50</sub> (нг/мл)	IFN $\alpha$ EC <sub>50</sub> (нг/мл)	IFN $\lambda$ EC <sub>50</sub> (нг/мл)	IFN $\gamma$ EC <sub>50</sub> (нг/мл)	IFN $\epsilon$ EC <sub>50</sub> (нг/мл)	IFN $\omega$ EC <sub>50</sub> (нг/мл)	Продуктивность (мг/л)
IFA38	(SEQ ID NO 81) + (SEQ ID NO 3)	22,7	3,77					1,32

IFA39	(SEQ ID NO 82) + (SEQ ID NO 9)	17,5	2,95					1,25
IFA42	(SEQ ID NO 83) + (SEQ ID NO 9)	65,6			15,4			0,72
IFA43	(SEQ ID NO 84) + (SEQ ID NO 3)	50,8			<0,001			0,55
IFA44	(SEQ ID NO 85) + (SEQ ID NO 9)	41,4		0,153				0,91
IFA45	(SEQ ID NO 86) + (SEQ ID NO 3)	25,8		<0,001				1,09
IFA46	(SEQ ID NO 87) + (SEQ ID NO 9)	86,3					0,493	0,89
IFA49	(SEQ ID NO 88) + (SEQ ID NO 3)	65,8				78,2		0,61
IFA50	(SEQ ID NO 41) + (SEQ ID NO 50)	128	1,36					0,57
IFA51	(SEQ ID NO 42) + (SEQ ID NO 50)	123	1,43					0,48

В других предпочтительных вариантах осуществления интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем документе, представляют собой слитые с интерфероном антигенсвязывающие белки, содержащие полипептиды, полученные из полипептидов, указанных в табл. 10 ниже. В предпочтительных вариантах осуществления интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем документе, представляют собой слитые с интерфероном антигенсвязывающие белки, состоящие из полипептидов, полученных из полипептидов, указанных в табл. 10 ниже.

Таблица 10. Комбинации полипептидов, обнаруженные в предпочтительных слитых с интерфероном антигенсвязывающих белках изобретения на основе антитела против CD40 3G5, их средние значения EC50 в отношении активации CD40- и IFN-путей. Каждая комбинация последовательностей, как указано, содержится дважды в соответствующем IFA. СН: супернатант.

Слитое с интерфероном антитело (IFA)	Комбинация последовательностей	CD40 EC50 (нг/мл)	IFN $\beta$ EC50 (нг/мл)	IFN $\alpha$ EC50 (нг/мл)	продуктивность мг/л
IFA106	(seq ID NO 66)+ (seq ID NO 59)	190,5	10,30		0,36
IFA107	(seq ID NO 67)+ (seq ID NO 59)	141,5	2,03		0,28
IFA108	(seq ID NO 68)+ (seq ID NO 59)	37,3	1,27		0,59
IFA109	(seq ID NO: 69)+ (seq ID NO: 59)	30	0,45		0,4
IFA114	(seq ID NO 70) + (seq ID NO 61)	активный (SN)	активный (SN)		нет значительной продуктивности
IFA115	(seq ID NO 71) + (seq ID NO 61)	активный (SN)	активный (SN)		нет значительной продуктивности
IFA121	(seq ID NO 72) + (seq ID NO 59)	14,2		0,12	22,6
IFA122	(seq ID NO 73) + (seq ID NO 59)	11,74		0,07	16,8
IFA123	(seq ID NO 74) + (seq ID NO 59)	12,85		0,05	17,2
IFA124	(seq ID NO 75) + (seq ID NO 59)	12,14		0,04	21,6



меньшей мере на 99% идентичную нуклеиновой кислоте, кодирующей любую из этих последовательностей. В еще более конкретных вариантах осуществления указанная нуклеиновая кислота по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична нуклеиновой кислоте, кодирующей SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. В других более конкретных вариантах осуществления легкая цепь агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит последовательность SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную нуклеиновой кислоте, кодирующей любую из этих последовательностей. В еще более конкретных вариантах осуществления указанная нуклеиновая кислота по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична нуклеиновой кислоте, кодирующей SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе, могут содержать последовательность, кодирующую последовательность для увеличения выхода (например, фрагмент растворимости) или для облегчения очистки экспрессированных белков (т.е., фрагмент очистки). Фрагменты очистки известны специалистам в данной области и могут быть выбраны из фрагментов глутатион-S-трансферазы (GST), фрагментов белка, связывающего мальтозу (MBP), фрагментов связывающего кальмодулин пептида (CBP), интеин-хитинсвязывающего домена (интеин-CBD), фрагментов на основе стрептавидина/биотина (такие как фрагменты сигнального пептида биотинилирования (BSCP), фрагментов стрептавидин-связывающего пептида (SBP), фрагментов His-patch ThioFusion, фрагментов тандемной аффинной очистки (TAP), фрагментов малого убиквитин-подобного модификатора (SUMO), фрагментов HaloTag® (Promega), системы Profinity eXact™ (Bio-Rad). В некоторых вариантах осуществления фрагмент очистки может представлять собой полигистидиновый фрагмент (например, фрагмент His6-, His7-, His8-, His9- или His10). В других вариантах осуществления фрагмент очистки может представлять собой стрептококковый фрагмент (например, Strep-tag® или Strep-tag II®; IBA Life Sciences). В других вариантах осуществления фрагмент очистки может представлять собой фрагмент белка, связывающего мальтозу (MBP).

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать последовательность, кодирующую сайт расщепления для удаления фрагмента очистки. Такие последовательности расщепления известны специалисту в данной области и могут быть выбраны из последовательностей, распознаваемых и расщепляемых эндопротеазой или экзопроteaseй. В некоторых вариантах осуществления эндопротеаза для удаления фрагмента очистки может быть выбрана из: энтеропептидазы, тромбина, фактора Ха, протеазы TEV или протеазы риновируса 3С. В некоторых вариантах осуществления экзопроteaseа для удаления фрагмента очистки может быть выбрана из: карбоксипептидазы А, карбоксипептидазы В или DAP-азы. В предпочтительных вариантах осуществления протеаза для удаления фрагмента очистки представляет собой протеазу TEV. В более конкретном предпочтительном варианте осуществления нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую фрагмент His6 и сайт расщепления TEV. В еще более конкретном предпочтительном варианте осуществления указанная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 27.

Молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению могут также содержать последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Квалифицированному специалисту известны различные сигнальные пептиды, доступные для направления экспрессированного белка в желаемое место укладки, сборки и/или созревания, а также для обеспечения секреции конечного белка в среду для облегчения последующего процессинга. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой секреторный сигнальный пептид. Кодированный сигнальный пептид может содержать последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления сигнальный пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 2.

Сигнальный пептид 1 (SEQ ID NO: 1) использовали для синтеза полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 75. Такой сигнальный пептид, который первоначально присутствует на N-конце соответствующей последовательности полипептида, расщепляется во время синтеза.

Сигнальный пептид 2 (SEQ ID NO: 2) использовали для синтеза полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43. Такой сигнальный пептид, который первоначально присутствует на N-конце соответствующей последовательности полипептида, расщепляется во время синтеза.

Для синтеза полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87 и SEQ ID NO: 88, использовали сигналь-

ный пептид MGWSCILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 1). Такой сигнальный пептид, который первоначально присутствует на N-конце соответствующей последовательности полипептида, расщепляется во время синтеза.

Полинуклеотиды, кодирующие IFN или его функциональный фрагмент, слитый с агонистическим антителом против CD40 или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом, как раскрыто в настоящем документе, обычно встраивают в экспрессирующий вектор для введения в клетки-хозяева, которые можно использовать для получения желаемого количества заявленных интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белков. Соответственно, в некоторых аспектах изобретение относится к экспрессирующим векторам, содержащим раскрытые в настоящем описании полинуклеотиды, и к клеткам-хозяевам, содержащим эти векторы и полинуклеотиды.

Термин "вектор" или "экспрессирующий вектор" используется в настоящем документе для целей описания и формулы изобретения 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, такие векторы можно легко выбрать из группы, состоящей из плазмид, фагов, вирусов и ретровирусов. Как правило, векторы, совместимые с настоящим изобретением, будут содержать маркер селекции, соответствующие сайты рестрикции для облегчения клонирования желаемого гена и способность внедряться и/или реплицироваться в эукариотических или прокариотических клетках.

Для целей настоящего изобретения можно использовать многочисленные системы экспрессирующих векторов. Например, один класс векторов использует элементы ДНК, полученные из вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус осповакцины, бакуловирус, ретровирусы (RSV, MMTV или MOMLV) или вирус SV40. Другие предполагают использование полицистронных систем с внутренними сайтами связывания рибосом. Кроме того, клетки, которые интегрировали ДНК в свои хромосомы, могут быть отобраны путем введения одного или более маркеров, которые позволяют проводить отбор трансфицированных клеток-хозяев. Маркер может обеспечивать прототрофию к ауксотрофному хозяину, устойчивость к биоцидам (например, антибиотики) или устойчивость к тяжелым металлам, таким как медь. Селектируемый маркерный ген может быть либо непосредственно связан с экспрессируемой последовательностью ДНК, либо может быть введен в ту же клетку путем котрансформации. 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 некоторых вариантах осуществления клонированные гены вариабельной области, один из которых слит с геном, кодирующим IFN или его функциональный фрагмент, встраивают в экспрессирующий вектор вместе с генами константных областей тяжелой и легкой цепей (такими как гены человека), синтезированными, как описано выше.

В других вариантах осуществления векторная система по изобретению может содержать более одного вектора. В некоторых вариантах осуществления векторная система может содержать первый вектор для экспрессии IFN или его функционального фрагмента, слитого с легкой цепью агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, и второй вектор для экспрессии тяжелой цепи агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. Альтернативно, такая векторная система может содержать первый вектор для экспрессии IFN или его функционального фрагмента, слитого с тяжелой цепью агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, и второй вектор для экспрессии легкой цепи агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента.

В других вариантах осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, как описано в настоящем документе, может быть экспрессирован с использованием полицистронных конструкций. В таких системах экспрессии представляющие интерес несколько генных продуктов, таких как продукты, кодирующие IFN или его функциональный фрагмент, который слит с тяжелой цепью агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента и кодирующие легкую цепь указанного антитела, или кодирующие IFN или его функциональный фрагмент, слитые с легкой цепью агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, и кодирующие тяжелую цепь указанного антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, могут быть получены из одной полицистронной конструкции. Эти системы преимущественно используют внутренний сайт посадки рибосомы (IRES) для обеспечения относительно высокого уровня полипептидов в эукариотических клетках-хозяевах. Совместимые последовательности IRES раскрыты в патенте США № 6193980, который включен в настоящее описание в качестве ссылки. Специалистам в данной области будет понятно, что такие системы экспрессии могут быть использованы для эффективного получения всего спектра полипептидов, раскрытых в настоящей заявке.

В более общем смысле, после получения вектора или последовательности ДНК, кодирующей интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению, экспрессирующий вектор может быть введен в соответствующую клетку-хозяин. То есть клетка-хозяин может быть трансформирована. Введение плазмиды в клетку-хозяин может быть осуществлено различными методами, хорошо известными специалистам в данной области. Они включают, но не ограничиваются ими, транс-

фекцию (включая электрофорез и электропорацию), слияние протопластов, преципитацию фосфатом кальция, слияние клеток с оболочечной ДНК, микроинъекцию и заражение интактным вирусом. См., например, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24. 2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, MA 1988). Трансформированные клетки выращивают в условиях, подходящих для продукции легких цепей и тяжелых цепей, и анализируют на синтез белка тяжелой и/или легкой цепи. Примеры методов анализа включают твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (РИА) или анализ с помощью анализа с использованием сортера клеток с активированной флуоресценцией (FACS), иммуногистохимию и т.п.

Используемый в настоящем описании термин "трансформация" следует использовать в широком смысле для обозначения введения ДНК в реципиентную клетку-хозяина, которое изменяет генотип и, следовательно, приводит к изменению в реципиентной клетке.

В том же духе "клетки-хозяева" относятся к клеткам, которые были трансформированы векторами, сконструированными с использованием методов рекомбинантной ДНК и кодирующими по меньшей мере один гетерологичный ген. В описаниях способов выделения полипептидов из рекомбинантных хозяев термины "клетка" и "культура клеток" используются взаимозаменяемо для обозначения источника интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка, если не указано иное. Другими словами, выделение полипептида из "клеток" может означать либо центрифугирование цельных клеток, либо культуру клеток, содержащую как среду, так и суспендированные клетки.

В одном варианте осуществления линия клеток-хозяев, используемая для экспрессии интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка, имеет эукариотическое или прокариотическое происхождение. Используемый в настоящем описании термин "экспрессия" может включать транскрипцию и трансляцию более чем одной полипептидной цепи (такой как тяжелая и легкая цепи фрагмента антитела интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка), которые связываются с образованием конечного интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка. В одном варианте осуществления линия клеток-хозяев, используемая для экспрессии интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка, имеет бактериальное происхождение. В одном варианте осуществления линию клетки-хозяина используют для экспрессии интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка млекопитающего; специалисты в данной области могут определить конкретные линии клеток-хозяев, которые лучше всего подходят для экспрессии желаемого генного продукта. Типичные линии клеток-хозяев включают, но не ограничиваются ими, CHO K1 с нокаутом GS от Horizon, DG44 и DUXB11 (линии яичника китайского хомячка, DHFR минус), HELA (карцинома шейки матки человека), CV1 (линия почек обезьяны), COS (производная CV1 с T-антигеном SV40), R1610 (фибробласты китайского хомячка), BALBC/3T3 (фибробласты мыши), НАК (линия почек хомячков), SP2/O (миелома мышей), BFA-1c1BPT (эндотелиальные клетки быка), RAJ1 (лимфоциты человека), HEK 293 (клетки почки человека). В предпочтительном варианте осуществления могут быть использованы клетки HEK FS S11/254. В другом предпочтительном варианте можно использовать CHO K1 GS от Horizon. В одном варианте осуществления клеточная линия обеспечивает измененное гликозилирование, например, афукозилирование антитела, экспрессируемого из нее (например, PER. C6® (Stucell) или клеточные линии CHO с нокаутом FUT8 (клетки POTEILLIGENTTM) (Biowa, Принстон, Нью-Джерси)). В одном варианте осуществления можно использовать клетки NS0. Линии клеток-хозяев обычно доступны в коммерческих службах, Американской коллекции культур тканей или в опубликованной литературе.

В одном варианте осуществления хозяин, используемый для экспрессии интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка, представляет собой трансгенное животное, отличное от человека, или трансгенное растение.

Интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению также могут быть получены трансгенным путем создания животного, отличного от человека (например, млекопитающего) или растения, которое является трансгенным в отношении представляющих интерес последовательностей и путем получения из него интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка в восстанавливаемой форме. В связи с трансгенной продукцией у млекопитающих интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки могут быть получены и выделены из молока коз, коров или других млекопитающих. См., например, Патенты США №№ 5827690, 5756687, 5750172 и 5741957. Примерами растений-хозяев являются *Nicotiana*, *Arabidopsis*, ряска, кукуруза, пшеница, картофель и т.д. Способы экспрессии антител в растениях, включая описание промоторов и векторов, а также трансформацию растений, известны специалистам. См., например, патент США 6517529, включенный сюда в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления трансгенные животные, отличные от человека, или трансгенные растения получают путем введения одной или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок по изобретению, в животное или растение стандартными трансгенными методами. См. Хоган и патент США 6417429. Трансгенные клетки, используемые для получения трансгенного животного, могут представлять собой эмбриональные стволовые клетки или соматические клетки. Трансгенные организмы, отличные от человека, могут быть химерными, нехимерными гетерозиготами и нехимерными гомозиготами. См., например, Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual 2nd ed.*, Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson et

al., *Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach*, Oxford University Press (2000); и Pinkert, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press (1999). В некоторых вариантах осуществления трансгенные животные, отличные от человека, имеют целевое нарушение и замену нацеливающей конструкцией, которая кодирует интересующую(ие) последовательность(и). Интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки могут быть получены у любого трансгенного животного. В предпочтительном варианте осуществления отличными от человека животными являются мыши, крысы, овцы, свиньи, козы, крупный рогатый скот или лошади. Трансгенное животное, отличное от человека, экспрессирует указанные интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки в крови, молоке, моче, слюне, слезах, слизи и других жидкостях организма.

Производство *in vitro* позволяет увеличивать масштабы производства для получения больших количеств желаемых интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белков. Методы культивирования клеток млекопитающих в условиях культивирования тканей известны в данной области техники и включают гомогенную суспензионную культуру, например, в эрлифтном реакторе или в реакторе непрерывного действия с мешалкой, или в иммобилизованной или механически захваченной клеточной культуре, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на агарозных микросферах или в керамических картриджах. При необходимости и/или желании раствор интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка можно очистить обычными методами хроматографии, например, гель-фильтрацией, ионообменной хроматографией, хроматографией на DEAE-целлюлозе и/или иммуно-аффинной хроматографией.

Один или более генов, кодирующих интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, также могут быть экспрессированы в клетках, не относящихся к млекопитающим, таких как бактерии, дрожжи или клетки растений. В этом отношении следует понимать, что различные одноклеточные немлекопитающие микроорганизмы, такие как бактерии, также могут быть трансформированы; т.е. те, которые можно выращивать в культурах или ферментировать. Бактерии, которые подвержены трансформации, включают представителей семейства энтеробактерий, таких как штаммы *Escherichia coli* или *Salmonella*; *Bacillaceae*, такие как *Bacillus subtilis*; пневмококк; Стрептококки и гемофильная палочка. Кроме того, следует понимать, что при экспрессии в бактериях интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки согласно изобретению или их компоненты (т.е. агонистические антитела против CD40 или их агонистические антигенсвязывающие фрагменты и IFN или функциональные фрагменты IFN) могут стать частью телец включения. Желаемые интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки затем могут нуждаться в выделении, необязательно также рефолдинге и очистке.

В дополнение к прокариотам также могут быть использованы эукариотические микробы. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, являются наиболее часто используемыми среди эукариотических микроорганизмов, хотя обычно доступен ряд других штаммов. Например, для экспрессии в *Saccharomyces* обычно используется плаزمида 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 является маркером селекции для мутантного штамма дрожжей, лишенного способности расти в триптофане, например, ATCC No. 44076 или PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). Наличие повреждения *trp1* как характеристики генома дрожжевой клетки-хозяина затем обеспечивает эффективную среду для детектирования трансформации путем роста в отсутствие триптофана.

#### **Терапевтические векторы**

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, может быть встроена в вектор и использована в качестве терапевтического вектора, например, вектора, который экспрессирует интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок по изобретению. Конструирование подходящих функциональных конструкций экспрессии и векторов терапевтической экспрессии известно специалистам в данной области. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок можно вводить пациенту посредством генетической доставки с последовательностями РНК или ДНК, вектором или векторной системой, кодирующей интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок.

Терапевтические векторы могут быть доставлены пациенту, например, внутривенной инъекцией, местным введением (см. Пат. США № 5328470) или стереотаксической инъекцией (см., например, Chen et al., *PNAS* 91:3054-3057 (1994)). Фармацевтический препарат терапевтического вектора может включать вектор в приемлемом разбавителе.

Нуклеиновая кислота, кодирующая интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, или нуклеиновые кислоты могут быть включены в генную конструкцию для использования в качестве части терапевтического протокола для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок. Предложены экспрессирующие векторы для трансфекции *in vivo* и экспрессии интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка.

Экспрессирующие конструкции таких компонентов можно вводить в любом биологически эффективном носителе, например, в любом составе или композиции, способных эффективно доставлять компонентную последовательность нуклеиновой кислоты в клетки *in vivo*, как известно специалисту в данной области. Подходы включают, но не ограничиваются этим, вставку последовательности(ей) рассматриваемой нуклеиновой кислоты в вирусные векторы, включая, но не ограничиваясь этим, рекомбинант-

ные ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы и вирус простого герпеса-1, рекомбинантные бактериальные или эукариотические плазмиды и тому подобное.

Ретровирусные векторы и аденоассоциированные вирусные векторы можно использовать в качестве рекомбинантной системы доставки для переноса последовательностей экзогенных нуклеиновых кислот *in vivo*, в частности, человеку. Такие векторы обеспечивают эффективную доставку генов в клетки, а переносимые нуклеиновые кислоты могут стабильно интегрироваться в хромосомную ДНК хозяина.

Разработка специализированных клеточных линий (называемых "упаковывающими клетками"), которые продуцируют только дефектные по репликации ретровирусы, повысила полезность ретровирусов для генной терапии, а дефектные ретровирусы охарактеризованы для использования при переносе генов в целях генной терапии (для обзора см. например, Miller, *Blood* 76:271-78 (1990)). Репликативно-дефектный ретровирус может быть упакован в вирионы, которые можно использовать для заражения клетки-мишени с помощью вспомогательного вируса стандартными методами. Протоколы получения рекомбинантных ретровирусов и инфицирования клеток *in vitro* или *in vivo* такими вирусами можно найти в *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, et al., (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9. 10-9. 14 и в других стандартных лабораторных руководствах. Неограничивающие примеры подходящих ретровирусов включают pLJ, pZIP, pWE и pEM, которые известны специалистам в данной области. Примеры подходящих упаковочных вирусных линий включают \*Crip, \*Cre, \*2 и \*Am. (См., например, Eglitis, et al., *Science* 230:1395-1398 (1985); Danos and Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6460-6464 (1988); Wilson, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018 (1988); Armentano, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145 (1990); Huber, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043 (1991); Ferry, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381 (1991); Chowdhury, et al., *Science* 254:1802-1805 (1991); van Beusechem, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-7644 (1992); Kay, et al., *Human Gene Therapy* 3:641-647 (1992); Dai, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895 (1992); Hwu, et al., *J. Immunol.* 150:4104-4115 (1993); патент США № 4868116; патент США № 4980286; заявка PCT WO 89/07136; заявка PCT WO 89/02468; заявка PCT WO 89/05345 и заявка PCT WO 92/07573).

В другом варианте осуществления предложены векторы доставки, полученные из аденовируса. Геном аденовируса можно манипулировать таким образом, чтобы он кодировал и экспрессировал интересующий генный продукт, но был инактивирован с точки зрения его способности к репликации в нормальном жизненном цикле литического вируса. См., например, Berkner, et al., *BioTechniques* 6:616 (1988); Rosenfeld, et al., *Science* 252:431-434 (1991); и Rosenfeld, et al., *Cell* 68:143-155 (1992). Подходящие аденовирусные векторы, полученные из штамма аденовируса Ad типа 5 d1324 или других штаммов аденовируса (например, Ad2, Ad3, Ad7 и т.д.) известны специалистам в данной области техники. Рекомбинантные аденовирусы могут иметь преимущества в определенных обстоятельствах, поскольку они не способны инфицировать неделящиеся клетки и могут быть использованы для инфицирования широкого спектра типов клеток, включая эпителиальные клетки (Rosenfeld, et al. (1992), см. выше). Кроме того, вирусная частица относительно стабильна и поддается очистке и концентрированию и, как указано выше, может быть модифицирована таким образом, чтобы влиять на спектр инфекционности. Кроме того, введенная аденовирусная ДНК (и содержащаяся в ней чужеродная ДНК) не интегрируется в геном клетки-хозяина, а остается эпизомной, что позволяет избежать потенциальных проблем, которые могут возникнуть в результате инсерционного мутагенеза *in situ*, когда введенная ДНК интегрируется в геном хозяина (например, ретровирусная ДНК). Более того, пропускная способность аденовирусного генома для чужеродной ДНК велика (до 8 тыс. пар оснований) по сравнению с другими векторами доставки (Berkner et al. (1998), выше; Haj-Ahmand and Graham, *J. Virol.* 57:267 (1986)).

Еще одной вирусной векторной системой, пригодной для доставки последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, является аденоассоциированный вирус (AAV). AAV представляет собой природный дефектный вирус, которому требуется другой вирус, такой как аденовирус или вирус герпеса, в качестве вспомогательного вируса для эффективной репликации и продуктивного жизненного цикла. (Для обзора см. Muzyczka, et al., *Curr. Topics in Micro. and Immunol.* 158:97-129 (1992)). Это также один из немногих вирусов, которые могут интегрировать свою ДНК в неделящиеся клетки и демонстрируют высокую частоту стабильной интеграции (см., например, Flotte et al., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 7:349-356 (1992); Samulski, et al., *J. Virol.* 63:3822-3828 (1989); and McLaughlin, et al., *J. Virol.* 62:1963-1973 (1989)). Векторы, содержащие всего 300 пар оснований AAV, могут быть упакованы и могут интегрироваться. Место для экзогенной ДНК ограничено примерно 4, 5 т.п.о. Вектор AAV, такой как описанный Tratschin, et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5:3251-3260 (1985) можно использовать для введения ДНК в клетки. Различные нуклеиновые кислоты были введены в различные типы клеток с использованием векторов AAV (см., например, Hermonat, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470 (1984); Tratschin, et al., *Mol. Cell. Biol.*, 4:2072-2081 (1985); Wondisford, et al., *Mol. Endocrinol.* 2:32-39 (1988); Tratschin, et al., *J. Virol.* 51:611-619 (1984); и Flotte, et al., *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790 (1993)).

В дополнение к методам вирусного переноса можно также использовать невирусные методы, чтобы вызвать экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, в ткани пациента. Большинство невирусных методов пе-



рениса генов основаны на обычных механизмах, используемых клетками млекопитающих для поглощения и внутриклеточного транспорта макромолекул. В некоторых вариантах осуществления невирусные системы доставки основаны на эндоцитарных путях поглощения рассматриваемого гена клеткой-мишенью. Примеры систем доставки этого типа включают липосомные системы, конъюгаты полилизина и искусственные вирусные оболочки. Другие варианты осуществления включают системы для инъекций плазмид, такие как описаны Meuli, et al., *J. Invest. Dermatol.* 116 (1):131-135 (2001); Cohen, et al., *Gene Ther* 7 (22):1896-905 (2000); или Tam, et al., *Gene Ther.* 7 (21): 1867-74 (2000).

В клинических условиях системы доставки могут быть введены пациенту любым из ряда способов, каждый из которых известен в данной области. Например, фармацевтический препарат системы доставки может вводиться системно, например, с помощью внутривенной инъекции. Специфическая трансдукция белка в клетках-мишенях происходит преимущественно за счет специфичности трансфекции, обеспечиваемой носителем доставки, экспрессией клеточного или тканевого типа благодаря регуляторным последовательностям транскрипции, контролирующим экспрессию гена рецептора, или их комбинации. В других вариантах осуществления первоначальная доставка рекомбинантного гена более ограничена, при этом введении животному является достаточно локализованным. Например, носитель доставки может быть введено катетером (см. патент США № 5328470) или стереотаксической инъекцией (например, Chen, et al., *PNAS* 91: 3054-3057 (1994)).

Фармацевтический препарат терапевтической конструкции может состоять по существу из системы доставки в приемлемом разбавителе или может содержать матрицу с медленным высвобождением, в которую встроен носитель доставки. Альтернативно, когда полная система доставки может быть получена интактной из рекомбинантных клеток, например, в виде ретровирусных векторов, фармацевтический препарат может содержать одну или более клеток, которые продуцируют систему доставки.

#### Способы лечения

В одном аспекте изобретение относится к способам лечения пациента (например, пациента, инфицированного HBV), включающие введение эффективного количества интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка или последовательности нуклеиновой кислоты (например, мРНК), которая кодирует интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, как раскрыто в настоящем документе. Изобретение также относится к применению интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка или последовательности нуклеиновой кислоты (например, мРНК), которая кодирует интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, как раскрыто в настоящем документе, при приготовлении лекарственного средства для лечения HBV. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к наборам и способам для лечения расстройств и/или симптомов, например, связанных с HBV расстройств и/или симптомов, связанных с HBV, у млекопитающего, нуждающегося в таком лечении. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления пациентом является человек.

Интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки или последовательности нуклеиновых кислот, которые их кодируют, по настоящему изобретению можно использовать в ряде различных применений. Например, в одном варианте осуществления рассматриваемые интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки или последовательности нуклеиновых кислот, которые их кодируют, применимы для снижения высвобождения HBeAg из HBV-инфицированной клетки. В некоторых вариантах осуществления интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки по изобретению снижают высвобождение HBeAg первичными гепатоцитами *in vitro* по меньшей мере на 10% при 1 нг/мл, по меньшей мере на 20% при 1 нг/мл, по меньшей мере на 30% при 1 нг /мл, по меньшей мере на 40% при 1 нг/мл, по меньшей мере на 50% при 1 нг/мл, по меньшей мере на 60% при 1 нг/мл, по меньшей мере на 70% при 1 нг/мл, по меньшей мере на 80% при 1 нг /мл, или по меньшей мере на 85% при 1 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки по изобретению снижают высвобождение HBeAg первичными гепатоцитами *in vitro* по меньшей мере на 12% при 1 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки по изобретению снижают высвобождение HBeAg первичными гепатоцитами *in vitro* до 90% при 1 нг/мл. В родственных вариантах осуществления интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок снижает высвобождение HBeAg при EC50 менее 30 нг/мл, предпочтительно при EC50 менее 10 нг/мл, более предпочтительно при EC50 менее 1 нг/мл.

В другом варианте осуществления рассматриваемые интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки или последовательности нуклеиновых кислот, которые их кодируют, применимы для снижения транскрипции пгРНК кзкДНК в HBV-инфицированной клетке.

В другом варианте осуществления рассматриваемые интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки или последовательности нуклеиновых кислот, которые их кодируют, применимы для снижения одного или более симптомов и/или осложнений, ассоциированных с инфекцией HBV, как описано в настоящем документе (ниже).

В некоторых вариантах осуществления рассматриваемые интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки или последовательности нуклеиновых кислот, которые их кодируют, применимы для снижения одного или более расстройств, симптомов и/или осложнений, ассоциированных с хронической инфекцией HBV, например, хронического воспаления печени (хронический гепатит), приводящего

к циррозу в течение нескольких лет; гепатоцеллюлярной карциномы (НСС); развития мембранозного гломерулонефрита (MGN); риска смерти; острого некротизирующего васкулита (узелковый полиартериит), мембранозного гломерулонефрита и папулезного акродерматита детского возраста (синдром Джанотти-Крости); HBV-ассоциированной нефропатии (например, мембранозный гломерулонефрит); иммуноопосредованных гематологических расстройств (например, эссенциальная смешанная криоглобулинемия, апластическая анемия); и тому подобное.

В некоторых вариантах осуществления рассматриваемые интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки или последовательности нуклеиновых кислот, которые их кодируют, применимы для снижения одного или более симптомов и/или осложнений, ассоциированных с острой инфекцией HBV, например, острый вирусный гепатит (который начинается с общего плохого самочувствия, потери аппетита, тошноты, рвоты, болей в теле, легкой лихорадки и потемнения мочи, а затем прогрессирует до развития желтухи, фульминантной печеночной недостаточности и/или сывороточно-подобного синдрома); потери аппетита; суставных и мышечных болей; субфебрильной лихорадки; боли в животе; тошноты; рвоты; желтухи; вздутия живота; и тому подобное.

Соответственно, настоящее изобретение также относится к способу лечения одного или более расстройств, симптомов и/или осложнений, ассоциированных с инфекцией HBV, у человека или другого животного путем введения такому человеку или животному эффективного, нетоксичного количества интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка или последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует его. Специалист в данной области сможет с помощью стандартных экспериментов определить, какое эффективное, нетоксичное количество интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка или последовательности нуклеиновой кислоты, которая его кодирует, будет использоваться для лечения инфекции HBV.

Например, "терапевтически активное количество" интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению может варьироваться в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания (например, острая по сравнению с хронической), возраст, пол, медицинские осложнения (например, коинфекция ВИЧ, состояния или заболевания с подавленным иммунитетом) и масса пациента, а также способность интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка вызывать желаемый ответ у пациента. Режим дозирования может быть скорректирован для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Например, ежедневно можно вводить несколько разделенных доз, или доза может быть пропорционально уменьшена в зависимости от остроты терапевтической ситуации.

В общем, композиции, представленные в настоящем изобретении, могут быть использованы для профилактического лечения неинфицированных клеток или терапевтического лечения любых HBV-инфицированных клеток, содержащих антигенный маркер, который обеспечивает нацеливание на HBV-инфицированные клетки интерферон-ассоциированным антигенсвязывающим белком.

#### **Фармацевтические композиции и их введение**

В некоторых вариантах осуществления интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки по изобретению или последовательности нуклеиновых кислот (включая векторы или векторные системы), которые их кодируют, входят в состав фармацевтической композиции. Способы получения и введения пациенту интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белков или последовательностей нуклеиновых кислот, которые их кодируют, по настоящему изобретению хорошо известны или могут быть легко определены специалистами в данной области с использованием данного описания и знаний в данной области техники в качестве руководства. Способ введения интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белков или последовательностей нуклеиновых кислот, которые их кодируют, по настоящему изобретению может быть пероральным, парентеральным, ингаляционным или местным. Термин "парентеральный", используемый в настоящем описании, включает внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение. Хотя все эти формы введения явно рассматриваются как находящиеся в рамках настоящего изобретения, формой для введения будет раствор для инъекции, в частности, для внутривенной или внутриартериальной инъекции или капельного введения. Обычно подходящая фармацевтическая композиция для инъекции может содержать буферный агент (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное вещество (например, полисорбат), необязательно стабилизирующий агент (например, человеческий альбумин) и т.д. В некоторых вариантах осуществления буферный агент представляет собой ацетат. В другом варианте осуществления буферным агентом является формиат. Еще в одном варианте осуществления буферным агентом является цитрат. В родственных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество может быть выбрано из списка, включающего плуроники, ПЭГ, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, тритон, трометамин, лецитин, холестерин и тилоксапал. В предпочтительных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат. В более предпочтительных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80 или полисорбат 100, предпочтительно полисорбат 20 или полисорбат 80.

В некоторых вариантах осуществления интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки или последовательности нуклеиновых кислот, которые их кодируют, могут быть доставлены непосред-

венно в участок неблагоприятной клеточной популяции (например, в печень), тем самым увеличивая воздействие терапевтического агента на пораженную ткань.

Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевые и буферные среды. В композициях и способах по настоящему изобретению фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются ими, 0,01-0,1 М, например, 0,05 М фосфатный буфер или 0,8% солевой раствор. Другие распространенные растворы для парентерального введения включают растворы фосфата натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или нелетучие масла. Внутривенные носители включают наполнители жидкости и питательных веществ, наполнители электролитов, например, на основе декстрозы Рингера, и т.п. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, антимикробные вещества, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и т.п. В частности, фармацевтические композиции, пригодные для инъекций, включают стерильные водные растворы (где растворяются в воде) или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. В таких случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко набирать шприцем. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и обычно предохраняется от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ.

Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п. Во многих случаях в композицию будут включены изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъеклируемых композиций может быть достигнута включением в композицию агента, который задерживает абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

В любом случае стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного соединения, такого как интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению, отдельно или в комбинации с другими активными агентами в необходимом количестве в соответствующем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных здесь, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций иллюстративные способы приготовления включают сушку в вакууме и лиофилизацию с получением порошка активного ингредиента вместе с любым дополнительным желаемым ингредиентом из его раствора, предварительно стерильно отфильтрованного. Препараты для инъекций обрабатывают, расфасовывают по контейнерам, таким как ампулы, пакеты, банки, шприцы или флаконы, и запечатывают в асептических условиях в соответствии со способами, известными в данной области техники. Кроме того, препараты могут быть упакованы и продаваться в виде набора. Такие промышленные изделия обычно имеют этикетки или вкладыши в упаковки, указывающие на то, что соответствующие композиции пригодны для лечения пациента, страдающего инфекцией HBV.

Эффективные дозы композиций по настоящему изобретению для лечения описанных выше состояний, связанных с инфекцией HBV, варьируются в зависимости от многих различных факторов, включая способ введения, участок-мишень, физиологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, другие принимаемые лекарства и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациентом является человек, но также можно лечить млекопитающих, отличных от человека, включая трансгенных млекопитающих, в частности приматов, отличных от человека. Лечебные дозы можно титровать с использованием обычных методов, известных специалистам в данной области, для оптимизации безопасности и эффективности.

Для лечения интерферон-ассоциированным антигенсвязывающим белком дозировка может варьироваться, например, примерно от 0,0001 до примерно 100 мг/кг, чаще примерно от 0,01 до примерно 5 мг/кг (например, примерно 0,02 мг/кг, примерно 0,25 мг/кг, примерно 0,5 мг/кг, примерно 0,75 мг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 2 мг/кг и т.д.) от массы тела хозяина. Например, дозировки могут составлять примерно 1 мг/кг массы тела или примерно 10 мг/кг массы тела или в диапазоне от примерно 1 до примерно 10 мг/кг, например, по меньшей мере примерно 1 мг/кг. Дозы, промежуточные в вышеуказанных диапазонах, также входят в объем настоящего изобретения. Пациентам можно вводить такие дозы еже-

дневно, в альтернативные дни, еженедельно или в соответствии с любой другой схемой, определенной эмпирическим анализом. Типичное лечение влечет за собой введение нескольких доз в течение длительного периода времени, например по меньшей мере в течение шести месяцев. Дополнительные иллюстративные схемы лечения предусматривают введение примерно раз в две недели, или примерно раз в месяц, или примерно раз в 3-6 месяцев. Примерные схемы дозирования включают от примерно 1 до примерно 10 мг/кг или примерно 15 мг/кг в последовательные дни, примерно 30 мг/кг через день или примерно 60 мг/кг еженедельно.

Интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки или последовательности нуклеиновых кислот, экспрессирующие любой из них, можно вводить многократно. Интервалы между однократными дозами могут составлять неделю, месяц или год. Интервалы также могут быть нерегулярными, на что указывает измерение уровней интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белков или их компонентов в крови пациента. Альтернативно, интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки или последовательности нуклеиновых кислот, экспрессирующие любой из них, можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируют в зависимости от периода полужизни интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белков у пациента.

Термин "период полужизни" или " $t_{1/2}$ ", как здесь упоминается, относится к стабильности и/или скорости выведения соединения, такого как интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки по изобретению. На практике период полужизни соединения обычно измеряется в сыворотке и обозначает время после введения, когда концентрация в сыворотке составляет 50% от концентрации в сыворотке во время введения. Интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки по изобретению характеризуются длительным периодом полужизни в сыворотке мышей. В некоторых вариантах осуществления период полужизни интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка составляет по меньшей мере 50 ч, по меньшей мере 60 ч, по меньшей мере 70 ч, по меньшей мере 80 ч, по меньшей мере 90 ч или по меньшей мере 100 ч. В некоторых вариантах осуществления период полужизни интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка составляет по меньшей мере 100 ч. В предпочтительных вариантах осуществления период полужизни интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка у мышей составляет от 116 до 158 ч.

Период полужизни белка связан с его клиренсом. Термин "клиренс" или "скорость клиренса", используемый в настоящем описании, относится к объему плазмы, очищенному от белка в единицу времени. Клиренс интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белков по изобретению низкий. В некоторых вариантах осуществления клиренс интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка составляет менее 10 мл/ч/кг, менее 5 мл/ч/кг, менее 2,5 мл/ч/кг, менее 1 мл/ч/кг или менее 0,5 мл/ч/кг. В некоторых вариантах осуществления клиренс интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка составляет менее 5 мл/ч/кг. В некоторых вариантах осуществления клиренс интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка составляет менее 1 мл/ч/кг. В некоторых вариантах осуществления клиренс интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка у мышей находится в диапазоне от 0,28-0,49 мл/ч/кг.

Термины "объем распределения", "VD", "VSS" или "кажущийся объем распределения", используемые в настоящем описании, относятся к теоретическому объему, который был бы необходим для содержания общего количества вводимого соединения, такого как интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок по изобретению в той же концентрации, что и в плазме крови, и относится к распределению указанного соединения между плазмой и остальной частью тела после перорального или парентерального дозирования. В некоторых вариантах осуществления объем распределения Vss интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка составляет менее 500 мл/кг, менее 400 мл/кг, менее 300 мл/кг, менее 200 мл/кг или менее 100 мл/кг. В некоторых вариантах осуществления объем распределения Vss интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка составляет менее 100 мл/кг. В некоторых вариантах осуществления объем распределения Vss интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка у мышей составляет от 50 до 98 мл/кг.

Другим родственным фармакокинетическим параметром является системное воздействие. Используемые в настоящем описании термины "системное воздействие", "AUC" или "площадь под кривой" относятся к интегралу кривой зависимости концентрации от времени. Системное воздействие может быть представлено концентрациями в плазме (сыворотке или крови) или AUC исходного соединения и/или метаболита(ов). Интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки по изобретению циркулируют в крови с более высоким системным воздействием (AUC (0-inf)), чем исходное антитело. В некоторых вариантах осуществления исходное антитело представляет собой CP870893. В других вариантах осуществления исходное антитело представляет собой 3G5. В некоторых вариантах осуществления системное воздействие интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка составляет по меньшей мере 600 мкг\*ч/мл, по меньшей мере 700 мкг\*ч/мл, по меньшей мере 800 мкг\*ч/мл, по меньшей мере 900 мкг\*ч/мл или по меньшей мере 1000 мкг\*ч/мл, предпочтительно по меньшей мере 1000 мкг\*ч/мл. В некоторых вариантах осуществления системное воздействие интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка у мышей находится в диапазоне от 1033 мкг\*ч/мл до 1793 мкг\*ч/мл.

Как обсуждалось ранее, интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению можно вводить в фармацевтически эффективном количестве для лечения заболеваний млекопитающих *in vivo*. В этом отношении следует понимать, что, как раскрыто, интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок будет включен в состав для облегчения введения и обеспечения стабильности активного агента.

Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может содержать фармацевтически приемлемый, нетоксичный, стерильный носитель, такой как физиологический раствор, нетоксичные буферы, консерванты и т.п. Фармацевтически эффективное количество интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка обычно представляет собой количество, достаточное для опосредования одного или более из следующих факторов: снижение высвобождения HBeAg из HBV-инфицированной клетки; снижение транскрипции пгРНК в HBV-инфицированной клетке; и стимуляция сигнального пути IFN в инфицированной клетке. Конечно, фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в виде одной или более доз, чтобы обеспечить фармацевтически эффективное количество интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка.

В соответствии с объемом настоящего изобретения интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки или последовательности нуклеиновых кислот, экспрессирующие любой из них, можно вводить человеку или другому животному в соответствии с вышеупомянутыми способами лечения в количестве, достаточном для получения терапевтического эффекта. Интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки или последовательности нуклеиновых кислот, экспрессирующие любой из них, можно вводить такому человеку или другому животному в обычной дозированной форме, полученной путем объединения интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белков или последовательностей нуклеиновых кислот, экспрессирующих любой из них, вместе с обычным фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем по известным методикам. Специалисту в данной области будет понятно, что форма и свойства фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя определяются количеством активного ингредиента, с которым его нужно комбинировать, способом введения и другими хорошо известными параметрами. Специалистам в данной области также будет понятно, что смесь, содержащая один или более видов интерферон-ассоциированных антигенсвязывающих белков или последовательностей нуклеиновых кислот, экспрессирующих любой из них, описанных в настоящем изобретении, может оказаться эффективной.

Следует понимать, что способы, описанные в настоящем изобретении, не ограничиваются конкретными способами и экспериментальными условиями, раскрытыми в настоящем описании, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также понятно, что используемая в настоящей заявке терминология предназначена исключительно для целей описания конкретных воплощений и не предназначена для ограничения.

Кроме того, в описанных в настоящем документе экспериментах, если не указано иное, используют обычные молекулярные и клеточные биологические и иммунологические методики, известные специалистам в данной области. Такие методики хорошо известны квалифицированному специалисту и полностью описаны в литературе. См., например, Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, N. Y. (1987-2008), включая все приложения, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)* by MR Green and J. Sambrook and Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (2013, 2nd edition).

Если не указано иное, используемые здесь научные и технические термины имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области техники. В случае какой-либо скрытой двусмысленности приведенные в настоящем документе определения имеют приоритет над любым словарным или внешним определением. Если иное не требуется контекстом, термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать единственное число. Использование "или" означает "и/или", если не указано иное. Использование термина "включая", а также других форм, таких как "включает в себя" и "включено", не носит ограничительного характера. Использование термина "содержащий" включает термин "состоящий из", если не указано иное.

Как правило, номенклатура, используемая в связи с культурой клеток и тканей, молекулярной биологией, иммунологией, микробиологией, генетикой и химией белков и нуклеиновых кислот, а также описанная здесь гибридизация, хорошо известна и широко используется в данной области техники. Предложенные в настоящем описании способы и приемы обычно выполняются в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники, и как описано в различных общих и более конкретных источниках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании, если не указано иное. Ферментативные реакции и методы очистки осуществляются в соответствии со спецификациями производителя, как это обычно делается в данной области или как описано в настоящем документе. Номенклатуры, используемые в связи с аналитической химией, синтетической органической химией, а также медицинской и фармацевтической химией, а также лабораторные процедуры и методы, описанные здесь, хорошо известны и широко используются в данной области техники. Стандартные методы используются для химического синтеза, химического анализа, фармацевтических препаратов, составов и для доставки, и для лечения пациентов.

Используемые в настоящем описании заголовки разделов предназначены только для организационных целей и не должны истолковываться как ограничивающие описанный объект изобретения. Содержание статей, патентов и заявок на патенты, а также все другие документы и доступная в электронном виде информация, упомянутые или процитированные в настоящем описании, настоящим включаются посредством ссылки в полном объеме в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была конкретно и отдельно указана для включения в качестве ссылки. Заявители оставляют за собой право физически включать в эту заявку любые материалы и информацию из любых таких статей, патентов, патентных заявок или других физических и электронных документов.

Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на его конкретные варианты осуществления, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что могут быть внесены различные изменения и могут быть заменены эквиваленты без отклонения от истинной сущности и объема изобретения с использованием настоящего описания в качестве руководства. Теперь, после подробного описания некоторых вариантов осуществления, они будут более понятны со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения.

### Примеры

Пример I. Создание слитых с интерфероном антител (IFA) на основе агонистического антитела против CD40 CP870,893 и характеристика репортерных клеток

#### a - конструкция IFA

Комбинации последовательностей иллюстративных IFA, сконструированных с использованием агонистического антитела против CD40 CP870,893 в качестве каркасного антитела, с расположением IFN и природой линкеров перечислены в табл. 7 и 9. IFN был слит через линкер на N- или C-концевой части легкой цепи (LC) или тяжелой цепи (HC), как указано в табл. 7. Нуклеиновые кислоты, кодирующие HC, LC или слияния, синтезировали с кодонами, оптимизированными для экспрессии у млекопитающих, и клонировали в эукариотический экспрессирующий вектор, такой как pcDNA3.1 (Invitrogen). На фиг. 2A показана иллюстративная карта плазмиды pcDNA3.1, кодирующей SEQ ID NO: 32 под контролем промотора pCMV.

#### b - получение IFA

Клетки Freestyle 293-F (Invitrogen) транзитивно котрансфицировали плазмидами, кодирующими как HC, так и LC, при соотношении HC/LC 4/6. Через шесть дней после трансфекции супернатант собирали, центрифугировали и фильтровали через фильтры 0,22 мкм. Процесс очистки проводили в две стадии на хроматографической системе AktaExpress (GE Healthcare) с использованием Protein A MabSelect Sure 5 мл 1, 6/2,5 см колонка (GE Healthcare) при скорости потока 5 мл/мин. Связывание образца проводили в буфере D-PBS1X pH 7,5 и элюирование буфером Глицин/HCl 0,1 М pH 3. Пик элюирования сохраняли в петле, затем вводили в колонку HiTrap 26/10 для обессоливания (GE Healthcare) со скоростью потока 10 мл/мин в буфере D-PBS1X pH 7,5. Пик элюирования собирали на 96-луночном микропланшете (фракции по 2 мл). Пул собирали в соответствии с профилем УФ-пика. После фильтрации на фильтрах 0,22 мкм (Sartorius MiniSart), проводили контроль качества, включая бактериальные эндотоксины, с использованием Endosafe® nexgen-PTS™ (Charles River), эксклюзионной хроматографии: с использованием колонки SEC 200 Increase 10/300 (GE Healthcare) для определения чистоты и олигомеров и SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях на гелевой системе NuPAGE (Invitrogen) в рабочем буфере MES SDS. Выход продукции указан в табл. 9. Для некоторых IFA выход продукции был очень низким. В этом случае агонистическую активность CD40 и активность IFN оценивали непосредственно с использованием супернатанта, содержащего IFA, без какой-либо дополнительной очистки.

Анализ очищенных IFA на SDS-PAGE в восстанавливающих условиях показал наличие двух основных полос, соответствующих HC и LC. Когда IFN (любой член семейства IFN) был слит с HC, наблюдался сдвиг его молекулярной массы, и такое же явление наблюдалось для LC, слитых с любым IFN (фиг. 2B).

#### c - характеристика IFA на репортерных клетках

Клетки HEK-Blue™ CD40L (InvivoGen кат. #: hkb-cd40) или клетки HEK-Blue™ IFN-α/β (InvivoGen, кат. #: hkb-ifnαβ), использовали для мониторинга, соответственно, активации пути NFκB агонистами CD40 или пути IFN, индуцированного IFN типа I.

Клетки HEK-Blue™ CD40L получали путем стабильной трансфекции клеток HEK293 человеческим геном CD40 и конструкцией NFκB-индуцируемой секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) (InvivoGen) для измерения биологической активности агонистов CD40. Стимуляция CD40 приводит к индукции NFκB, а затем к продукции SEAP, который детектируют в супернатанте с помощью QUANTI-Blue™ (InvivoGen, кат. # гер-qbs2).

Клетки HEK-Blue™ IFN предназначены для мониторинга активации путей JAK/STAT/ISGF3, индуцированных IFN I типа. Активация этого пути индуцирует продукцию и высвобождение SEAP. Уровни SEAP легко определить в супернатанте с помощью QUANTI-Blue™.

HEK-Blue™ IFN-α/β используют для мониторинга активности человеческого IFNα или IFNβ.

Клетки высевали в 96-луночные планшеты (50000 клеток на лунку) и стимулировали указанной

концентрацией для каждого IFA или контроля и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Затем собирали супернатанты и количественно определяли уровни SEAP после инкубации супернатанта в течение примерно 30 минут с использованием QuantiBlue™ и оценки оптической плотности (O. D.) при 620 нм на ридере для планшетов Ensign или PheraStar (Lab Biotech).

Клетки HEK-Blue™ Dual IFN- $\gamma$  (InvivoGen, кат. #: hkb-ifng) или HEK-Blue™ IFN- $\lambda$  (InvivoGen, кат. #: hkb-ifnl) можно использовать для мониторинга активности интерферонов типа II и типа III, соответственно. Клетки HEK-Blue™ IFN- $\lambda$  предназначены для мониторинга активности IFN $\lambda$ . Клетки HEK-Blue™ Dual IFN- $\gamma$  позволяют детектировать биологически активный человеческий IFN $\gamma$ .

d - Функциональная активность IFA на основе IFN $\alpha/\beta$  в отношении репортерных клеток

На фиг. 3 показаны примеры дозозависимых эффектов IFA, где IFN $\beta$  или его мутантная версия, как указано в табл. 7, были слиты с НС, как указано в табл. 7, на клетках HEK-Blue™ CD40L (фиг. 3А-3В) и клетках HEK-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  (фиг. 3С-3D). Агонистическая анти-CD40-активность IFA суммирована в табл. 9, а примеры показаны на фиг. 3А и 3В. Результаты показывают, что все протестированные IFA способны активировать как путь CD40, так и путь IFN- $\alpha/\beta$  дозозависимым образом. Для слияний с С-концом НС или LC значения EC50 для агонистического CD40 находятся в диапазоне от 11, 1 нг/мл до 192 нг/мл (табл. 9). Среднее значение EC50 для исходного антитела составляет 48 нг/мл и 57 нг/мл в эксперименте, показанном на фиг. 3. IFA с IFN, слитым с N-концом НС или LC, также были способны активировать путь CD40, но точные значения EC50 не могли быть определены для этих IFA, поскольку активность определяли непосредственно из супернатанта, а не с использованием очищенных белков (фиг. 3В).

IFN-активность различных IFA суммирована в табл. 9, а примеры показаны на фиг. 3С-3D. Для слияний IFN $\beta$  или мутированного IFN $\beta$  (как указано в табл. 7) с С-концом НС или LC активность IFN варьируется в зависимости от линкерной последовательности со значениями EC50 в диапазоне от 0,14 нг/мл до 4, 5 нг/мл (фиг. 3С и табл. 9). На фиг. 3D показано, что IFA с IFN $\beta$ , слитым с N-концевой частью, проявляют высокую активность IFN. Родительское антитело, используемое в качестве отрицательного контроля, не проявляло никакой активности, тогда как рекомбинантный IFN $\beta$  действительно проявлял сильный дозозависимый ответ. В целом эти результаты демонстрируют, что слияние IFN $\beta$  или его мутантной версии, как указано в табл. 7, с антителом, независимо от локализации, сохраняет обе биологические функции, хотя и с различиями в отношении эффективности.

На фиг. 4 показаны примеры дозозависимой реакции IFA, где IFN $\alpha$  был слит с НС или LC, как указано в табл. 7, на клетках HEK-Blue™ CD40L (фиг. 4А и 4С) и клетках HEK-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  (фиг. 4В и 4D). Результаты показывают, что все протестированные IFA способны активировать как путь CD40, так и путь IFN $\alpha/\beta$  дозозависимым образом. Удивительно, но для всех IFA на основе IFN $\alpha$  эффективность в отношении пути CD40 была воспроизводимо выше, чем у родительского антитела. Значения EC50 для IFA на основе IFN $\alpha$  варьировались от 11, 1 нг/мл до 22, 7 нг/мл, а EC50 для CP870,893 варьировалась от 30 до 80 нг/мл (среднее значение EC50: 48 нг/мл).

IFN-активность IFA варьирует в зависимости от линкерной последовательности со значениями EC50 в диапазоне от 1,6 нг/мл до 5,1 нг/мл. В том же анализе пегилированный IFN $\alpha$ 2a (Pegasys®) также проявлял дозозависимую активность со значением EC50 около 1 нг/мл.

e - Генерация и характеристика IFA без Fc-области

Подходящие конструкции по изобретению могут также представлять собой интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки без Fc-области. Была сконструирована конструкция, кодирующая тяжелую цепь Fab-фрагмента CP870893, слитую с фрагментом TEV-His (SEQ ID NO: 50), и клонирована в экспрессирующую плазмиду pcDNA3.1. Эту конструкцию котрансфицировали в клетки HEK, как описано ранее, с LC, слитыми через разные линкеры с разными IFN, такими как SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37., SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 43. Белки и/или супернатанты оценивают в репортерных клетках и/или их влияние на инфекцию HBV в РНН. Специалисту в данной области должно быть понятно, что конструкции для использования в терапии больше не будут содержать фрагмент TEV-His. Эти конструкции также являются вариантами осуществления изобретения. Интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки без Fc-части будут активны против инфекции HBV. Затем были получены два IFA, и их функциональная характеристика описана в примере V: IFA50: (SEQ ID NO: 41) + (SEQ ID NO: 50) и IFA51: (SEQ ID NO: 42) + (SEQ ID NO: 50).

Пример II. Влияние ИФА на инфицированные HBV первичные гепатоциты

II. a - Влияние IFA на инфекцию HBV в первичных гепатоцитах человека

Было исследовано влияние IFA на инфекцию HBV в первичных гепатоцитах человека (РНН). Клетки РНН высевали в 96-луночные планшеты (70000 клеток/луночку) в среде William's E GlutaMAX (32551-020, Gibco) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS) (SH30066. 02, Nyclone), инсулина (19278-5ML, Sigma), гидрокортизона (H2270-100MG, Sigma) и пенициллина/стрептомицина (15140, Gibco). Через четыре часа клетки промывали и заменяли среду. На следующий день среду заменяли сре-

дой, содержащей матригель (0,25 мг/мл; 356231, Corning). Клетки инфицировали через 48 ч после посева с MOI (множественность инфекции) от 500 до 1000 vge/клетку ((viral genome equivalent) эквивалент вирусного генома) в среде InVitroGRO HI (Z99009, Bioreclamation IVT) с добавлением 5% FCS, 4% PEG 8000 (81268, Sigma), 2% ДМСО (DMSO-100ML, Sigma) и 1% пенициллина/стрептомицина. Через шестьдесят часов после инфицирования клетки трижды промывали PBS. Через четыре дня после инфицирования клетки оставляли необработанными или обрабатывали серийно разбавленными IFA, как показано на чертежах. Через три дня после обработки супернатанты культур собирали и хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего детектирования белка.

#### II. b. - Оценка высвобождения e-антигена HBV (HBeAg)

Уровни e-антигена HBV (HBeAg) в супернатанте клеточной культуры измеряли с помощью ИФА, как описано производителем, и результаты выражали в единицах PEI (HBeAg CLIA 96T/К: CL0312-2; Autobio) или в люминесценции.

#### II. c. - Оценка высвобождения s-антигена HBV (HBsAg)

Количественное определение HBsAg в супернатанте проводили в соответствии с протоколом набора AutoBio HBsAg CLIA (№ CL0310-2), основными стадиями которого были следующими: сначала образцы разводили 1/5 в 1X PBS. Затем в лунки вносили по 50 мкл стандартов, контролей и разведенных образцов. В каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора "Ферментного конъюгата" с последующей инкубацией в течение 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . Затем планшеты промывали 6 раз по 300 мкл промывочного раствора из набора с помощью устройства для промывки планшетов. Затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл "Раствора субстрата" (объемная смесь в реагентах А и В) и проводили инкубацию в течение 10 мин в темноте. Затем планшеты считывали на ридере для микропланшетов PHERASTAR (BMG Labtech) в режиме люминесценции.

#### II. d. - количественная оценка пгРНК

Технику количественной ПЦР использовали для сравнения уровня экспрессии пгРНК из инфицированных клеток, обработанных тестируемыми соединениями. Количественную оценку пгРНК из инфицированных клеток проводили в 96-луночных планшетах с помощью QuantStudio 12K Flex. кДНК получали с помощью обратной транскрипции ОТ с последующей количественной ПЦР с анализом TaqMan Fast Virus в одну стадию (ThermoFisher, кат. № 4444434). Результаты обрабатывали методом  $\Delta\Delta\text{Ct}$  и нормализовали по гену домашнего хозяйства GUSB, дублируя результаты. пгРНК амплифицировали с использованием следующих праймеров и зонда: (прямой: CCTCACCATACTGCACTCA, обратный: GAGGGAGTTCTTCTCTAGG, AGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGC в качестве зонда). Ген GUSB амплифицировали с использованием анализа TaqMan от Thermo Fisher (Hs99999908-m1).

#### II. e. высвобождение CXCL10

Высвобождение CXCL10 оценивали с использованием набора ИФА в соответствии с инструкциями производителя (BioLegend 439904). Образцы разбавляли 1/50 и оценивали люминесценцию на ридере для микропланшетов EnSight при 450 нм.

#### II. f - Влияние IFA на основе $\text{IFN}\alpha/\beta$ на инфекцию HBV

Несколько IFA были проверены на их способность снижать секрецию HBeAg после инфицирования РНН HBV. На фиг. 5 использовали IFA с  $\text{IFN}\beta$  или его мутантной версией, слитыми на С-конце LC. Результаты показывают, что все протестированные IFA сильно снижают высвобождение HBeAg. Действительно, даже при самой низкой испытанной концентрации (1 нг/мл), в зависимости от IFA, наблюдалось ингибирование высвобождения HBeAg от 70 до 90%, что свидетельствует о том, что они обладают мощным противовирусным действием. Примечательно, что в этом эксперименте не удалось достичь 100% ингибирования, так как лечение начиналось через четыре дня после инфицирования и в это время существующий пул HBeAg (мРНК и белок) уже присутствует в клетке и продолжает продуцироваться в дальнейшем.

Эффект IFA, слитых с  $\text{IFN}\alpha$ , также был протестирован на HBV-инфицированных РНН. На фиг. 6 показано, что эти IFA очень эффективны при инфекции HBV со значениями  $\text{EC}_{50}$  в диапазоне от 0,06 нг/мл до 0,2 нг/мл для IFA с  $\text{IFN}\alpha_{2a}$ , слитым на С-конце HC (IFA25: 0,16 нг/мл, IFA26: 0,1 нг/мл; IFA27: 0,06 нг/мл; и IFA38: ~0,2 нг/мл (~2,2 пМ); фиг. 6А и 6С) и от 0,15 до 0,36 нг/мл для IFA с  $\text{IFN}\alpha_{2a}$ , слитым на С-конце LC (IFA28: 0,36 нг/мл; IFA29: 0,15 нг/мл; IFA30: 0,31 нг/мл; и IFA39: ~0,3 нг/мл (~ 3 пМ); фиг. 6В и 6С). Чтобы сравнить противовирусный эффект Pegasys с IFA38 и IFA39, результаты выражены в пМ и показывают, что  $\text{EC}_{50}$  для Pegasys составляет ~250 пМ по сравнению с ~2,2 пМ для IFA38 и ~3 пМ для IFA39, что указывает на то, что IFA гораздо более эффективны, чем Pegasys.

#### II. g - Кратковременного курса лечения достаточно для индукции мощной противовирусной активности

Для оценки эффекта кратковременной обработки IFA первичных гепатоцитов, инфицированных HBV, клетки инфицировали и инкубировали в течение 4 дней, обрабатывали IFA25, IFA27, IFA28, IFA30 или Pegasys в зависимости от дозы в течение 24 ч, промывали и затем инкубировали с свежей средой без какой-либо обработки. Через 3 дня супернатанты собирали для оценки уровня высвобождения HBeAG (фиг. 6Е), HBsAG (фиг. 6F) и CXCL10 (фиг. 6H), клетки лизировали и экстрагировали РНК для количественного



венного определения пгРНК (фиг. 6G). Результаты показывают, что все протестированные IFA были способны ингибировать высвобождение HBeAG и HBsAg, а также экспрессию пгРНК дозозависимым образом. Pegasys сам по себе был способен только ингибировать высвобождение HBeAG и снижать уровни пгРНК. В этом отношении IFA как минимум на 2 log активнее, чем Pegasys, по вирусным параметрам. Удивительно, но, несмотря на то, что все испытанные IFA продемонстрировали дозозависимое ингибирование высвобождения HBsAg, никакого снижения не наблюдалось при приеме Pegasys даже при самой высокой концентрации. Анализ CXCL10, биомаркера пути IFN, показал, что IFA также намного более эффективны, чем Pegasys.

Пример III. Высвобождение цитокинов

III. а - Оценка высвобождения цитокинов (CRA) из клеток цельной крови человека

Анализ стимуляции клеток цельной крови (WBC) *ex vivo* использовали для исследования высвобождения цитокинов после стимуляции IFA. Лейкоциты собирали у четырех здоровых доноров, разводили на 1/3 в RPMI1640 (72400-021, Gibco) и распределяли в стерильные реакционные пробирки (300 мкл). Клетки не стимулировали, стимулировали LPS (LipoPolySaccharide) K12 (tlrl-eklps, Invivogen) в концентрации 10 нг/мл в качестве положительного контроля или IFA в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Затем супернатанты собирали и замораживали при температуре -20°C до дня проведения анализа.

Провоспалительные цитокины человека анализировали с использованием мультиплексного анализа MSD (K15067L-4), который измеряет фактор некроза опухоли (TNF)- $\alpha$ , интерлейкин (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12/IL-23p40 и IFN $\gamma$ . Планшеты MSD анализировали на аппарате 1300 MESO QuickPlex SQ120 (MSD).

На фиг. 7 представлены типичные результаты оценки высвобождения цитокинов *in vitro* из лейкоцитов человека, либо не стимулированных, либо обработанных LPS, либо IFA1.

Дальнейшие результаты тестирования IFA на основе IFN $\beta$ -/мутированного IFN $\beta$ - и IFN $\alpha$  приведены в табл. 11a и 11b. Результаты показывают, что у всех доноров LPS индуцирует очень высокий уровень воспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p40 и IFN $\gamma$ ). Он также индуцировал IP10 (CXCL10), который является биомаркером пути IFN и умеренного уровня IL-10. Тестируют два IFA на основе IFN $\beta$ - (табл. 11a) и шесть IFN $\alpha$ - (табл. 11b). Все они индуцировали биомаркер IP10. Однако они не индуцировали IL-10, IL-1 $\beta$  и IL-2 и индуцировали только уровни IFN $\gamma$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  от очень низкого до умеренного, что свидетельствует о благоприятном профиле безопасности в отношении индукции воспалительных цитокинов.

Пример IV. Фармакокинетические исследования

IV. а - Разработка анализа ИФА для количественного определения IFA

Для количественного определения ИФА на 96-луночные планшеты (Планшеты 96-луночные Maxisorp, THERMO Scientific; 442404) наносили покрытие в течение ночи при 4°C в виде 100 мкл рекомбинантного человеческого белка CD40/TNFRSF5 Fc Chimera, состоящего из внеклеточного домена человеческого CD40, слитого с Fc-частью человеческого IgG1 (CD40-Fc; R&D Systems; 1493-CDB-050) при 0,5 мкг/мл в карбонате натрия (0,05 М, pH 9, 6, C-3041, Sigma). После опорожнения путем переворачивания планшеты затем инкубировали в течение 1 ч при 37°C с PBS-0,05% Tween20-1% молоко (SIGMA; 70166-500 г) с последующей промывкой PBS-0,05% Tween20. Образцы и контроли (100 мкл серийных разведений 1/2) затем инкубировали в течение 90 мин при 37°C с последующими тремя промывками (PBS - 0,05% Tween20) и инкубацией со вторичным антителом против IgG2, конъюгированным с HRP (1/5000, ab99779, Abcam) или с антителом против IFN $\alpha$ , конъюгированным HRP (1/1000, eBioscience/Invitrogen; BMS216MST) в PBS-0,05% Tween20-1% молоко. После трех промывок PBS 0,05% Tween2, добавляли ТМВ (тетраметилбензидин, Tebu Bio; TMBW-1000-01) и планшеты инкубировали в течение 20 мин в темноте. Реакцию останавливали добавлением 1М HCl. Планшеты считывали при 450-650 нм с помощью планшетного ридера Ensign (Perkin Elmer). Количественное определение Pegasys оценивали с использованием аналогичных стадий протокола, но с использованием пар антител, соответствующих человеческому IFN $\alpha$ , от eBioscience/Invitrogen. Захват проводили с использованием 100 мкл человеческого антитела против IFN $\alpha$  (eBioscience/Invitrogen; BMS216MST) в концентрации 1 мкг/мл в карбонате натрия (0,05 М, pH 9, 6, C-3041, Sigma). Для детектирования использовали вторичное антитело против IFN $\alpha$ , конъюгированное с HRP (1/1000, Affymetrix eBioscience/BMS216MST; 15501707) в PBS - 0,05% Tween20-1% молоко.

IV. b - Биодоступность *in vivo* у мышей

Для определения ФК-параметров вводили CP870,893, IFA25, IFA26, IFA27, IFA28, IFA29 и IFA30 при 0,5 мг/кг и Pegasys в дозе 0,3 мг/кг в виде *i.v.* болюса самцам мышей CD1-Swiss, и образцы крови собирали в разные моменты времени. Примеры количественного определения циркулирующих молекул с использованием подхода ИФА, описанного выше, и выявленных с помощью антитела против IFN $\alpha$ , конъюгированного с HRP, показаны на фиг. 8A и 8B, тогда как примеры количественного определения, выявленного с помощью антитела против IgG2, конъюгированного с HRP, показаны на фиг. 8C; количественная оценка Pegasys показана на фиг. 8D. В одном наборе экспериментов, обобщенном в табл. 12A,

ФК-параметры для CP870,893 исследовали в 7-дневном эксперименте, а параметры для IFA27, IFA29 и IFA30 - в 10-дневном эксперименте (количественное определение IFA27 проводили с использованием 2 различных подходов ИФА). В другом наборе экспериментов, обобщенном в табл. 12B, ФК-параметры для CP870,893 и IFA25, IFA26, IFA28 и Pegasys исследовали в 21-дневных экспериментах (количественное определение IFA25 проводили с использованием 2 различных подходов ИФА).

После короткой фазы распределения фармакокинетические профили IFA характеризуются длительным периодом полужизни в сыворотке от 116 до 218 ч (табл. 12A и 12B). Очень похожие фармакокинетические профили были получены для 6 протестированных IFA с высоким уровнем в кровотоке даже через десять дней после введения однократной дозы. Фармакокинетические параметры, обобщенные в табл. 12A/B, показывают, что эти IFA неожиданно циркулируют в крови с более высоким системным воздействием (AUC (0-inf)) в диапазоне от 1033 мкг. ч/мл до 2552 мкг. ч/мл для IFA по сравнению с 590 или 797 мкг. ч/мл, соответственно, для родительского антитела CP870,893 (до 3, 2 раз), что также отражает более низкие значения клиренса для IFA. Объем распределения V<sub>ss</sub> был низким и составлял от 50 до 105 мл/кг, что несколько превышало объем сосудов плазмы (50 мл/кг) у этого вида. Для всех IFA клиренс был оценен как низкий (0,28-0,49 мл/ч/кг). Интересно, что клиренс Pegasys (1,4 мл/ч/кг) до 7 раз выше, чем клиренс ИФА (например, 0,2 мл/ч/кг для IFA27), демонстрируя более высокое системное воздействие IFA.

Пример V.

V. a - Функциональная активность IFA без Fc-фрагмента в отношении репортерных клеток и инфицирования HBV

Чтобы определить, необходима ли Fc-часть IFA для активности, были сконструированы и получены гибриды IFN $\alpha$  с C-концевой частью LC, связанной с Fab-фрагментом HC. IFN $\alpha$  был связан с частью LC с помощью линкера (G4S)<sub>2</sub> (IFA50) или (G4S)<sub>3</sub> (IFA51).

Оценка на клетках HEK-Blue™ CD40L показала, что такие IFA по-прежнему проявляют агонистическую активность в отношении CD40 (фиг. 9A) и активируют путь CD40 со значением EC<sub>50</sub> около 128 нг/мл (IFA 50) и 123 нг/мл (IFA51) соответственно.

Оценка активности IFN на клетках HEK-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  показала, что оба протестированных IFA проявляют активность IFN (фиг. 9B). Значения EC<sub>50</sub> приведены в табл. 9B и составляют примерно 1,36 нг/мл для IFA50 и 1,43 нг/мл для IFA51.

Оба IFA были протестированы на инфекцию HBV, как описано ранее, и оба IFA проявляют мощную противовирусную активность со значениями EC<sub>50</sub> примерно 4,1 пМ (IFA50) и 2,7 пМ (IFA51) соответственно.

V. b - Функциональная активность IFA на основе IFN $\epsilon$  в отношении репортерных клеток и инфекции HBV.

Также были разработаны и произведены слияния CP870,893 с интерфероном третьего типа I (IFN-эпсилон; IFN $\epsilon$ ). Такие IFA тестировали на клетках HEK-Blue™ CD40L, и можно было продемонстрировать, что они сохраняют агонистическую активность в отношении CD40. Результаты для одного такого IFA (IFA49) показаны на фиг. 10A. Оценка клеток HEK-Blue™ hIFN- $\alpha/\beta$  (которые фактически активируются любым интерфероном I типа) показала, что IFA49 также способен активировать пути IFN-I (Фиг. 10B). Значения EC<sub>50</sub> представлены в табл. 9B. Кроме того, IFA49 также был протестирован на инфекцию HBV в первичных гепатоцитах и показал активность, аналогичную Pegasys (фиг. 10C).

Эти результаты демонстрируют, что IFA с IFN $\epsilon$  сохраняют активность как IFN, так и агониста CD40 (т.е. бифункциональны) и обладают противовирусной активностью.

V. c - Функциональная активность IFA на основе IFN $\omega$  в отношении репортерных клеток и инфекции HBV

Также были разработаны и произведены слияния CP870,893 с четвертым интерфероном I типа (IFN omega; IFN $\omega$ ). Такие IFA тестировали на клетках HEK-Blue™ CD40L, и результаты показали, что они сохраняют агонистическую активность в отношении CD40. Результаты для одного такого IFA (IFA46) показаны на фиг. 11A. Оценка клеток HEK-Blue™ hIFN- $\alpha/\beta$  (которые фактически активируются любым интерфероном типа I) показала, что IFA46 также способен активировать пути IFN-I (фиг. 11B). Значения EC<sub>50</sub> представлены в табл. 9B. Кроме того, IFA46 также был испытан на инфекцию HBV в первичных гепатоцитах и показал активность, аналогичную Pegasys (фиг. 11C).

Эти результаты демонстрируют, что IFA с IFN $\omega$  сохраняют активность как IFN, так и агониста CD40 (т.е. бифункциональны) и обладают противовирусной активностью.

V. d - Функциональная активность IFA на основе IFN $\gamma$  на репортерных клетках при HBV инфекции

Также были разработаны и произведены слияния CP870,893 с интерфероном II типа (IFN гамма; IFN $\gamma$ ). Оценка этих IFA на клетках HEK-Blue™ CD40L демонстрирует, что они сохраняют агонистическую активность в отношении CD40 независимо от того, связан ли IFN $\gamma$  с C-концевой частью LC (IFA42) или HC (IFA43) (фиг. 12A). Оценка этих IFA на клетках HEK-Blue™-IFN $\gamma$  (фиг. 12B) показала, что они также способны активировать путь IFN $\gamma$ . Активность IFN $\gamma$  несколько отличалась между IFA42 (EC<sub>50</sub>: 15 нг/мл) и IFA43 (EC<sub>50</sub>: < 0,01 нг/мл). Значения EC<sub>50</sub> представлены в табл. 9B. Кроме того, IFA42 и IFA43

тестировали дозозависимым образом на инфекцию HBV в первичных гепатоцитах, как описано ранее. Результаты показывают, что оба IFA снижают высвобождение HbeAg дозозависимым образом (фиг. 12С), указывая на то, что IFA с IFN типа II активны при инфекции HBV.

В совокупности эти результаты демонстрируют, что IFA с IFN $\gamma$  сохраняют как активность IFN, так и агонистическую активность CD40 (т.е. бифункциональны) и обладают противовирусной активностью.

V. e - Функциональная активность IFA на основе IFN $\lambda$  на репортерных клетках и в отношении инфекции HBV

Также были разработаны и произведены слияния CP870,893 с интерфероном III типа (IFN лямбда; IFN $\lambda$ ). Эти IFA тестировали на клетках HEK-Blue™ CD40L, и результаты показали, что они также сохраняют агонистическую активность в отношении CD40 независимо от того, связан ли IFN $\lambda$  с С-концевой частью LC (IFA44) или HC (IFA45) (фиг. 13А). Оценка этих IFA на клетках HEK-Blue™-IFN $\lambda$  показала, что они также способны активировать путь IFN $\lambda$  (фиг. 13В). Значения EC50 представлены в табл. 9В. Эти результаты также демонстрируют, что IFA с IFN $\lambda$  сохраняют активность как IFN, так и агониста CD40 (т.е. бифункциональны).

IFA44 и IFA45 тестировали в однократной дозе по сравнению с Pegasys в отношении инфекции HBV в первичных гепатоцитах, как описано ранее. Результаты показывают, что оба типа IFA снижают высвобождение HbeAg на 65% и 78%, соответственно. В этих условиях Pegasys ингибировал высвобождение HbeAg на 81%. Эти результаты показывают, что IFA с IFN типа III активны в отношении инфекции HBV со значениями EC50 для обоих протестированных IFA <10 нМ (фиг. 13С).

Пример VI. Получение слитых с интерфероном антител (IFA) на основе антитела против CD40 3G5 и характеристика репортерных клеток

VI. a - дизайн IFA

Комбинации последовательностей иллюстративных IFA, сконструированных с антителом 3G5 к CD40 (Celldex) в качестве каркасного антитела, с расположением IFN и природой линкеров перечислены в табл. 7 и 10. IFN был слит через линкер в С-концевой части легкой цепи (LC) или тяжелой цепи (HC), как указано в табл. 7. Нуклеиновые кислоты, кодирующие HC, LC или слияния, синтезировали с кодонами, оптимизированными для экспрессии у млекопитающих, и клонировали в эукариотический экспрессирующий вектор, такой как pcDNA3.1 (Invitrogen).

VI. b - получение IFA

Получение IFA осуществляли, как описано ранее, и выход продукта указан в табл. 10. Для некоторых IFA выход продукта был очень низким, в основном для слияния IFN $\beta$  с С-концевой частью LC. Для этих IFA агонистическую активность CD40 и IFN оценивали непосредственно с использованием супернатанта, содержащего IFA, без какой-либо дополнительной очистки. Анализ очищенных IFA на SDS-PAGE в восстанавливающих условиях показал наличие двух основных полос, соответствующих HC и LC. При слиянии IFN с HC наблюдалось изменение его молекулярной массы (фиг. 14).

VI. c - Функциональная активность IFA на основе IFN $\alpha/\beta$  на репортерных клетках

Характеристику IFA 3G5 на репортерных клетках проводили на клетках HEK-Blue™ CD40L (фиг. 15А-В и 16А) и клетках HEK-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  (фиг. 15С-Д и 16В), как описано ранее (см. I. c).

VI. c. 1. IFA на основе IFN $\beta$

На фиг. 15 показаны примеры дозозависимого ответа IFA, где IFN $\beta$  был слит с HC или LC 3G5, на клетках HEK-Blue™ CD40L и HEK-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  (фиг. 15). Результаты, суммированные в табл. 10, показывают, что все протестированные IFA на основе IFN $\beta$  являются функциональными и способны активировать как путь CD40, так и путь IFN $\alpha/\beta$  дозозависимым образом.

Примеры активности CD40 показаны на фиг. 15А и 15В. Слияние IFN $\beta$  с С-концевой частью HC демонстрирует высокую вариабельную активность против CD40 и во всех случаях ниже, чем у родительского антитела, со значениями EC50 в диапазоне от 30 нг/мл до 190,5 нг/мл (фиг. 15А и табл. 10). Среднее значение EC50 для родительского антитела 3G5 составляет 9,3 нг/мл.

Для слияний на С-концевой части LC выход продукта был очень низким, и активность оценивали с использованием супернатантов, содержащих IFA после сверхэкспрессии в HEK-клетках. Оценка этих супернатантов на HEK-Blue™ CD40L (фиг. 15В) демонстрирует, что эти IFA активны в отношении CD40-пути. Для 3G5 агонистическая активность против CD40 все еще детектируется, когда супернатант разбавляют в 300 раз. И наоборот, для наблюдения активности супернатантов, содержащих IFA, требовалось разведение 1/10 (фиг. 15В).

IFN-активность IFA тестировали на клетках HEK-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$ , и результаты суммированы в табл. 10. Примеры показаны на фиг. 15С-Д. Для слияний IFN $\beta$  в С-концевой части HC активность IFN варьируется в зависимости от линкерной последовательности со значениями EC50 в диапазоне от 0, от 45 до 10,3 нг/мл (фиг. 15С). Для IFA со слиянием IFN $\beta$  в С-концевой части LC-содержащего супернатанта, активность IFN все еще детектируется даже после 10000-кратного разведения супернатанта (фиг. 15Д).

VI. c. 2. IFA на основе IFN $\alpha$

На фиг. 16 показаны примеры дозозависимого ответа IFA, где IFN $\alpha$  был слит с HC 3G5, на клетках HEK-Blue™ CD40L (фиг. 16A) и HEK-Blue™ IFN $\alpha/\beta$  (фиг. 16B).

Результаты показывают, что все IFA демонстрируют функциональную активацию как пути CD40, так и пути IFN $\alpha/\beta$  дозозависимым образом (средние значения EC50 представлены в табл. 10).

Для всех IFA на основе IFN $\alpha$  активность в отношении пути CD40 была аналогична активности родительского антитела со средними значениями EC50 в диапазоне от 11,74 до 14,2 нг/мл (фиг. 16A и табл. 10). Среднее значение EC50 для родительского антитела 3G5 составляет 9,3 нг/мл.

IFN-активность IFA на основе IFN $\alpha$  тестировали на клетках HEK-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  и продемонстрировали очень высокую активность. Средние значения EC50 для активности IFN этих IFA варьировались от 0,04 до 0,12 нг/мл (фиг. 16B и табл. 10).

#### VI. d - Генерация и характеристика IFA без Fc-области

Подходящие конструкции по изобретению могут также представлять собой интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки без Fc-области. Была сконструирована конструкция, кодирующая тяжелую цепь Fab-фрагмента 3G5, слитого с фрагментом TEV-His (SEQ ID NO:: 65), и клонирована в экспрессирующую плазмиду pcDNA3.1. Эту конструкцию котрансфецировали в клетки HEK, как описано ранее, с LC, слитыми через разные линкеры с IFN, такими как SEQ ID NO:: 70 или SEQ ID NO:: 71. Белки и/или супернатанты оценивают в репортерных клетках и/или их влияние на инфекцию HBV в РНН. Специалисту в данной области должно быть понятно, что конструкции для использования в терапии больше не будут содержать фрагмент TEV-His. Эти конструкции также являются вариантами осуществления изобретения. Интерферон-ассоциированные антигенсвязывающие белки без Fc-части будут активны против инфекции HBV.

#### Пример VII.

##### VII. a - Влияние IFA на основе IFN $\alpha/\beta$ на инфекцию HBV

##### VII. a. 1. IFA на основе IFN $\beta$

FA, слитые с IFN $\beta$ , тестировали на их способность снижать высвобождение HBeAg после инфекции РНН HBV, как описано ранее, и примеры показаны на фиг. 17A. Результаты показывают, что эти IFA HBV. Для всех протестированных IFA наблюдается дозозависимое ингибирование с уменьшением от 12% до 52%, полученным при 1 нг/мл, и максимальным снижением примерно на 85%, наблюдаемым с IFA109 при 100 нг/мл. 100% ингибирование не может быть достигнуто, поскольку лечение активны при инфекции началось через четыре дня после инфекции, и в это время существующий пул HBeAg (мРНК и белок) уже присутствует в клетке и продолжает продуцироваться после этого.

##### VII. a. 2. IFA на основе IFN $\alpha$

IFA, слитые с IFN $\alpha$ , также тестировали на их способность уменьшать высвобождение HBeAg после инфекции РНН HBV, как описано ранее, и примеры показаны на фиг. 17B. Результаты показывают, что эти IFA на основе IFN $\alpha$  очень эффективны в отношении инфекции HBV. Для всех протестированных IFA также наблюдалось дозозависимое ингибирование со снижением от 61 до 80%, полученным при 1 нг/мл, и максимальное снижение (от 85 до 92%) было почти достигнуто при 100 нг/мл для всех IFA. Эти результаты демонстрируют, что IFA на основе IFN $\alpha$  являются очень мощными противовирусными молекулами против HBV.

#### Пример VIII. Анализ высвобождения цитокинов (CRA) из клеток цельной крови человека

Анализ стимуляции лейкоцитов *ex vivo* использовали для исследования высвобождения цитокинов после стимуляции IFA, как описано ранее (см. а). Пример с IFA109 показан на фиг. 18 и в табл. 13. Результаты показывают, что все IFA индуцируют высвобождение CXCL10. Они не индуцировали IL-10, IL-1 $\beta$  и IL-2 и индуцировали только уровни IFN $\gamma$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  от очень низкого до умеренного, что свидетельствует о благоприятном профиле безопасности в отношении индукции воспалительных цитокинов.

#### Эквиваленты

Изобретение может быть воплощено в других конкретных формах, не выходя за рамки его объема или существенных характеристик. Таким образом, вышеприведенные варианты осуществления во всех отношениях следует рассматривать как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение. Объем изобретения, таким образом, указан в прилагаемой формуле изобретения, а не в предшествующем описании, и поэтому предполагается, что все изменения, подпадающие под значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, включены в настоящее описание.

#### Объекты

С учетом вышеизложенного следует понимать, что настоящее изобретение также относится к следующим объектам:

##### 1. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, содержащий:

(I) агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и (II) интерферон (IFN) или его функциональный фрагмент для применения в лечении инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV).

2. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.1, где агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит три оп-

ределяющих комплементарность области легкой цепи (CDR), которые по меньшей мере на 90% идентичны последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO: 3; и три CDR тяжелой цепи, которые по меньшей мере на 90% идентичны последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO: 6.

3. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.1 или 2, где агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющих комплементарность области легкой цепи (CDR), которые идентичны последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO: 3; и три CDR тяжелой цепи, которые идентичны последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO: 6.

4. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.2 или 3, где каждая CDR определена в соответствии с определением Kabat, определением Chothia, определением AbM или контактным определением CDR; предпочтительно, где каждая CDR определена в соответствии с определением CDR Kabat или определением CDR Chothia.

5. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.1, где агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 56, CDRH2, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 57, и CDRH3, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 58; и

(b) легкую цепь или ее фрагмент, содержащую CDRL1, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 52, CDRL2, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 53, и CDRL3, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 54.

6. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.1, где агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, которая идентична SEQ ID NO: 56, CDRH2, которая идентична SEQ ID NO: 57, и CDRH3, которая идентична SEQ ID NO: 58; и

(b) легкую цепь или ее фрагмент, содержащую CDRL1, которая идентична SEQ ID NO: 52, CDRL2, которая идентична SEQ ID NO: 53, и CDRL3, которая идентична SEQ ID NO: 54.

7. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из предыдущих пунктов, где агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 51 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%; и/или вариабельную область тяжелой цепи VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 55 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

8. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из предыдущих пунктов, где тяжелая цепь агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит тяжелую цепь Fab-области, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, или последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей.

9. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из предыдущих пунктов, где агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность SEQ ID NO: 3, или последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей; и/или тяжелую цепь (HC), которая содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 48, или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%.

10. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.9, где HC содержит последовательность SEQ ID NO: 6, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

11. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.9, где HC содержит последовательность SEQ ID NO: 9, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

12. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.9, где HC содержит последовательность SEQ ID NO: 49, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

13. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.9, где HC содержит последовательность SEQ ID NO: 48, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

14. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из предыдущих пунктов, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой человеческий интерферон.

15. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из предыдущих пунктов, где IFN или его функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из IFN типа











кая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 3.

117. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.49, 50 или 52-94, где IFN или его функциональный фрагмент слит с С-концом легкой цепи агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер из табл. 5, конкретно, из табл. 5A или табл. 5B, более конкретно, из табл. 5A.

118. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.117, где легкая цепь агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит последовательность SEQ ID NO: 3.

119. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.117 или 118, где IFN $\alpha$ 2a содержит последовательность SEQ ID NO: 17.

120. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по пп.117 или 118, где IFN $\beta$  содержит последовательность SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16.

121. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.120, где IFN $\beta$  содержит последовательность SEQ ID NO: 14.

122. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.120, где IFN $\beta$  содержит последовательность SEQ ID NO: 15.

123. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.120, где IFN $\beta$  содержит последовательность SEQ ID NO: 16.

124. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по пп.117 или 118, где IFN $\gamma$  содержит последовательность SEQ ID NO: 19.

125. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по пп.117 или 118, где IFN $\lambda$ 2 содержит последовательность SEQ ID NO: 18.

126. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.117-125, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок дополнительно содержит тяжелую цепь агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента.

127. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.126, где тяжелая цепь агонистического антитела против CD40 содержит последовательность SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 12.

128. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.49, 50 или 52-94, где IFN слит с N-концом легкой цепи агонистического антитела против CD40 или агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер из табл. 6, конкретно из табл. 6A или табл. 6B, более конкретно из табл. 6A.

129. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.128, где легкая цепь агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит последовательность SEQ ID NO: 3.

130. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по пп.128 или 129, где IFN $\alpha$ 2a содержит последовательность SEQ ID NO: 17.

131. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по пп.128 или 129, где IFN $\beta$  содержит последовательность SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16.

132. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.131, где IFN $\beta$  содержит последовательность SEQ ID NO: 14.

133. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.131, где IFN $\beta$  содержит последовательность SEQ ID NO: 15.

134. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.131, где IFN $\beta$  содержит последовательность SEQ ID NO: 16.

135. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.128 или 129, где IFN $\gamma$  содержит последовательность SEQ ID NO: 19.

136. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.128 или 129, где IFN $\lambda$ 2 содержит последовательность SEQ ID NO: 18.

137. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.128-136, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок дополнительно содержит тяжелую цепь антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента.

138. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.137, где тяжелая цепь агонистического антитела против CD40 содержит последовательность SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 12.

139. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.1-138, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID

NO: 46 и SEQ ID NO: 47.

140. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.139, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 43.

141. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.139 или 140, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащее одну из комбинаций последовательностей, раскрытых в табл. 9, конкретно в табл. 9А или табл. 9В, более конкретно в табл. 9А.

142. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.141, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащее последовательности SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 3.

143. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.141, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащее последовательности SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 3.

144. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.141, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащее последовательности SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 3.

145. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.141, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащее последовательности SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 9.

146. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.141, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащее последовательности SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 9.

147. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.141, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или слитый с интерфероном его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащее последовательности SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 9.

148. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.1-147, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок активирует как путь CD40, так и путь IFN.

149. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.148, где активность CD40 определяют с использованием анализа положительной регуляции поверхностных молекул цельной крови или анализа репортерных клеток *in vitro*.

150. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.149, где активность CD40 определяют с помощью анализа репортерных клеток *in vitro*, необязательно с использованием клеток НЕК-Blue™ CD40L.

151. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.148-150, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок активирует путь CD40 с EC50 менее 400, 300, 200, 150, 100, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 или 15 нг/мл.

152. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.151, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок активирует путь CD40 с EC50 в диапазоне от 10 до 200 нг/мл.

153. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.152, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок активирует путь CD40 с EC50 в диапазоне от 10 до 50 нг/мл, предпочтительно от 10 до 30 нг/мл.

154. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.148-153, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок активирует путь IFN с EC50 менее 100, 60, 50, 40, 30, 20, 10 или 1 нг/мл.

155. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.148-154, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок активирует путь IFN с EC50 менее 11 нг/мл, предпочтительно менее 6 нг/мл.

156. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.148-155, где путь IFN представляет собой путь IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\gamma$ , IFN $\omega$  или IFN $\lambda$ .

157. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.156, где активность IFN $\beta$  определяют с помощью анализа репортерных клеток *in vitro*, необязательно с использова-

нием клеток НЕК-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$ .

158. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.156, где активность IFN $\alpha$  определяют с помощью анализа репортерных клеток *in vitro*, необязательно с использованием клеток НЕК-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$ .

159. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.156, где активность IFN $\gamma$  определяют с помощью анализа репортерных клеток *in vitro*, необязательно с использованием клеток НЕК-Blue™ Dual IFN- $\gamma$ .

160. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.156, где активность IFN $\lambda$  определяют с помощью анализа репортерных клеток *in vitro*, необязательно с использованием клеток НЕК-Blue™ IFN- $\lambda$ .

161. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из предыдущих пунктов, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок снижает высвобождение HBeAg первичными гепатоцитами *in vitro* по меньшей мере на 12% при 1 нг/мл.

162. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.161, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок снижает высвобождение HBeAg первичными гепатоцитами *in vitro* до 90% при 1 нг/мл.

163. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.161, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок снижает высвобождение HBeAg с EC50 менее 30 нг/мл.

164. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.163, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок снижает высвобождение HBeAg с EC50 менее 10 нг/мл.

165. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.164, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок снижает высвобождение HBeAg с EC50 менее 1 нг/мл.

166. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.164, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок снижает высвобождение HBeAg с EC50 менее 0,1 нг/мл.

167. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из предыдущих пунктов, в частности по пп.148-165, где уровень экспрессии одного или более биомаркеров пути IFN подвергается положительной регуляции в HBV-инфицированной клетке при обработке интерферон-ассоциированным антигенсвязывающим белком, предпочтительно по меньшей мере в 1,5 раза, более предпочтительно по меньшей мере в 2 раза, наиболее предпочтительно по меньшей мере в 3 раза.

168. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.167, где биомаркер пути IFN представляет собой хемокин.

169. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.168, где биомаркер пути IFN представляет собой стимулируемый интерфероном ген ISG20.

170. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.168, где биомаркер пути IFN представляет собой хемокин C-X-C, выбранный из группы, состоящей из CXCL9, CXCL10 и CXCL11.

171. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.170, где биомаркер пути IFN представляет собой CXCL10.

172. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из предыдущих пунктов, в частности по пп.148-171, где уровень экспрессии одного или более из IL10, IL1 $\beta$  и IL2 не подвергается значительной положительной регуляции в HBV-инфицированной клетке при обработке интерферон-ассоциированным антигенсвязывающим белком.

173. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из предыдущих пунктов, где системное воздействие интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка повышено по сравнению с антителом CP870, 893, предпочтительно по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 15%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 25%.

174. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из предыдущих пунктов, где системное воздействие интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка составляет по меньшей мере 1000 мкг\*ч/мл.

175. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.174, где системное воздействие интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка находится в диапазоне от 1033 до 1793 мкг\*ч/мл.

176. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из предыдущих пунктов, где период полужизни интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка составляет по меньшей мере 100 ч.

177. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.176, где период полужизни интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка составляет от 116 до 158 ч.

178. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из предыдущих пунктов, где скорость клиренса интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка ниже 0,5 мл/ч/кг.

179. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.178, где клиренс интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка находится в диапазоне от 0,28 до 0,49 мл/ч/кг.

180. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.1-179, где объем распределения  $V_{ss}$  интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка составляет ниже 100 мл/кг.

181. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.180, где объем распределения  $V_{ss}$  интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка составляет от 50 до 98 мл/кг.

182. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из предыдущих пунктов, где применение включает введение интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка пациенту посредством генетической доставки с использованием последовательностей РНК или ДНК, кодирующих интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, или вектора или векторной системы, кодирующих интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок.

183. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.1-182, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок содержится в фармацевтической композиции.

184. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.183, где фармацевтическая композиция пригодна для перорального, парентерального или местного введения или для введения путем ингаляции.

185. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.184, где фармацевтическая композиция пригодна для перорального введения.

186. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.184, где фармацевтическая композиция пригодна для местного введения.

187. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.184, где фармацевтическая композиция пригодна для введения путем ингаляции.

188. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.184, где фармацевтическая композиция пригодна для парентерального введения.

189. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.188, где фармацевтическая композиция пригодна для внутривенного, внутриартериального, внутривнутрибрюшинного, внутримышечного, подкожного, ректального или вагинального введения.

190. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.189, где фармацевтическая композиция пригодна для инъекции, предпочтительно для внутривенной или внутриартериальной инъекции или для капельного введения.

191. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.183-190, где фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один буферный агент.

192. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.191, где буферный агент представляет собой ацетат, формиат или цитрат.

193. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.192, где буферный агент представляет собой ацетат.

194. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.192, где буферный агент представляет собой формиат.

195. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.192, где буферный агент представляет собой цитрат.

196. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.183-195, где фармацевтическая композиция содержит поверхностно-активное вещество.

197. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.196, где поверхностно-активное вещество выбрано из списка, содержащего плуроники, ПЭГ, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, тритон, трометамин, лецитин, холестерин и тилоксапал.

198. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.197, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат.

199. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.198, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80 или полисорбат 100.

200. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.199, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20.

201. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по п.199, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

202. Интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок для применения по любому из

пп.183-201, где фармацевтическая композиция содержит стабилизирующий агент, необязательно где стабилизирующий агент представляет собой альбумин.

Таблица 11А. IFA на основе IFN-β

		IFN-γ	IL-10	IL12p40	IL1 β	IL2	IL6	IP10	TNF α
NT	Донор 1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	457	nd
	Донор 2	nd	nd	101,4	nd	nd	nd	672,7	4,6
	Донор 3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	302,3	nd
	Донор 4	nd	nd	104	nd	nd	nd	648,2	nd
LPS	Донор 1	2023	148	7757,1	5116	nd	20709,6	6646,7	1706,3
	Донор 2	4675,6	57,2	6265,6	6263,7	20,7	11070,1	39539,4	2987,1
	Донор 3	1537,3	192,9	1750	3137,6	nd	16837,7	6141	944,9
	Донор 4	2360,7	299,7	1676,5	6423	18,6	20654	22848,2	1107,2
IFA1	Донор 1	98,1	nd	nd	nd	nd	16,3	46033,6	43,7
	Донор 2	nd	nd	118,8	nd	nd	11,8	43545,5	36,6
	Донор 3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	23562,1	34
	Донор 4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	31922,5	57,1
IFA2	Донор 1	nd	nd	nd	nd	nd	18,6	43382,3	41
	Донор 2	nd	nd	114,2	nd	nd	17,4	43283,4	33,8
	Донор 3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	25961,4	32,2
	Донор 4	109,4	nd	nd	Nd	nd	nd	38445	66

Таблица 11В. IFA на основе IFN- $\alpha$ 

		IFN- $\gamma$	IL-10	IL12p40	IL1 $\beta$	IL2	IL6	IP10	TNF $\alpha$
NT	Донор 5	12,6	0,6	91,6	0,9	0,9	3,9	270,3	2,1
	Донор 6	5	1,1	129,9	19,9	#div/0!	423,2	1052,7	16
	Донор 7	16,5	2	143,7	22,1	2,1	426,9	1025	12,6
	Донор 8	9,7	0,1	58,3	1,8	#div/0!	2,6	594,2	2,2
LPS	Донор 5	10848,1	46,6	8463,3	8712,3	10,5	30713,2	20538,9	1738,3
	Донор 6	2467,1	175,6	5364,9	6557,9	3,3	31735,5	17262,6	2583,3
	Донор 7	3310,1	248,6	6814,8	9123,9	16,6	39139,8	59939,2	6270,1
	Донор 8	2555,6	138,5	2942,9	6767,5	9,6	31756,7	20062,7	1265,5
IFA25	Донор 5	495,5	1,5	99,5	1,9	5,5	30,5	39637,5	30,4
	Донор 6	312,2	2	129,8	16,5	4	51,8	61963,8	71,4
	Донор 7	271,2	2,9	130,3	9,1	4,4	75	133442,5	30,3
	Донор 8	441,6	1,9	74,8	6,8	3,2	44,3	95647,9	87,4
IFA26	Донор 5	330,4	2	98,1	2,1	6,4	29,3	37880,2	32,1
	Донор 6	303,7	3,3	150,8	17,1	3,1	53	72944,8	45,7
	Донор 7	180,3	2	135,6	9,2	4,9	75,2	154696,3	29,7
	Донор 8	421,4	2,8	95,7	6,8	4,1	42,1	79768,5	89,1
IFA27	Донор 5	430,7	2,2	127,8	3,1	7,1	32,9	40214,1	61,3
	Донор 6	286,5	2	148,5	16,8	2,1	66	83445	70,1
	Донор 7	350,3	4,7	117,6	9,3	4,4	73,5	195844,6	105,6
	Донор 8	440,1	2,6	68,6	8,9	0,6	46,9	102676,8	43,4
IFA28	Донор 5	620,1	2,7	127,3	3,4	8,7	35	40958,5	24,6
	Донор 6	264,7	2	170,3	13,6	2,4	45,7	62333,3	33
	Донор 7	289,6	2,7	144,8	13,7	3,9	77,1	176521,8	59,6
	Донор 8	436,2	2,5	74,4	4,9	2,3	36,8	79217,6	37,6
IFA29	Донор 5	692,7	1,3	108,7	2,3	3,7	33,9	55062,8	30,3
	Донор 6	183,1	2,2	158,8	11,6	0,4	44,4	58665,4	44,3
	Донор 7	235,5	2,6	127,6	9,6	2	65,6	136893,2	90,5
	Донор 8	301,1	3	77,7	5,8	0,6	33,8	69226,3	48
IFA30	Донор 5	709,7	1,2	110,6	2,9	5,5	38	63040,7	36,5
	Донор 6	122,9	2	153	14,9	1,7	46,1	67861,2	37,4
	Донор 7	64,6	1	114	10	2,9	75,5	149093	32,7
	Донор 8	206	1,9	71,1	6,8	1,8	37,9	85986,9	40,5

Таблица 12А

Матрикс	Соединение	Доза прижизненный период	Метод	С0 (мкг/мл)	AUC (0-last) (мкг.ч/мл)	T <sub>last</sub> (ч)	AUC (0-inf) (мкг.ч/мл)	% экстраполяции	T <sub>1/2t</sub> (ч)	СI (мл/ч/кг)	V <sub>D</sub> мл/кг
Сыворотка	CP87 0,893	0,5 мг/кг 168ч	ИФА-IgG2	7,15	241	168	590	59	264 (длинный)	0,35 (низкая)	296 (низкая)
Сыворотка	IFA27	0,5 мг/кг 240ч	ИФА-IgG2	14,7	1501	240	2552	41	218 (длинный)	0,2 (низкая)	55 (низкая)
Сыворотка	IFA27	0,5 мг/кг 240ч	ИФА-IFN	16,9	1318	240	1793	26	125 (длинный)	0,28 (низкая)	50 (низкая)
Сыворотка	IFA29	0,5 мг/кг 240ч	ИФА-IFN	11,6	804	240	1033	22	116 (длинный)	0,49 (низкая)	78 (низкая)
Сыворотка	IFA30	0,5 мг/кг 240ч	ИФА-IFN	8,12	741	240	1089	31	158 (длинный)	0,46 (низкая)	98 (низкая)

Таблица 12В

Матрикс	Соединение	Доза прижизненный период	Метод	С0 (мкг/мл)	AUC (0-last) (мкг.ч/мл)	T <sub>last</sub> (ч)	AUC (0-inf) (мкг.ч/мл)	% экстраполяции	T <sub>1/2t</sub> (ч)	СI (мл/ч/кг)	V <sub>D</sub> мл/кг
Сыворотка	IFA25	0,5 мг/кг 504ч	ИФА-IFN	7,45	1328	504	1500	11	154 (длинный)	0,34 (низкая)	73 (низкая)
Сыворотка	IFA26	0,5 мг/кг 504ч	ИФА-IFN	8,2	988	336	1027	3,8	59 (длинный)	0,49 (низкая)	57 (низкая)
Сыворотка	IFA28	0,5 мг/кг 504ч	ИФА-IFN	9,38	1048	504	1264	17	213 (длинный)	0,4 (низкая)	105 (низкая)
Сыворотка	Рсgasus	0,3 мг/кг 504ч	ИФА-IFNα-специфический	8,3	210	168	215	2	30 (средний)	1,4 (низкая)	62 (низкая)
Сыворотка	CP87 0,893	0,5 мг/кг 504ч	ИФА-IgG2	11,9	527	168	797	34	116 (длинный)	0,63 (низкая)	96 (низкая)
Сыворотка	IFA25	0,5 мг/кг 504ч	ИФА-IgG2	11,8	1292	240	1971	34	155 (длинный)	0,26 (низкая)	56 (низкая)

Таблица 13

Условие	донор	IFN-γ	IL-10	IL12p40	IL1 β	IL2	IL6	IP10	TNFα
NT	D1	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	457	Nd
	D2	Nd	Nd	101,4	Nd	Nd	Nd	672,7	4,63
	D3	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	302,3	Nd
	D4	Nd	Nd	104	Nd	Nd	Nd	648,2	Nd
LPS	D1	2023	148	7757	5116	Nd	20710	6647	1706
	D2	4676	57	6266	6264	21	11070	39539	2987
	D3	1537	193	1750	3138	Nd	16838	6141	945
	D4	2361	300	1677	6423	19	20654	22848	1107
IFA109	D1	nd	nd	Nd	nd	nd	13,48	44495,49	43,63
	D2	Nd	Nd	116,29	Nd	Nd	10,6	44030,74	37,52
	D3	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	31506,88	62,17
	D4	Nd	Nd	103,45	Nd	Nd	nd	45005,31	133,02



## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

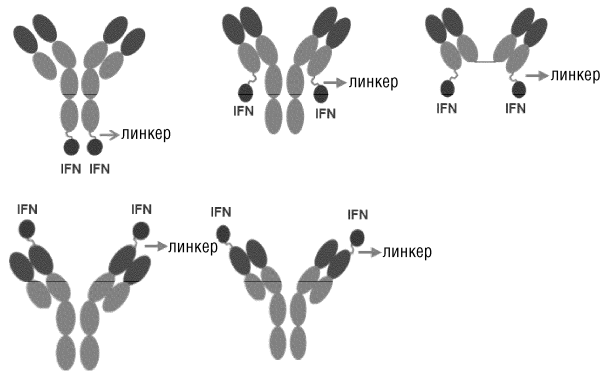
1. Применение интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка, содержащего:
  - (I) агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и
  - (II) интерферон (IFN) или его функциональный фрагментдля лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV), где IFN или его функциональный фрагмент слит с агонистическим антителом против CD40 или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом.
2. Применение по п.1, где IFN или его функциональный фрагмент слит с агонистическим антителом против CD40 или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом через линкер.
3. Применение по п.1 или 2, где агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит:
  - (a) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 56, CDRH2, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 57, и CDRH3, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 58; и
  - (b) легкую цепь или ее фрагмент, содержащую CDRL1, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 52, CDRL2, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 53, и CDRL3, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 54.
4. Применение по п.1 или 2, где агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит:
  - (a) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, которая идентична SEQ ID NO: 56, CDRH2, которая идентична SEQ ID NO: 57, и CDRH3, которая идентична SEQ ID NO: 58; и
  - (b) легкую цепь или ее фрагмент, содержащую CDRL1, которая идентична SEQ ID NO: 52, CDRL2, которая идентична SEQ ID NO: 53, и CDRL3, которая идентична SEQ ID NO: 54.
5. Применение по любому из предыдущих пунктов, где агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 51 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%; и/или переменную область тяжелой цепи VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 55 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.
6. Применение по любому из предыдущих пунктов, где агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность SEQ ID NO: 3 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%; и/или тяжелую цепь (HC), которая содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 48, или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%.
7. Применение по любому из предыдущих пунктов, где IFN или его функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из IFN типа I, IFN типа II и IFN типа III или их функционального фрагмента.
8. Применение по п.7, где IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$  или IFN $\beta$  или их функциональный фрагмент.
9. Применение по любому из предыдущих пунктов, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$ 2a или его функциональный фрагмент и где предпочтительно IFN $\alpha$ 2a содержит последовательность SEQ ID NO: 17 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.
10. Применение по любому из пп.1-8, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\beta$  или его функциональный фрагмент и где предпочтительно IFN $\beta$  содержит последовательность SEQ ID NO: 14 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.
11. Применение по любому из предыдущих пунктов, где IFN или его функциональный фрагмент слит с легкой цепью агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, предпочтительно с C-концом.
12. Применение по любому из пп.1-10, где IFN или его функциональный фрагмент слит с тяжелой цепью агонистического антитела против CD40 или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, предпочтительно с C-концом.
13. Применение по любому из предыдущих пунктов, где агонистическое антитело против CD40 или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и IFN или его функциональный фрагмент слиты друг с другом через линкер, и где линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 26.
14. Применение по любому из предыдущих пунктов, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащее одну из комбинаций последовательностей, раскрытых в табл. 9, конкретно в табл. 9A или табл. 9B, более конкретно в табл. 9A.

15. Применение по любому из пп.1-9 или 12-14, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащий последовательность SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 3.

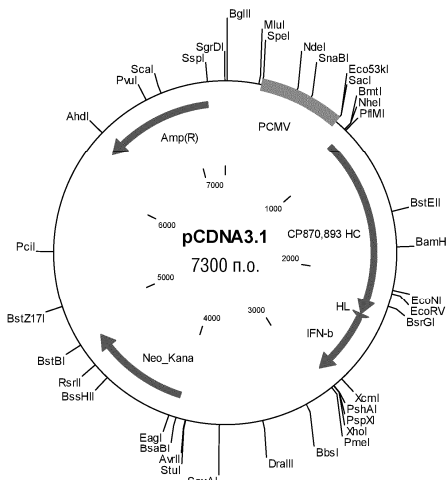
16. Применение по любому из пп.1-9 или 12-14, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антитело против CD40 или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащий последовательность SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 3.

17. Применение по любому из предыдущих пунктов, где применение включает введение интерферон-ассоциированного антигенсвязывающего белка пациенту, нуждающемуся в этом, посредством генетической доставки с использованием последовательностей РНК или ДНК, кодирующих интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок, или с использованием вектора или векторной системы, кодирующих интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок.

18. Применение по любому из предыдущих пунктов, где интерферон-ассоциированный антигенсвязывающий белок содержится в фармацевтической композиции.

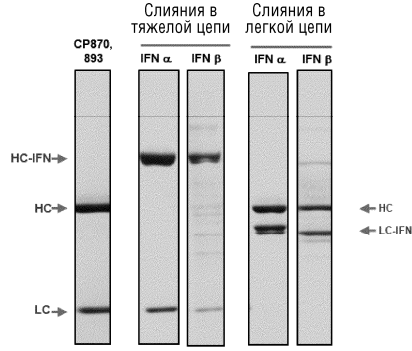


Фиг. 1

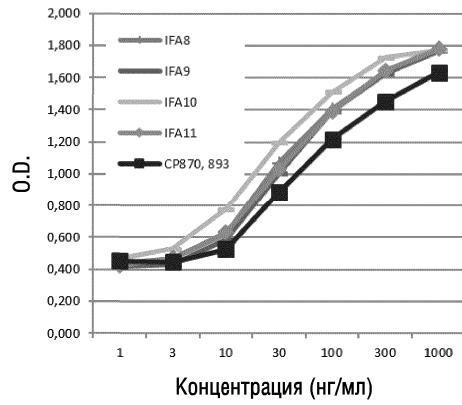


**Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SEQ ID NO: 32**  
 ATGGGCTGGTCTGCATCTCTGTTTCTGGTGCCACAGCCACAGGCGTGCATCTCAGGTTCACTGTTGTTGCTGGCCGCA  
 AGTGAAGAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGCTCTGTAAGCAGCGGCTACACCTTTACCGGCTACTACATGCACTGGGTCGG  
 ACAGGCTCCAGGACAGGACTTGAAGTGGATGGGTGATCAATCTGACAGCGCGGCCAACAATACGCCAGAAATCCAGG  
 GCAGAGTGACCATGACCCAGAGACACCATCAGCAGCCGCTACATGGAAGTGAACCGGCTGAGATCCGACGACACCCGCTGT  
 ACTATTGCGCCAGAGATCAGCCTCTGGCTACTGACAAATGGCGTGTGACGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACATGG  
 TTACAGTGTCTAGCGCCTTACAAGGGCCCTCCGTTTTCTCTGGCTGTTCTGTAAGAACCCAGCGAGTCTACAGCCGCTC  
 TGGGCTGTCTGTCAGGAAGTACTTCTGAGCCCTGTGACCGTGTCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCCGGCGTGCACACAT  
 TCCAGCTGTCTGTCAGAGCAGCGGCTGTACTCTGTCTAGCCTGTGTCACCGTGCCTAGCAGCAATTCGGCACCCAGACCTAC  
 ACCTGTAACGCTGGACCAAGCCTAGCAACCAAGGTGGACAAGCCGTTGGAACGGAAAGTGTGCTGGAAATGCCCTCTGT  
 CCTGCTCCTCAGTGGCCGACCTTCCGTGTTCTTCCCTCAAAGCTAAGGACACCTTGATGATCAGCAGAACCCTGAAAT  
 GACCTGCGTGGTGGTGTGTGTCTCACGAGGATCCGAGGTGCAGTTCATTTGATGACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAAG  
 CCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTCAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCATCAGGACTGGCTGA  
 ACGGCAAGAGTACAAAGTGAAGGTGTCAACAGGGCCTGCTGCTCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGACCAAGGCCAGC  
 CTCCGGACGCTCAGGTTTACACACTGCTCAAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTTCCCTGACCTGCTGTGAAGG  
 GCTTCTACCTTCCGATATCGCGTGGAAATGGAGAGCAATGGCCAGCTGAGAACAACCAAGACACACCTCTATGCTGGA  
 CAGCGACGGCTATCTCTCTGACAGCAAGCTGACAGTGCAGAAATGACAGTGGCAGAGGGCAACGTTTCAGCTGTTCTGT  
 GATGACAGGGCCCTGCACAAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGTCTGAGCCCTGGCCTGAAAGCGCTGTAAAGAGCTGCG  
 CCAAGGCTATGAGTACAACCTGCTGGGTTTCTGACGCGGAGCAGCAACTCCAGTGCCAGAAACTGCTGTGGCAGCTGAA  
 TGGCCCGCTGGAAATCTGCTGAAAGCCGGATGAACCTCGACATCCCGAGGAAATCAAGACCTGCAGCAGTTCAGAAA  
 GGAGACCGCTCTGACCATCAGCAGATGCTGCAGAACATCTTCGCTCATCTCCGACAGGATAGCAGCAGCACCGATGGAA  
 CGAGACAATCTGGAAATCTGCTGGCAACGTTGACCAACAGATCAACCACTGAAACCGTGTGGAAAGAGAGCTGGAA  
 AAAGAGACTTCAACCGGGCAAGCTGATGAGCAGCTGACACTGAAAGCGTACTACGGCAGAACTCTGCACTACCTCAAGG  
 CCAAGAGTATAGCCACTGCGCTGGACCATGTGCGGTGGAAATCTGCGGAACTTCTACTCATCAACAGACTGACCGGCT  
 ACCTGGCAACTGA

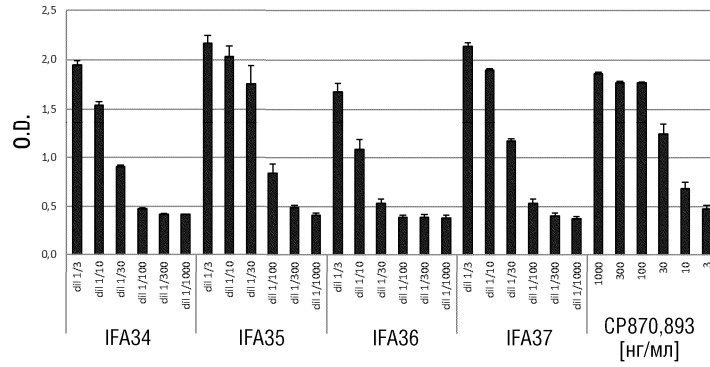
Фиг. 2A



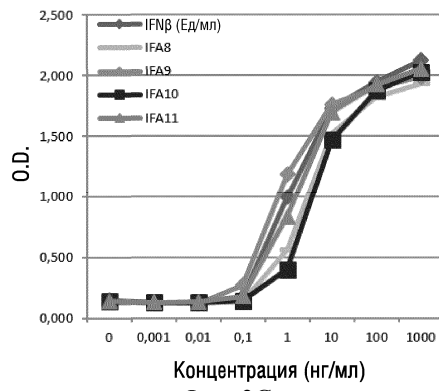
Фиг. 2В



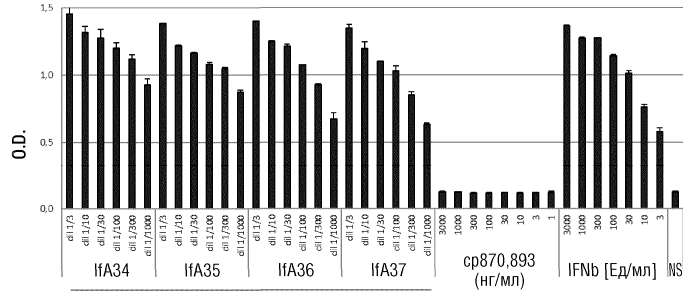
Фиг. 3А



Фиг. 3В

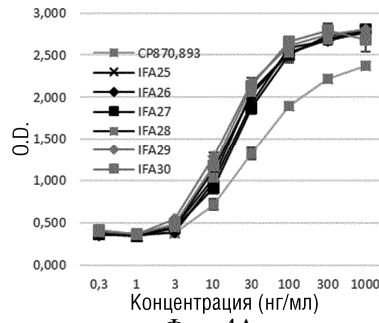


Фиг. 3С

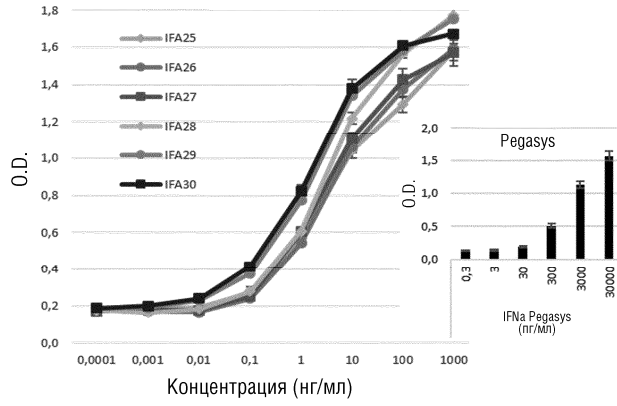


Супернатанты из трансфицированных клеток НЕК

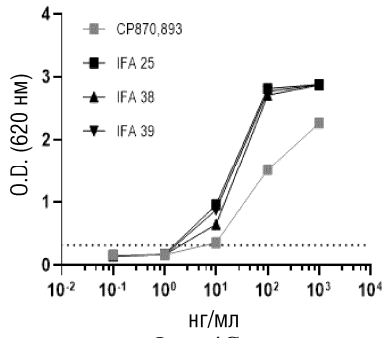
Фиг. 3D



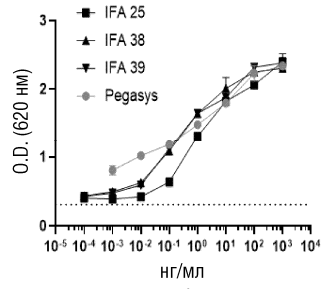
Фиг. 4А



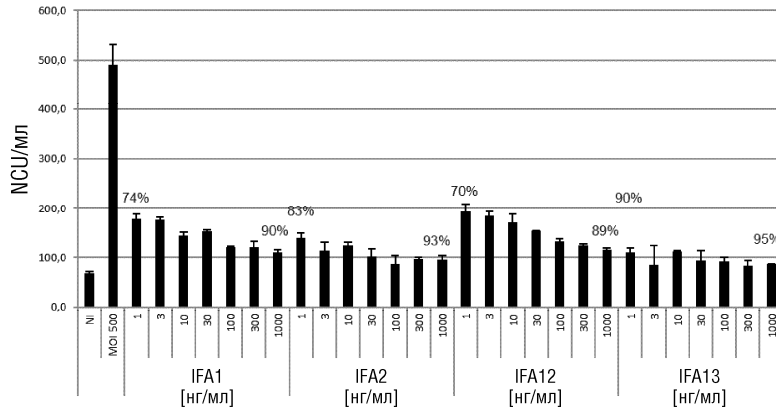
Фиг. 4В



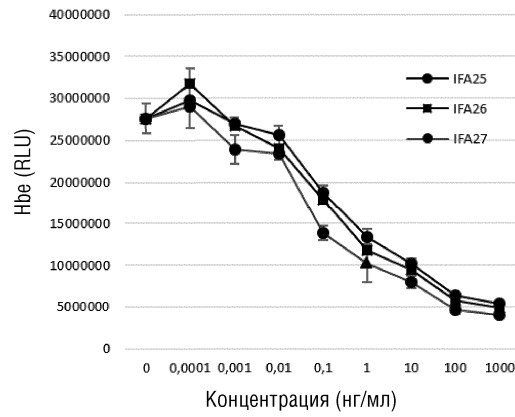
Фиг. 4С



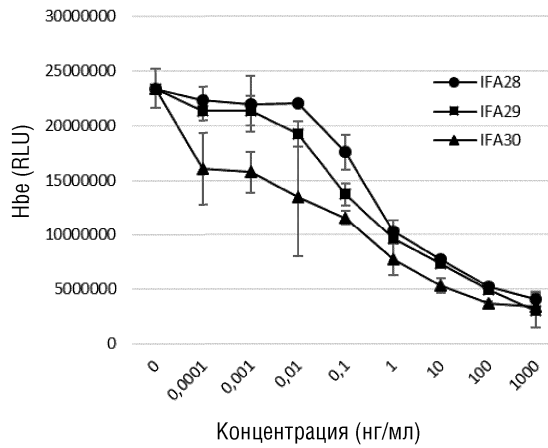
Фиг. 4D



Фиг. 5

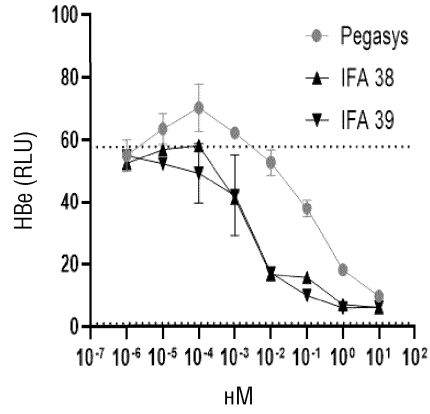


Фиг. 6A

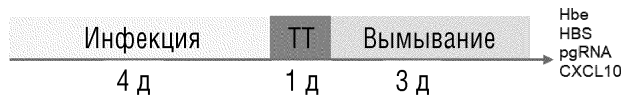


Фиг. 6B

046818

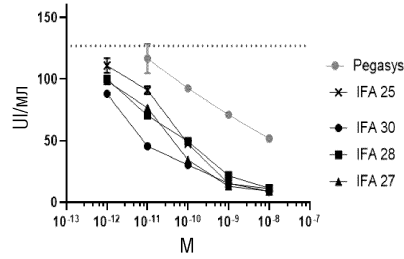


Фиг. 6С



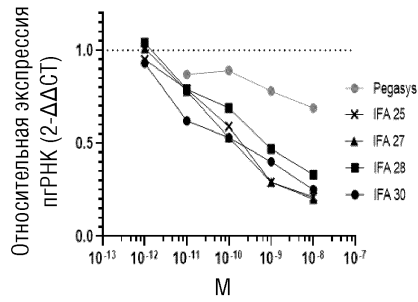
Фиг. 6D

Высвобождение HBeAg



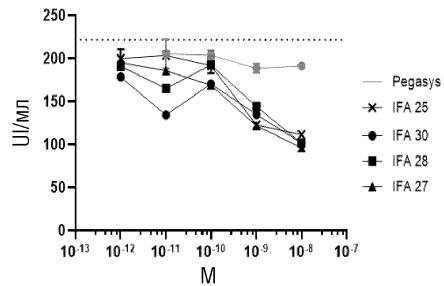
Фиг. 6Е

пгРНК

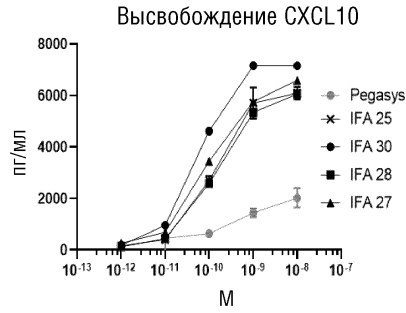


Фиг. 6G

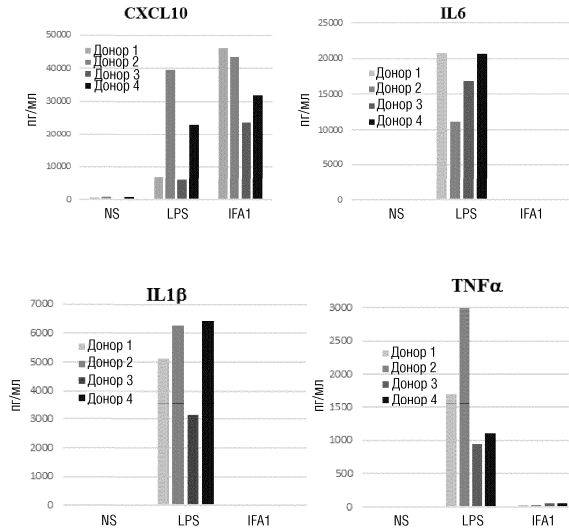
Высвобождение HBsAg



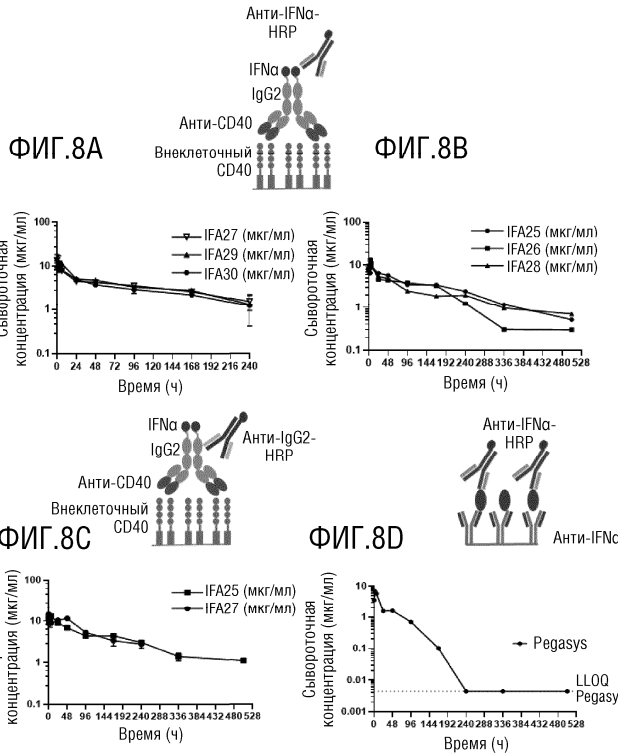
Фиг. 6F



Фиг. 6H

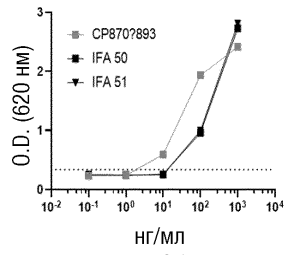


Фиг. 7

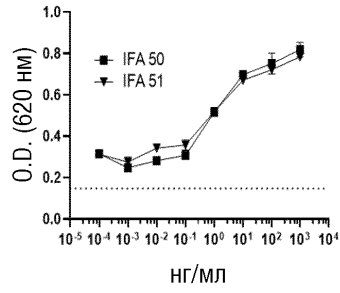


Фиг. 8

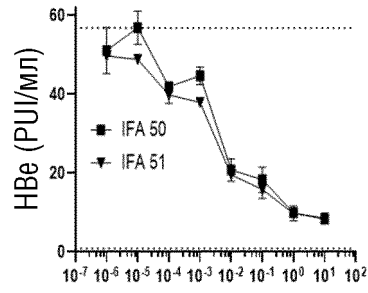
046818



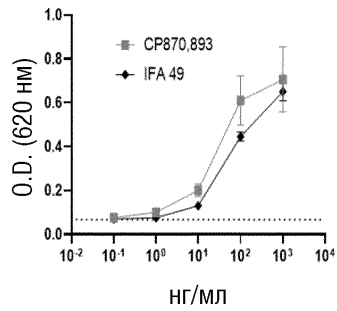
Фиг. 9А



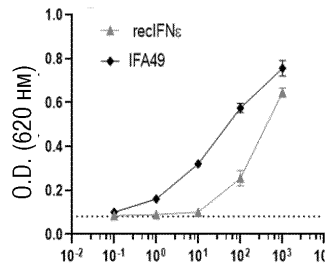
Фиг. 9В



Фиг. 9С



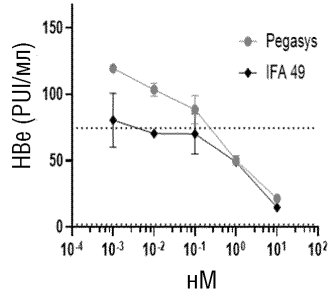
Фиг. 10А



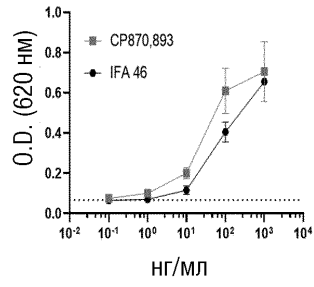
Фиг. 10В



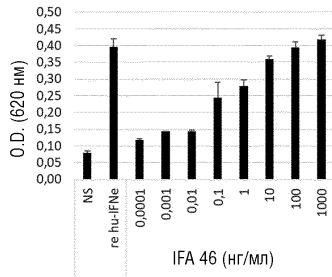
046818



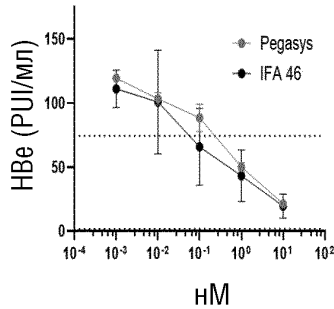
Фиг. 10С



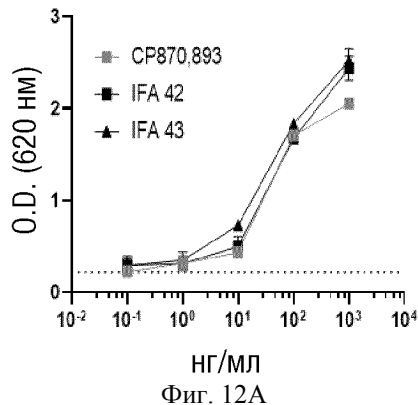
Фиг. 11А



Фиг. 11В

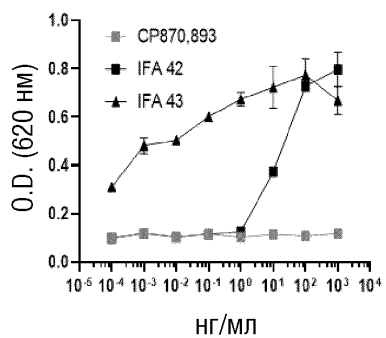


Фиг. 11С

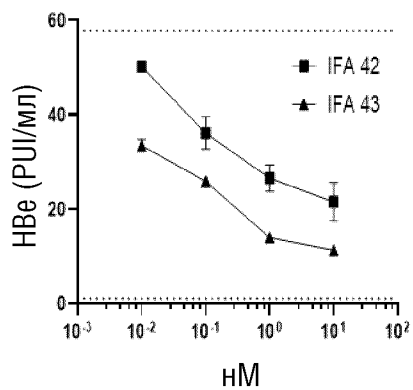


Фиг. 12А

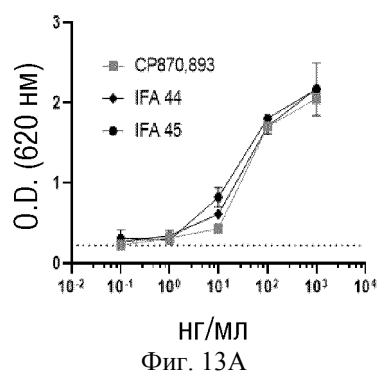
046818



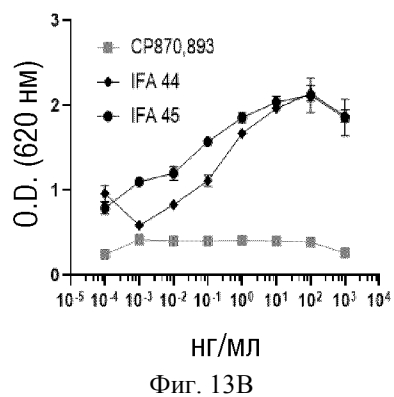
Фиг. 12В



Фиг. 12С

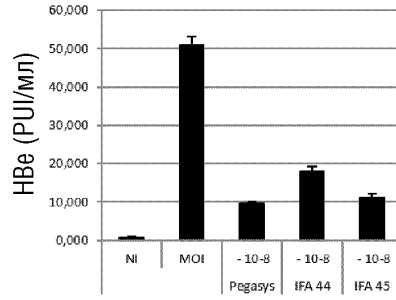


Фиг. 13А

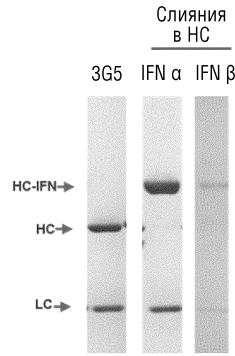


Фиг. 13В

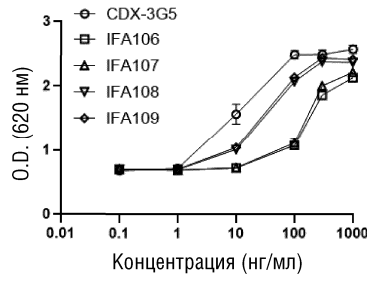
046818



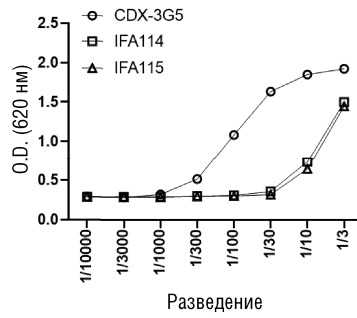
Фиг. 13С



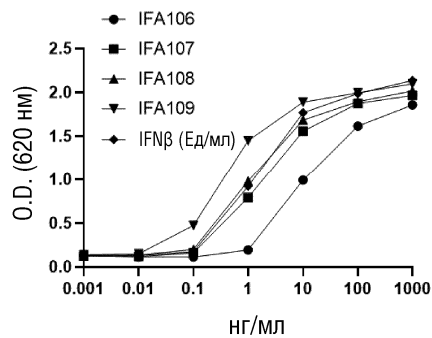
Фиг. 14



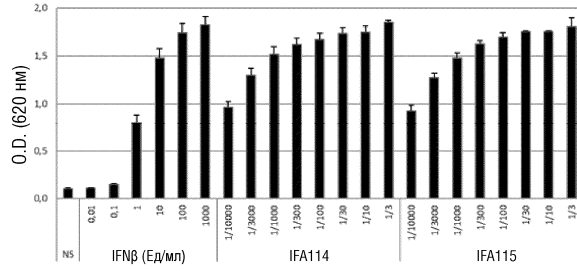
Фиг. 15А



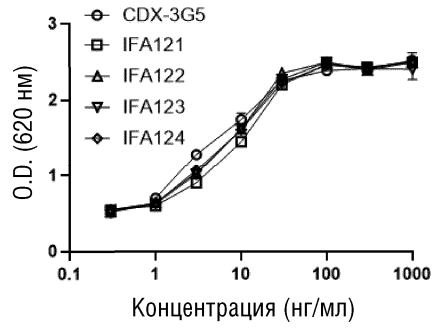
Фиг. 15В



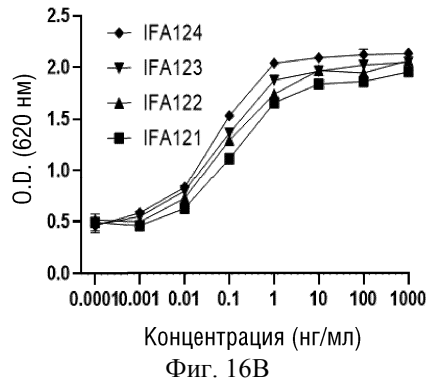
Фиг. 15С



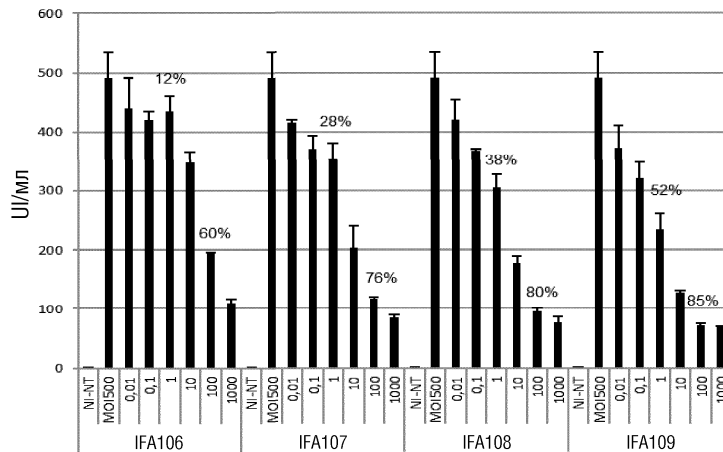
Фиг. 15D



Фиг. 16А

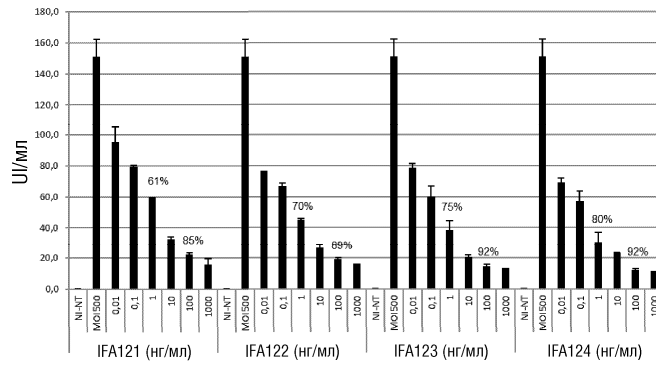


Фиг. 16В

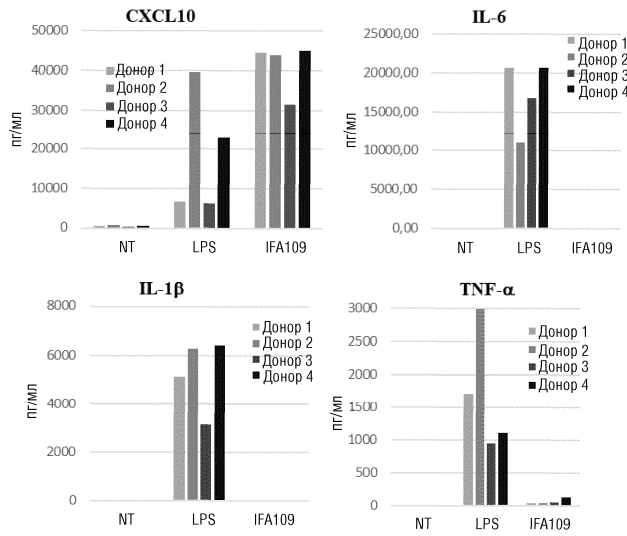


Фиг. 17А

046818



Фиг. 17B



Фиг. 18



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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