

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202393144** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2024.02.23**

(51) Int. Cl. *A61P 31/14* (2006.01)  
*C07K 14/555* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2022.06.08**

---

(54) **АССОЦИИРОВАННЫЕ С ИНТЕРФЕРОНОМ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ  
ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ИЛИ ПРОФИЛАКТИКЕ КОРОНАВИРУСНОЙ  
ИНФЕКЦИИ**

---

(31) **21305786.2**

(32) **2021.06.09**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2022/065610**

(87) **WO 2022/258720 2022.12.15**

(71) Заявитель:

**ЕВОТЕК ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ  
ГМБХ (DE); САНОФИ (FR)**

(72) Изобретатель:

**Картер Кара (US), Невё Грегори  
Кевин Жан-Рене, Дажон Марьон  
Рашель Франс, Марнике Ксавье,  
Алам Антуан (FR)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к способам лечения или профилактики коронавирусной инфекции у субъекта путем введения комбинации агониста суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF) и интерферона (IFN), например IFN-ассоциированного антигенсвязывающего белка, такого как слитое с IFN антитело, или путем введения кодирующих их нуклеиновых кислот и векторов экспрессии. Настоящее изобретение также относится к применению соответствующих фармацевтических композиций для лечения коронавирусной инфекции.

**A1**

**202393144**

**202393144**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579890EA/023

### АССОЦИИРОВАННЫЕ С ИНТЕРФЕРОНОМ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ИЛИ ПРОФИЛАКТИКЕ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение относится к способам лечения или профилактики коронавирусной инфекции у субъекта. Настоящее изобретение также относится к новым ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белкам, а также нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим такие ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки, для применения в терапии, более конкретно для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции. Такие белки включают слитые с интерфероном антитела или их слитые с интерфероном антигенсвязывающие фрагменты, которые также называются в настоящем описании «IFA». Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим такие ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки или нуклеиновые кислоты или векторы экспрессии, для применения в терапии, более конкретно, для применения при лечении коронавирусной инфекции. Настоящее изобретение также относится к способам лечения с использованием таких ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белков или нуклеиновых кислот, векторов экспрессии или фармацевтических композиций. Указанные новые ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки дают полезные улучшения по сравнению с текущим уровнем техники, например, заключающиеся в том, что они способны эффективно спасать клетки от гибели, индуцированной коронавирусом, и/или от цитопатического эффекта, индуцированного коронавирусом.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Продолжающаяся глобальная пандемия коронавирусного заболевания 2019 года (COVID-19) вызвана коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2; также известным как 2019-nCoV или HCoV-19). Вместе с SARS-CoV-1, выявленным в 2003 году, и коронавирусом ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), выявленным в 2012 году, SARS-CoV-2 принадлежит к роду  $\beta$ -коронавирусов семейства Coronaviridae (Zhu et al., N Engl J Med 382(8):727-733 (2020); Jiang et al., Emerg. Microbes Infect. 9, 275-277 (2020); Jiang et al., Lancet 395, 949 (2020); Zhou et al., Nature 579, 270-273 (2020); Zhu et al., N. Engl. J. Med. 382, 727-733 (2020)). SARS-CoV-2 представляет собой оболочечный вирус, содержащий геном положительной смысловой одноцепочечной РНК размером ~30 т.п.н., который кодирует 16 неструктурных белков (nsr1-16), 4 структурных белка [шиповидный (S), оболочечный (E), мембранный (M) и нуклеокапсидный (N)] и 8 вспомогательных белков (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b и ORF10). Белки nsr отвечают за репликацию вируса, структурные белки - за образование вирионов, а вспомогательные белки облегчают

вирусную инфекцию, но не важны для репликации вируса (Yoshimoto, *The Protein Journal* 39, 198-216 (2020)).

[0003] Быстрое распространение SARS-CoV-2 по всему миру связано с многочисленными мутациями, которые изменяют приспособленность вируса. Мутации зарегистрированы во всех четырех структурных белках, кодируемых вирусным геномом. Наиболее заметные мутации наблюдаются в шиповидном белке, который опосредует проникновение вируса в клетки путем взаимодействия с рецептором ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2) (Cai et al., *Science* 369:1586-92 (2020); Walls et al., *Cell* 181:281-92 (2020); Lan et al., *Nature* 581:215-20 (2020); Benton et al., *Nature* 588:327-30 (2020)). Мутации, возникающие в рецептор-связывающем домене (RBD) шиповидного белка, представляют особый интерес, учитывая их высокий потенциал изменения кинетических параметров и силы взаимодействия вируса с клетками-мишенями. Эти мутации также могут влиять на связывание антител, способных связывать и блокировать взаимодействие вируса с ACE2. Новые варианты SARS-CoV-2, несущие несколько мутаций в шиповидном белке, были зарегистрированы в декабре 2020 года в Великобритании (SARS-CoV-2 VOC202012/01) и Южной Африке (501Y.V2) (Всемирная организация здравоохранения. Женева: Всемирная организация здравоохранения (2020), Lauring et al., *JAMA* 325(6):529-31 (2021)). Ранние эпидемиологические и клинические данные показали, что эти варианты демонстрируют повышенную контагиозность среди населения (Davies et al., *Estimated transmissibility and severity of novel SARS-CoV-2 Variant of Concern 202012/01 in England*. medRxiv. 2021 Feb 7).

[0004] Интерфероны являются одними из первых цитокинов, активация которых происходит в инфицированных вирусом клетках и которые являются ключевыми компонентами врожденной иммунной системы хозяина, ответственными за элиминацию вируса на ранней стадии инфекции. SARS-CoV-2 развил множество стратегий для предотвращения высвобождения интерферонов и, таким образом, ускользания от врожденного иммунного ответа и облегчения репликации, распространения и патогенеза вируса (Xia and Shi, *Journal of Interferon & Cytokine Research* Volume 40, Number 12 (2020)). Было показано, что несколько неструктурных белков SARS-CoV-2, включая nsp1, nsp3, nsp6, nsp13, nsp14 и nsp15, блокируют путь интерферона. Имеется несколько разных сообщений о том, что nsp1 SARS-CoV-2 является мощным антагонистом IFN-I, который существенно, более чем на 95%, снижает экспрессию IFN-I и ISG (Lei et al., *Nat Commun* 11(1) (2020):3810; Xia et al. *Cell Rep* 33(1):108234 (2020), Yuen et al., *Emerg Microbes Infect* 9(1):1418-1428 (2020)).

[0005] Nsp3 SARS-CoV-2, известный как папаин-подобная протеаза (PLpro), ограничивает продуцирование IFN-I за счет прямого расщепления IRF3 или за счет расщепления убиквитиноподобного белка ISG15 и уменьшения фосфорилированного IRF3, что приводит к снижению активации IRF3 и продуцирования IFN-I (Shin et al., *Nature* 587(7835):657-662 (2020); Moustaqil et al., *Emerg Microbes Infect* 10(1):178-195(2021)).

[0006] Nsp6 снижает фосфорилирование STAT1 и STAT2 во время передачи сигнала IFN-I. Примечательно, что nsp6 SARS-CoV-2 демонстрирует более эффективное подавление RIG-I-индуцируемого продуцирования IFN-I и IFN-I-стимулируемого продуцирования ISG, чем nsp6 SARS-CoV и MERS-CoV, что обеспечивает более высокую репликацию вируса в системе IFN-I-стимулируемого транзистентного репликаона (Xia et al., Cell Rep 33(1):108234. (2020)).

[0007] Хеликаза nsp13 оказывает сильное ингибирующее действие на продуцирование и передачу сигналов IFN-I. Nsp13 связывается с TBK1, что приводит к снижению фосфорилирования TBK1 и инактивации IRF3. Кроме того, было определено, что nsp13 является мощным антагонистом передачи сигналов IFN-I за счет ингибирования активации STAT1 и STAT2, что приводит к удержанию STAT1 в цитоплазме и нарушению стимуляции промотора ISRE (Lei et al., Nat Commun 11(1):3810. (2020); Xia et al. Cell Rep 33(1):108234 (2020); Yuen et al., Emerg Microbes Infect 9(1):1418-1428 (2020)).

[0008] Наиболее распространенными симптомами заражения SARS-CoV-2 на начальном этапе являются лихорадка, сухой кашель и усталость. Более тяжелая инфекция нижних дыхательных путей может привести к более серьезным симптомам, таким как затруднение дыхания или одышка, а также боль или давление в груди. На этом этапе может потребоваться госпитализация пациентов, а в случае снижения уровня насыщения крови кислородом, для облегчения симптомов им потребуется дополнительный кислород или аппарат искусственной вентиляции легких. За этим может последовать системное воспаление и серьезные заболевания или смерть.

[0009] Необходимы новые способы лечения и профилактики коронавирусной инфекции, в частности инфекции SARS-CoV-2. В частности, необходимы способы спасения клеток от гибели, индуцированной коронавирусом, и от цитопатического эффекта, индуцированного коронавирусом, в частности от гибели, индуцированной SARS-CoV-2, и от цитопатического эффекта, индуцированного SARS-CoV-2.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] В одном из аспектов изобретение относится к агонисту суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF) или его функциональному фрагменту для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции, где агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент вводят в комбинации с интерфероном (IFN) или его функциональным фрагментом.

[0011] В другом аспекте изобретение дополнительно относится к интерферону (IFN) или его функциональному фрагменту для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции, где IFN или его функциональный фрагмент вводят в комбинации с агонистом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF) или его функциональным фрагментом.

[0012] В другом аспекте изобретение также относится к комбинации агониста суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF) или его функционального фрагмента с интерфероном (IFN) или его функциональным фрагментом для применения



при лечении или профилактике коронавирусной инфекции.

[0013] В другом аспекте изобретение относится к ассоциированному с интерфероном антигенсвязывающему белку, содержащему (I) агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и (II) интерферон (IFN) или его функциональный фрагмент для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции.

[0014] Согласно любому из этих аспектов изобретения агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент может содержать (a) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO 56, CDRH2, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO 57, и CDRH3, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO 58; и (b) легкую цепь или ее фрагмент, содержащую CDRL1, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO 52, CDRL2, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO 53, и CDRL3, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO 54. Альтернативно, агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент может содержать (a) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, идентичную SEQ ID NO: 56, CDRH2, идентичную SEQ ID NO 57, и CDRH3, идентичную SEQ ID NO 58; и (b) легкую цепь или ее фрагмент, содержащую CDRL1, идентичную SEQ ID NO 52, CDRL2, идентичную SEQ ID NO 53, и CDRL3, идентичную SEQ ID NO 54.

[0015] Согласно одному из вариантов осуществления агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO 51, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; и/или вариабельную область тяжелой цепи VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO 55, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

[0016] Согласно другому варианту осуществления агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO 3, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 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 на по меньшей мере 90%.

[0017] Согласно дополнительному варианту 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 функциональных фрагментов. Предпочтительно, IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$  или IFN $\beta$ , или их функциональные фрагменты.

[0018] Согласно другому варианту осуществления, IFN или его функциональный

фрагмент представляет собой IFN $\alpha$ 2a или его функциональный фрагмент. Согласно предпочтительному варианту осуществления IFN $\alpha$ 2a содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 17, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

[0019] Согласно другому варианту осуществления, IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\beta$  или его функциональный фрагмент. В предпочтительном варианте осуществления IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

[0020] Согласно другому варианту осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с легкой цепью агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, предпочтительно с C-концом.

[0021] Согласно дополнительному варианту осуществления, IFN или его функциональный фрагмент слит с тяжелой цепью агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, предпочтительно с C-концом.

[0022] Согласно другому варианту осуществления агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и IFN или его функциональный фрагмент слиты друг с другом посредством линкера. В предпочтительном варианте осуществления линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25 или SEQ ID NO 26.

[0023] Согласно другому варианту осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие одну из комбинаций последовательностей, представленных в таблице 9, в частности таблице 9A или таблице 9B, более конкретно таблице 9A.

[0024] Согласно другому варианту осуществления применение включает введение ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка нуждающемуся в этом субъекту посредством генетической доставки последовательностей РНК или ДНК, кодирующих ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, или вектора или векторной системы, кодирующих ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок.

[0025] Согласно еще одному варианту осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержится в фармацевтической композиции.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ**

[0026] На Фиг. 1 представлены схематические изображения примеров форматов ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белков. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антигенсвязывающее анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном

агонистический антигенсвязывающий фрагмент. IFN ассоциированы посредством линкеров с разными положениями на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте: с N-концевой или C-концевой частью легкой цепи (LC) или тяжелой цепи (HC). В частности, IFN выбирают из семейств интерферонов типа I, типа II и типа III.

[0027] На фиг. 2А представлен пример карты плазмиды рсDNA3.1, кодирующей SEQ ID NO 32, под контролем промотора рCMV. Внизу также представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SEQ ID NO 32 (= SEQ ID NO 78). *Курсив*: последовательность сигнального пептида; **черный цвет**: последовательность, кодирующая тяжелую цепь CP870,893; подчеркнуто: последовательность, кодирующая линкер HL; **жирный шрифт**: последовательность, кодирующая IFN $\beta$ .

[0028] На фиг. 2В показаны примеры SDS PAGE в редуцирующих условиях некоторых IFA, где IFN $\alpha$  или IFN $\beta$  слиты либо с тяжелой цепью, либо с легкой цепью. Слева также показана миграция родительского CP870,893.

[0029] На фиг. 3А-3В графически изображено дозозависимое влияние нескольких молекул IFA, слитых с IFN $\beta$ , на активацию CD40-опосредованного пути NF $\kappa$ B в репортерном анализе в клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L. На фиг. 3А показаны примеры активности анти-CD40 IFA с IFN $\beta$ , слитым с C-концевой частью тяжелой цепи (HC). На фиг. 3В показаны примеры активности анти-CD40 IFA с IFN $\beta$ , слитым с N-концевой частью LC (IFA34) или HC (IFA36), и соответствующих продуктов слияния с C-концевой частью (IFA35 и IFA37). Выход последней группы IFA после очистки был очень низким, поэтому для тестирования их активности использовали супернатанты трансфицированных клеток HEK, которые серийно разводили для оценки активности анти-CD40 антител в клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L.

[0030] На Фиг. 3С-3D графически изображено дозозависимое влияние нескольких молекул IFA, слитых с IFN $\beta$ , на активацию пути IFN-типа I в репортерных клетках HEK-Blue-IFN- $\alpha/\beta$ . На фиг. 3С показаны примеры активности IFN у IFA с IFN $\beta$ , слитым с C-концевой частью HC. На фиг. 3D показаны примеры активности IFN у IFA с IFN $\beta$ , слитым с N-концевой частью LC (IFA34) или HC (IFA36), и соответствующих продуктов слияния с C-концевой частью (IFA35 и IFA37). Для оценки активности IFN использовали те же супернатанты трансфицированных клеток HEK, что и на фиг. 3В, которые серийно разбавляли. Родительское антитело CP870,893 использовали в качестве отрицательного контроля, а рекомбинантный человеческий IFN $\beta$  использовали в качестве положительного контроля. NS: Не стимулированный.

[0031] На фиг. 4А графически показано влияние дозы нескольких молекул IFA, слитых с IFN $\alpha$ , на активацию CD40-опосредованного пути NF $\kappa$ B в репортерном анализе в клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L.

[0032] На фиг. 4В графически показано влияние дозы нескольких молекул IFA, слитых с IFN $\alpha$ , на активацию пути, опосредованного IFN типа I, в репортерных клетках HEK-Blue-IFN- $\alpha/\beta$ . Активность препарата Пегасис (Pegasys) показана во вставке в правом нижнем углу.

[0033] На фиг. 4С графически показано влияние молекул IFA, с IFN $\alpha$ , слитого посредством линкера HL с HC (IFA38) или LC (IFA39), на активацию CD40-опосредованного пути NF $\kappa$ B в репортерном анализе в клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L.

[0034] На фиг. 4D графически показано влияние IFA38 и IFA39 на активацию пути IFN типа I в репортерных клетках HEK-Blue-IFN $\alpha/\beta$ .

[0035] На фиг. 5A графически показано влияние антитела S309 на жизнеспособность клеток Vero E6 после заражения SARS-CoV-2 (изолят USA-WA1/2020). Для эксперимента по нейтрализации вирус предварительно инкубировали с антителом S309 в диапазоне доз в течение 1 часа при 37°C, и затем вирус/антитело добавляли к клеткам и инкубировали в течение 3 дней при 37°C. Жизнеспособность клеток оценивали через 72 часа после заражения с помощью анализа CellTiter Glo (CTG).

[0036] На Фиг. 5B графически показано влияние Ремдесивира на жизнеспособность клеток Vero E6 после заражения SARS-CoV-2 (изолят USA-WA1/2020). Для оценки Ремдесивира клетки инфицировали SARS-CoV-2 (MOI (множественность заражения): 0,05). Через час вирус удаляли и добавляли Ремдесивир в указанном диапазоне доз. Жизнеспособность клеток оценивали через 72 часа после заражения с помощью CellTiter Glo.

[0037] На фиг. 5C графически показана экспрессия CD40 на клетках Vero E6, оцененная с помощью проточной цитометрии.

[0038] Фиг. 5D-G графически показано влияние IFA27 по сравнению с таковым Ремдесивира (RDV) на жизнеспособность клеток Vero E6 после заражения SARS-CoV-2 (изолят USA-WA1/2020). На фиг. 5D графически показано влияние обработки IFA27 после заражения (последующая обработка). На фиг. 5E графически показано влияние обработки Ремдесивиром (RDV) после заражения (последующая обработка). На фиг. 5F графически показано влияние обработки IFA27 до заражения (предварительная обработка). На фиг. 5G графически показано влияние обработки Ремдесивиром (RDV) до заражения (предварительная обработка). Клетки инфицировали SARS-CoV-2 (MOI 0,05). В условиях последующей обработки через 1 час после заражения, вирус удаляли, клетки промывали и добавляли IFA27 или Ремдесивир в указанных концентрациях и выдерживали в течение 72 часов. В условиях предварительной обработки клетки Vero E6 обрабатывали IFA27 или Ремдесивиром в течение 1 часа. Затем клетки промывали и инфицировали SARS-CoV-2 (изолят USA-WA1/2020) в течение 72 часов. В обоих экспериментах жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня после заражения с помощью CellTiter-Glo.

[0039] На фиг. 5D.bis-G.bis графически показано влияние IFA25 по сравнению с таковым Ремдесивира (RDV) на жизнеспособность клеток Vero E6 после заражения SARS-CoV-2 (изолят USA-WA1/2020). На фиг. 5D.bis графически показано влияние обработки IFA25 после заражения (последующая обработка). На фиг. 5E.bis графически показано влияние обработки Ремдесивиром (RDV) после заражения (последующая обработка). На фиг. 5F.bis графически показано влияние обработки IFA25 до заражения (предварительная обработка). На фиг. 5G.bis графически показано влияние обработки

Ремдесивиром (RDV) до заражения (предварительная обработка). Клетки инфицировали SARS-CoV-2 (MOI 0,05). В условиях последующей обработки через 1 час после заражения, вирус удаляли, клетки промывали и добавляли IFA25 или Ремдесивир в указанных концентрациях и выдерживали в течение 72 часов. В условиях предварительной обработки клетки Vero E6 обрабатывали IFA25 или Ремдесивиром в течение 1 часа. Затем клетки промывали и инфицировали SARS-CoV-2 (изолят USA-WA1/2020, MOI 0,05) и хранили в течение 72 часов. В обоих экспериментах жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня после заражения с помощью CellTiter-Glo.

[0040] На фиг. 5H графически показано влияние IFA27 по сравнению с таковым родительского антитела (CP870,893) или контрольного IFA201 (без анти-CD40 агонистической активности) в условиях последующей обработки. Клетки Vero E6 инфицировали SARS-CoV-2 (изолят USA-WA1/2020; MOI 0,05). После одного часа заражения вирус удаляли, клетки промывали и добавляли свежую среду в присутствии указанного агента обработки в диапазоне доз и выдерживали в течение 72 часов. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью CTG-анализа.

[0041] На фиг. 5I графически показано влияние IFA25 по сравнению с таковым препарата Пегасис® или контрольного IFA202 (без анти-CD40 агонистической активности) в условиях последующей обработки. Клетки Vero E6 инфицировали SARS-CoV-2 (изолят USA-WA1/2020; MOI 0,05). После одного часа заражения вирус удаляли, клетки промывали и добавляли свежую среду в присутствии указанного агента обработки в диапазоне доз и выдерживали в течение 72 часов. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью CTG-анализа.

[0042] На фиг. 5I.bis графически показано влияние IFA25 отдельно или в комбинации с изотипом EVI5 (при той же нагрузке антител, что и в комбинации CP870,893 и IFA202) по сравнению с таковым антитела CP870,893 или контрольного IFA202 (без анти-CD40 агонистической активности) отдельно или в комбинации в условиях последующей обработки. Клетки Vero E6 инфицировали SARS-CoV-2 (изолят USA-WA1/2020; MOI 0,05). После одного часа заражения вирус удаляли, клетки промывали и добавляли свежую среду в присутствии указанного агента обработки в диапазоне доз и выдерживали в течение 72 часов. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью CTG-анализа.

[0043] Фиг. 5J-R графически показано влияние IFA25 на жизнеспособность клеток Vero E6 после заражения различными изолятами SARS-CoV-2. На фиг. 5J показано влияние после заражения изолятом USA-WA1/2020. На фиг. 5K показано влияние после заражения изолятом Germany/BavPat1/2020. На фиг. 5L показано влияние после заражения изолятом USA-CA\_CDC\_5574-2020. На фиг. 5M показано влияние после заражения изолятом hCoV-19\_England\_204820464\_2020. На фиг. 5N показано влияние после заражения изолятом South Africa/KRISP-EC-K005321/2020. На фиг. 5O показано влияние после заражения изолятом South Africa/KRISP-EC-K005325/2020. На фиг. 5P показано

влияние после заражения изолятом hCoV-19/Japan/TY7-503/2021 (вариант Gamma). На фиг. 5Q показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/PHC658/2021 (вариант Delta). На фиг. 5R показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/MD-NP20874/2021 (вариант Omicron). Клетки инфицировали SARS-CoV-2 при MOI 0,05 (кроме вариантов Gamma и Omicron - при MOI 0,5 и 0,1, соответственно). Через час вирус удаляли, клетки промывали и добавляли IFA25 в указанном диапазоне доз. Жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня после заражения с помощью анализа СТГ.

[0044] Фиг. 5S-U графически показано влияние IFA126 на жизнеспособность клеток Vero E6 после заражения различными изолятами SARS-CoV-2. На фиг. 5S показано влияние после заражения изолятом USA-WA1/2020 (MOI 0,05). На фиг. 5T показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/PHC658/2021 (вариант Delta, MOI 0,05). На фиг. 5U показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/MD-NP20874/2021 (вариант Omicron, MOI 0,1).

[0045] Фиг. 6A-C графически изображены результаты, касающиеся настроек для выполнения клеточного анализа в реальном времени с использованием системы xCELLigence после заражения клеток Vero E6 SARS-CoV-2. Клетки Vero E6 инфицировали SARS-CoV-2 (изолят USA-WA1/2020). Через час после заражения вирус удаляли, клетки промывали и добавляли свежую среду в присутствии указанного агента обработки. На фиг. 6A показан нормализованный клеточный индекс (CI) для лунок E-планшета, которые инокулировали отрицательным контролем (неинфицированным) или разными количествами бляшкообразующих единиц (БОЕ) SARS-CoV-2 в течение 75 часов. Горизонтальная линия обозначает точку, в которой CI упал до 50% от исходного значения. Время, необходимое для достижения этой точки, называется  $CI_{50}$ . На фиг. 6B показано влияние антитела S309 на цитопатический эффект, индуцированный SARS-CoV-2, в клетках Vero E6. Клетки инокулировали отрицательным контролем (неинфицированным), инфицированным контролем при MOI 0,025 или смесью вируса (MOI 0,025) с антителом S309 в концентрации 1 мкг/мл, которую предварительно инкубировали в течение 1 часа при 37°C. На фиг. 6C показано влияние Ремдесивира (RDV) на цитопатический эффект, индуцированный SARS-CoV-2, в клетках Vero E6. Клетки инокулировали отрицательным контролем (NI), инфицированным контролем при MOI 0,01 или возрастающими концентрациями Ремдесивира (RDV).

[0046] На фиг. 6D-6I графически показано влияние IFA25, препарата Пегасис® и контрольного IFA202 на жизнеспособность клеток Vero E6 после заражения SARS-CoV-2 (USA-WA1/2020). Клетки инфицировали SARS-CoV-2 (MOI 0,05). Через час вирус удаляли и добавляли IFA25 в указанном диапазоне доз. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью системы анализа клеток в реальном времени xCELLigence (RTCA).

[0047] На фиг.7 представлены результаты анализа высвобождения цитокинов *in vitro* из клеток цельной крови человека (лейкоцитов): пример данных, полученных после стимуляции лейкоцитов у 4 здоровых доноров-добровольцев. Лейкоциты оставляли

нестимулированными (NS), обрабатывали LPS (10 нг/мл) или IFA1 (1 мкг/мл) в течение 24 часов. Супернатанты собирали и выполняли количественную оценку высвобождения цитокинов с помощью набора MSD u-Plex для цитокинов человека. Результаты представляют собой среднее значение двух независимых стимуляций от каждого донора. Показан профиль CXCL10 (IP10), IL6, IL1 $\beta$  и TNF $\alpha$ .

[0048] Таблицы 11a-b: В этих таблицах суммированы данные, полученные после стимуляции *in vitro* клеток цельной крови (лейкоцитов), полученных от здоровых добровольцев. Каждый 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 часов. Супернатанты собирали и выполняли количественную оценку высвобождения цитокинов с помощью 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).

[0049] Фиг.8: Фармакокинетический профиль IFA25, IFA26, IFA27, IFA28, IFA29 и IFA30 после внутривенной болюсной инъекции 0,5 мг/кг (IFA) или 0,3 мг/кг (Пегасис) мышам. Данные выражали в виде среднего значения +/- стандартное отклонение в полулогарифмическом масштабе. Образцы собирали в течение 10 дней после введения. Анализ ELISA с использованием анти-IFN $\alpha$  в качестве вторичного антитела для метода количественного определения использовали для IFA27, IFA29 и IFA30 (фиг. 8A), а также для IFA25, IFA26 и IFA28 (фиг. 8B). Анализ ELISA с использованием анти-IgG2 в качестве вторичного антитела для метода количественного определения использовали для IFA25 и IFA27 (фиг. 8C). Фиг. 8D: Количественную оценку препарата Пегасис выполняли с использованием пар антител, соответствующих IFN $\alpha$  человека. Отмеченная линия (LLOQ) обозначает предел обнаружения для анализа препарата Пегасис.

[0050] Таблица 12A: Краткий фармакокинетический отчет: фармакокинетические параметры для CP870,893, IFA27, IFA29 и IFA30 после однократного внутривенного введения 0,5 мг/кг самцам мышей CD1 Swiss. ФК-параметры для CP870,893 исследовали в 7-дневном эксперименте, а параметры IFA27, IFA29 и IFA30 - в 10-дневных экспериментах (количественное определение IFA27 выполняли с помощью двух разных подходов ELISA).

[0051] Таблица 12B: Краткий фармакокинетический отчет: фармакологические параметры для CP870,893, Pegasys и для трех разных 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 Пегасис исследовали в 21-дневных экспериментах (количественное определение IFA25 выполняли с помощью двух разных подходов ELISA).

[0052] На фиг. 9A показана анти-CD40 агонистическая активность в зависимости от дозы IFA50 и IFA51 без области Fc по сравнению с активностью родительского анти-CD40 антитела в репортерных клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L. На фиг. 9B показана дозозависимая активность IFN $\alpha$  у IFA50 и IFA51 в репортерных клетках HEK-Blue<sup>TM</sup>

hIFN- $\alpha/\beta$ .

[0053] На фиг. 10А показана анти-CD40 агонистическая активность IFA49 в зависимости от дозы IFN $\epsilon$  по сравнению с таковой родительского анти-CD40 антитела в репортерных клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L. IFA49 соответствует продукту слияния IFN $\epsilon$  с HC через пептидный линкер. На фиг. 10В показана активность IFA49 в зависимости от дозы IFN на репортерных клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> hIFN- $\alpha/\beta$ , активированных интерферонами I типа.

[0054] На фиг. 10С-10Е графически показано влияние IFA49 на жизнеспособность клеток Vero E6 после инфицирования различными изолятами SARS-CoV-2. На фиг. 10С показано влияние после заражения изолятом USA-WA1/2020 (MOI 0,05). На фиг. 10D показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/PHC658/2021 (вариант Delta, MOI 0,05). На фиг. 10Е показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/MD-NP20874/2021 (вариант Omicron, MOI 0,1).

[0055] На фиг. 11А показана анти-CD40 агонистическая активность IFA46 в зависимости от дозы IFN $\omega$  по сравнению с таковой родительского анти-CD40 антитела в репортерных клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L. IFA46 соответствует продукту слияния IFN $\omega$  с LC через пептидный линкер. На фиг. 11В показана активность IFA46 в зависимости от дозы IFN на репортерных клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> hIFN- $\alpha/\beta$ , активированных интерферонами I типа.

[0056] На фиг. 11С-11Е графически показано влияние IFA46 на жизнеспособность клеток Vero E6 после инфицирования различными изолятами SARS-CoV-2. На фиг. 11С показано влияние после заражения изолятом USA-WA1/2020 (MOI 0,05). На фиг. 11D показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/PHC658/2021 (вариант Delta, MOI 0,05). На фиг. 11Е показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/MD-NP20874/2021 (вариант Omicron, MOI 0,1).

[0057] На фиг. 12А показана анти-CD40 агонистическая активность IFA (IFA42 и IFA43) в зависимости от дозы IFN $\gamma$  по сравнению с таковой родительского анти-CD40 антитела в репортерных клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L. IFA42 соответствует продукту слияния IFN $\gamma$  с LC через пептидный линкер, а IFA43 соответствует продукту слияния IFN $\gamma$  с HC через пептидный линкер. На фиг. 12В показаны активности IFA42 и IFA43 в зависимости от дозы IFN в репортерных клетках HEK-Blue-hIFN $\gamma$ .

[0058] На фиг. 12С-12Е графически показано влияние IFA42 на жизнеспособность клеток Vero E6 после инфицирования различными изолятами SARS-CoV-2. На фиг. 12С показано влияние после заражения изолятом USA-WA1/2020 (MOI 0,05). На фиг. 12D показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/PHC658/2021 (вариант Delta, MOI 0,05). На фиг. 12Е показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/MD-NP20874/2021 (вариант Omicron, MOI 0,1).

[0059] На фиг. 12F-12H графически показано влияние IFA43 на жизнеспособность клеток Vero E6 после инфицирования различными изолятами SARS-CoV-2. На фиг. 12F показано влияние после заражения изолятом USA-WA1/2020 (MOI 0,05). На фиг. 12G



показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/PHC658/2021 (вариант Delta, MOI 0,05). На фиг. 12Н показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/MD-NP20874/2021 (вариант Omicron, MOI 0,1).

[0060] На фиг. 13А показана анти-CD40 агонистическая активность IFA (IFA44 и IFA45) в зависимости от дозы IFN $\lambda$  по сравнению с таковой родительского анти-CD40 антитела в репортерных клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L. IFA44 соответствует продукту слияния IFN $\lambda$  с LC через пептидный линкер, и IFA45 соответствует продукту слияния IFN $\lambda$  с HC через пептидный линкер. На фиг. 13В показаны активности IFA44 и IFA45 в зависимости от дозы IFN в репортерных клетках HEK-Blue-hIFN $\lambda$ .

[0061] На фиг. 13С-13Е графически показано влияние IFA44 на жизнеспособность клеток Vero E6 после инфицирования различными изолятами SARS-CoV-2. На фиг. 13С показано влияние после заражения изолятом USA-WA1/2020 (MOI 0,05). На фиг. 13D показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/PHC658/2021 (вариант Delta, MOI 0,05). На фиг. 13Е показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/MD-NP20874/2021 (вариант Omicron, MOI 0,1).

[0062] На фиг. 13F-13H графически показано влияние IFA45 на жизнеспособность клеток Vero E6 после инфицирования различными изолятами SARS-CoV-2. На фиг. 13F показано влияние после заражения изолятом USA-WA1/2020 (MOI 0,05). На фиг. 13G показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/PHC658/2021 (вариант Delta, MOI 0,05). На фиг. 13H показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/MD-NP20874/2021 (штамм Omicron, MOI 0,1).

[0063] На фиг. 14 показаны примеры SDS PAGE в редуцирующих условиях некоторых IFA с IFN $\alpha$  или IFN $\beta$ , слитыми с тяжелой цепью анти-CD40 антитела 3G5. Слева также показана миграция родительского анти-CD40 антитела 3G5.

[0064] Фиг. 15А-В графически показано дозозависимое влияние нескольких молекул IFA на основе 3G5, слитых с IFN $\beta$ , на активацию CD40-опосредованного пути NF $\kappa$ B в репортерном анализе в клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L. Аналогично показано сравнение с родительским антителом 3G5 (обозначенным на этом графике как CDX-3G5). На фиг. 15А показаны примеры анти-CD40 активности IFA с IFN $\beta$ , слитым с С-концевой частью тяжелой цепи (HC). Выход IFA, с IFN $\beta$ , слитым с легкой цепью после очистки был очень низким, поэтому для тестирования их активности использовали супернатанты трансфицированных клеток HEK, которые серийно разводили для оценки анти-CD40 активности на клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L; пример активности показан на фиг. 15В, а супернатант, содержащий 3G5, использовали в качестве контроля.

[0065] На фиг. 15С-Д графически показано дозозависимое влияние нескольких молекул IFA, слитых с IFN $\beta$ , на активацию пути IFN типа I в репортерных клетках HEK-Blue-IFN- $\alpha/\beta$ . На фиг. 15С показаны примеры активности IFN у IFA с IFN $\beta$ , слитым с С-концевой частью HC. На фиг. 15D показана активность IFN у IFA с IFN $\beta$ , слитым с легкой цепью; уровень продуцирования 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.

[0066] На фиг. 16А графически показано влияние дозы четырех молекул IFA, слитых с IFN $\alpha$ , на активацию CD40-опосредованного пути NF $\kappa$ B в репортерном анализе в клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L. Аналогично показано сравнение с родительским антителом 3G5 (обозначенным на этом графике как CDX-3G5).

[0067] На фиг. 16В графически показано влияние дозы нескольких молекул IFA, слитых с IFN $\alpha$ , на активацию пути, опосредованного IFN типа I, в репортерных клетках HEK-Blue-IFN- $\alpha/\beta$ .

[0068] Фиг. 16С-Е графически показано влияние IFA125 (продукт слияния с IFN $\gamma$ ) на жизнеспособность клеток Vero E6 после заражения различными изолятами SARS-CoV-2. На фиг. 16С показано влияние после заражения изолятом USA-WA1/2020 (MOI 0,05). На фиг. 16D показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/PHC658/2021 (вариант Delta, MOI 0,05). На фиг. 16Е показано влияние после заражения изолятом hCoV-19/USA/MD-HP20874/2021 (вариант Omicron, MOI 0,1).

[0069] Фиг. 17: Анализ высвобождения цитокинов *in vitro* из клеток цельной крови человека (лейкоцитов): пример данных, полученных после стимуляции лейкоцитов от 4 здоровых доноров-добровольцев. Лейкоциты оставляли необработанными (NT), обрабатывали LPS (10 нг/мл) или IFA109 (1 мкг/мл) в течение 24 часов. Супернатанты собирали и выполняли количественную оценку высвобождения цитокинов с помощью набора MSD u-Plex для цитокинов человека. Результаты представляют собой среднее значение двух независимых стимуляций от каждого донора. Показан профиль CXCL10 (IP10), IL6, IL1 $\beta$  и TNF $\alpha$ .

[0070] Таблица 13: В этой таблице суммированы данные, полученные после стимуляции *in vitro* клеток цельной крови, полученных от здоровых добровольцев. IFA109 тестировали на лейкоцитах от четырех разных доноров. Лейкоциты оставляли необработанными (NT), обрабатывали LPS (10 нг/мл) или IFA109 (1 мкг/мл) в течение 24 часов. Супернатанты собирали и выполняли количественную оценку высвобождения цитокинов с помощью набора MSD u-Plex для цитокинов человека. Результаты представлены в виде средних значений двух независимых стимуляций от каждого донора и выражены в пг/мл (nd: не обнаружено).

[0071] Таблица 14: В этой таблице представлены значения LogAbsoluteEC<sub>50</sub> для IFA25 и Ремдесивира, оцененные для каждого изолята SARS-CoV-2. В экспериментах, представленных на фиг. 5J-5R, в которых оценивали влияние IFA25 на жизнеспособность клеток Vero E6, Ремдесивир тестировали в тех же условиях. Абсолютную EC<sub>50</sub> определяли в соответствии с Руководством по точной оценке EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> (Sebaugh J.L.; Guidelines for accurate EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> estimation. Pharmaceut. Statist. 2010; DOI: 10.1002/pst.426.), в виде концентрации, которая дает 50% ответ, определяемый как среднее значение 0% (в условиях неинфицированного CTR) и 100% (в условиях зараженного CTR). Таким образом, LogAbsoluteEC<sub>50</sub> оценивали с помощью программы PRISM, с использованием модели 4-PL методом обратного прогнозирования Y, равного 50% ответу

(50% контрольное среднее значение).

[0072] На фиг. 18 графически показана экспрессия CD40, IFNAR1 и IFNAR2 в первичных назальных и бронхиальных клетках человека, неинфицированных и инфицированных SARS-CoV-2. Экспрессию РНК CD40, IFNAR1 и IFNAR2 оценивали с помощью анализа ОТ-кПЦР. Для этой оценки 500 нг тотальной РНК, экстрагированной из первичных назальных и бронхиальных клеток человека (неинфицированных или инфицированных), сначала использовали в качестве матрицы для синтеза кДНК в соответствии с инструкциями производителя (кат. № 11754050), как подробно описано в примере VIII. Затем, используя карту массива рецепторов TLDA, выполняли количественную оценку для одновременной оценки уровня мРНК специфических рецепторов (подробно описанное в разделе «Метод» ThermoFisher Scientific). Для оценки потенциальных изменений уровней мРНК во всех 4 тестируемых условиях в анализ TLDA также была включена экспрессия мРНК конститутивных генов (GAPDH, GUSB, TBP и RPLP0). Каждый из 4 конститутивных генов имел одинаковый уровень экспрессии в назальных и бронхиальных клетках, инфицированных или неинфицированных, что позволило выполнить прямое сравнение Ct. (фиг. 18A). Целевую экспрессию CD40 и IFNAR подтверждали на уровне белка в неинфицированных клетках с помощью цитометрического анализа. Первичные назальные и бронхиальные клетки человека инкубировали с анти-hCD40-APC, анти-hIFNAR1-APC и анти-hIFNAR2-APC или с соответствующими изотипическими контролями. Клетки анализировали с помощью проточного цитометра MACSQuant16. Контрольные изотипы представлены в виде гистограмм, изображенных пунктирными линиями, а представляющие интерес маркеры - в виде сплошных серых гистограмм (фиг. 18B).

[0073] На фиг. 19 графически показано влияние обработки IFA27 (последующая обработка, применяемая через 1 час, 48 часов и 96 часов в 168-часовом кинетическом исследовании) на вирусную нагрузку SARS-CoV-2 в первичных назальных клетках человека, культивированных на границе раздела воздух-жидкость (ALI) (партия, MD0713) и инфицированных изолятом USA-WA1/2020. Клетки культивировали в культуральной среде MucilAir™ с момента получения и инфицировали в день 0 эксперимента изолятом USA-WA1/2020 при 0,1 MOI. Через 1 час инфицирования их промывали и заливали свежей средой, содержащей изотипический контроль IFA27 или EVI5, или обрабатывали Ремдесивиром, среду обновляли через 2 и 4 дня после заражения. Также использовали неинфицированные и инфицированные необработанные клетки. Окончательные промывки и сбор тканей выполняли через 7 дней после заражения. Вирусную нагрузку оценивали с помощью ОТ-кПЦР в конечной точке через 7 дней после заражения путем измерения копий РНК SARS-CoV-2 в назальных тканях (фиг. 19A) и смывах с апикальной поверхности назальных клеток (апикальный смыв) (фиг. 19B) после экстракции РНК, как описано в примере VIII. Патогенный вирус оценивали в апикальных смывах в конечной точке через 7 дней после заражения (фиг. 19C) с помощью анализа 50% инфекционной дозы для тканевой культуры (TCID<sub>50</sub>), как описано в примере VIII.

[0074] На фиг. 20 графически показано влияние обработки IFA27 (последующая обработка, применяемая через 1 час, 48 часов и 96 часов в 168-часовом кинетическом исследовании) на вирусную нагрузку SARS-CoV-2 в первичных бронхиальных клетках человека, культивированных на границе раздела воздух-жидкость (ALI) (партия, MD0713) и инфицированных изолятом USA-WA1/2020. Клетки культивировали в культуральной среде MucilAir™ с момента получения и инфицировали в день 0 эксперимента изолятом USA-WA1/2020 при 0,1 MOI. Через 1 час инфицирования клетки промывали и заливали свежей средой, содержащей изотипический контроль IFA27 или EVI5, или обрабатывали Ремдесивиром, среду обновляли через 2 и 4 дня после заражения. Также использовали неинфицированные и инфицированные необработанные клетки. Окончательные промывки и сбор тканей выполняли через 7 дней после заражения. Вирусную нагрузку оценивали с помощью ОТ-кПЦР в конечной точке через 7 дней после заражения путем измерения копий РНК SARS-CoV-2 в бронхиальной ткани (фиг. 20А) и смывах с апикальной поверхности бронхиальных клеток (апикальный смыв) (фиг. 20В) после экстракции РНК, как описано в примере VIII.

[0075] На фиг. 21 графически показано влияние обработки IFA25 (последующая обработка, применяемая через 1 час и 48 часов в 96-часовом 168-часовом кинетическом исследовании) на вирусную нагрузку SARS-CoV-2 в первичных назальных клетках человека, культивированных на границе раздела воздух-жидкость (ALI) (партия, MD0853) и инфицированных изолятом USA-WA1/2020. Клетки культивировали в культуральной среде MucilAir™ с момента получения и инфицировали в день 0 эксперимента изолятом USA-WA1/2020 при 0,1 MOI. Через 1 час инфицирования клетки промывали и заливали свежей средой, содержащей изотипический контроль IFA25 или EVI5, или обрабатывали Ремдесивиром, среду обновляли через 2 дня после заражения. Также использовали неинфицированные и инфицированные необработанные клетки. Вирусную нагрузку оценивали с помощью ОТ-кПЦР в конечной точке через 4 дня после заражения путем измерения копий РНК SARS-CoV-2 в назальных тканях (фиг. 21А) и апикальных смывах назальных клеток (фиг. 21В) после экстракции РНК, как описано в примере VIII. Инфекционный вирус оценивали в апикальных смывах в конечной точке через 4 дня после заражения (фиг. 21С) с помощью анализа 50% инфекционной дозы для культуры ткани (TCID<sub>50</sub>), как описано в примере VIII.

[0076] На фиг. 22 графически показано влияние предварительной обработки IFA25 на вирусную нагрузку SARS-CoV-2 в первичных назальных клетках человека, культивированных на границе раздела воздух-жидкость (ALI) (партия, MD0853) и инфицированных изолятом штамма USA-WA1/2020. Клетки культивировали в культуральной среде MucilAir™ с момента получения и обрабатывали за 3 часа до заражения контрольным изотипом IFA25 или EVI5, или Ремдесивиром. Также использовали неинфицированные и инфицированные необработанные клетки. После обработки выполняли заражение в течение 1 часа изолятом штамма USA-WA1/2020 при 0,1 MOI. Через 1 час после заражения собирали апикальные смывы назальных клеток и

добавляли свежую среду. Окончательную промывку и сбор тканей выполняли через 2 дня после заражения. Вирусную нагрузку оценивали с помощью ОТ-кПЦР в конечной точке, через 2 дня после заражения, путем измерения копий РНК SARS-CoV-2 в назальных тканях (фиг. 22А) и апикальных смывах назальных клеток (фиг. 22В) после экстракции РНК, как описано в примере VIII. Инфекционный вирус оценивали в апикальных смывах в конечной точке через 2 дня после заражения (фиг. 22С) с помощью анализа 50% инфекционной дозы для культуры ткани (TCID<sub>50</sub>), как описано в примере VIII.

[0077] На фиг. 23 графически показано влияние обработки IFA25 (последующая обработка, применяемая через 1 час и 48 часов в 96-часовой кинетике) на вирусную нагрузку SARS-CoV-2 в первичных бронхиальных клетках человека, культивированных на границе раздела воздух-жидкость (ALI) (партия, MD0868) и инфицированных изолятом USA-WA1/2020. Клетки культивировали в культуральной среде MucilAir™ с момента получения и инфицировали в день 0 эксперимента изолятом USA-WA1/2020 при 0,1 MOI. Через 1 час инфицирования клетки промывали и заливали свежей средой, содержащей изотипический контроль IFA25 или EVI5, или обрабатывали Ремдесивиром, среду обновляли через 2 дня после заражения. Также использовали неинфицированные и инфицированные необработанные клетки. Вирусную нагрузку оценивали с помощью ОТ-кПЦР в конечной точке через 4 дня после заражения путем измерения копий РНК SARS-CoV-2 в бронхиальной ткани (фиг. 23А) и апикальных смывах бронхиальных клеток (фиг. 23В) после экстракции РНК, как описано в примере VIII. Инфекционный вирус оценивали в апикальных смывах в конечной точке через 4 дня после заражения (фиг. 23С) с помощью анализа 50% инфекционной дозы для культуры ткани (TCID<sub>50</sub>), как описано в примере VIII.

[0078] На фиг. 24 графически показано влияние предварительной обработки IFA25 на вирусную нагрузку SARS-CoV-2 в первичных бронхиальных клетках человека, культивированных на границе раздела воздух-жидкость (ALI) (партия, MD0868) и инфицированных изолятом USA-WA1/2020. Клетки культивировали в культуральной среде MucilAir™ с момента получения и обрабатывали за 3 часа до заражения контрольным изотипом IFA25 или EVI5, или Ремдесивиром. Также использовали неинфицированные и инфицированные необработанные клетки. После обработки выполняли заражение в течение 1 часа изолятом USA-WA1/2020 при 0,1 MOI. Через 1 час после заражения собирали апикальные смывы и добавляли свежую среду. Окончательную промывку и сбор тканей выполняли через 2 дня после заражения. Вирусную нагрузку оценивали с помощью ОТ-кПЦР в конечной точке через 2 дня после заражения путем измерения копий РНК SARS-CoV-2 в бронхиальной ткани (фиг. 24А) и апикальных смывах бронхиальных клеток (фиг. 24В) после экстракции РНК, как описано в примере VIII.

[0079] «Жизнеспособность клеток (%)» и «Жизнеспособность (%)» используются в настоящем описании взаимозаменяемо.

[0080] Указанные выше и другие признаки и преимущества настоящего

изобретения будут более поняты из приведенного ниже подробного описания иллюстративных вариантов осуществления, со ссылкой на сопроводительные чертежи.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0081] Следует понимать, что любые определения и варианты осуществления, описанные и/или заявленные в настоящем описании, являются определениями и вариантами осуществления, применимыми ко всем аспектам, вариантам осуществления, признакам и объектам изобретения. Например, следует понимать, что представленные в настоящем описании идеи и пояснения, касающиеся подходящих способов или вариантов осуществления получения, составления и введения ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению или нуклеиновых кислот, кодирующих или экспрессирующих их, путей их введения, подходящих дозировок и схем введения, применяются соответственно к агонистам суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF) или их функциональным фрагментам, интерферонам (IFN) или их функциональным фрагментам, или нуклеиновым кислотам, кодирующим или экспрессирующим их, или их комбинациям, как описано или заявлено в настоящем описании.

[0082] Настоящее изобретение отчасти основано на открытии терапии, основанной на использовании «ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белков», их вариантов или производных, содержащих (I) агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и (II) интерферон (IFN) или его функциональный фрагмент, при терапии коронавируса. Указанные ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки спасают клетки от гибели, вызванной коронавирусом, и от вызванного коронавирусом цитопатического эффекта, усиливают путь IFN в неинфицированных и инфицированных клетках и даже могут оказывать синергетическое действие. Предлагается терапия коронавируса, включающая введение ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка в инфицированную коронавирусом клетку или инфицированному коронавирусом субъекту.

[0083] Изобретение может быть более понятным в свете выбранных терминов, определенных ниже.

[0084] В контексте настоящего описания член суперсемейства фактора некроза опухоли (лиганд) (или TNFSF) относится к белку, принадлежащему к лигандам суперсемейства белков, которые имеют общий характерный внеклеточный домен гомологии TNF (THD) (Bremer ISRN Oncology (2013), ID статьи 371854, 25 p., онлайн доступ: [dx.doi.org/10.1155/2013/371854](https://dx.doi.org/10.1155/2013/371854)). THD запускает образование нековалентных гомотримеров. Лиганды TNF обычно экспрессируются в виде трансмембранных белков типа II, но большинство из них может подвергаться протеолитическому процессингу в растворимые лиганды. Лиганды TNF реализуют свою биологическую функцию путем связывания и активации членов TNFRSF. TNFRSF обычно экспрессируются в виде тримерных трансмембранных белков типа I и содержат от одного до шести богатых цистеином доменов (CRD) во внеклеточном домене. Важной функцией суперсемейства

TNF является предоставление костимулирующих сигналов на различных этапах иммунного ответа. Некоторые лиганды обладают способностью связывать и активировать различные рецепторы (например, LT $\alpha$ , который связывает и активирует TNFRSF1A, TNFRSF1B и TNFRSF14, и LIGHT (TNFRSF14), который связывает и активирует TNFRSF3 и TNFRSF14). Примеры членов семейства генов TNFSF представлены ниже в Таблице А, полученной от Комитета по номенклатуре генов HUGO (HGNC) (см. Gray et al. *Nucleic Acids Res.* 43:D1079-1085 (2015); База данных HGNC, Комитет по номенклатуре генов HUGO (HGNC), EMBL Outstation - Hinxton, European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SD, UK [www.genenames.org](http://www.genenames.org)). Утвержденный символ обозначает символ HGNC, применяемый к конкретному гену, а утвержденное название соответствует полному названию гена. Предыдущие символы обозначают любой предыдущий символ, используемый HGNC, или относятся к конкретному гену. Синонимы относятся к альтернативным, синонимичным названиям конкретного гена.

Таблица А. Примеры членов семейства генов TNFSF

Утвержденный символ	Утвержденное название	Предыдущие символы	Синонимы
TNF	Фактор некроза опухоли	TNFA	TNFSF2, DIF, TNF $\alpha$
LTA	лимфотоксин альфа	TNFB	LT, TNFSF1
LTB	лимфотоксин бета	TNFC	TNFSF3, p33
TNFSF4	член 4 суперсемейства TNF	TXGP1	OX-40L, gp34, CD252
CD40LG	лиганд CD40	TNFSF5, HIGM1, IMD3	CD40L, TRAP, gp39, hCD40L, CD154
FASLG	лиганд Fas	TNFSF6, APT1LG1	FasL, CD178
CD70	молекула CD70	TNFSF7, CD27L	CD27L
TNFSF8	член 8 суперсемейства TNF		CD153
TNFSF9	член 9 суперсемейства TNF		4-1BB-L
TNFSF10	член 10 суперсемейства TNF		TRAIL, Apo-2L, TL2, CD253

TNFSF11	член 11 суперсемейства TNF		TRANCE, RANKL, OPGL, ODF, CD254
TNFSF12	член 12 суперсемейства TNF		TWEAK, DR3LG, APO3L
TNFSF13	член 13 суперсемейства TNF		APRIL, CD256
TNFSF13B	член 13B суперсемейства TNF	TNFSF20	BAFF, THANK, BLYS, TALL-1, TALL1, CD257
TNFSF14	член 14 суперсемейства TNF		LIGHT, LT $\gamma$ , HVEM-L, CD258
TNFSF15	член 15 суперсемейства TNF		TL1, VEGI, TL1A, VEGI192A, MGC129934, MGC129935
TNFSF18	член 18 суперсемейства TNF		AITRL, TL6, hGITRL
EDA	эктодисплазин А	ED1, EDA2, ODT1	EDA1, XLHED, HED, XHED, ED1-A1, ED1-A2, EDA-A1, EDA-A2

Таблица В. Примеры членов семейства генов TNFRSF

<b>Утвержденный символ</b>	<b>Утвержденное название</b>	<b>Предыдущие символы</b>	<b>Синонимы</b>
EDAR	рецептор эктодисплазина А	ED3, DL	ED5, EDA3, Edar, ED1R, EDA1R
TNFRSF1A	член 1А суперсемейства рецепторов TNF	TNFR1	TNF-R, TNFAR, TNFR60, TNF-R-I, CD120a, TNF-R55
TNFRSF1B	член 1В суперсемейства рецепторов TNF	TNFR2	TNFBR, TNFR80, TNF-R75, TNF-R-II, p75, CD120b
LBTR	рецептор лимфотоксина бета	D12S370	TNF-R-III, TNFCR, TNFRSF3, TNFR2-RP, TNFR-RP



TNFRSF4	член 4 суперсемейства рецепторов TNF	TXGP1L	ACT35, OX40, CD134
CD40	молекула CD40	TNFRSF5	p50, Bp50
FAS	Рецептор смерти Fas, расположенный на поверхности клеток	APT1, FAS1, TNFRSF6	CD95, APO-1
TNFRSF6b	член 6b суперсемейства рецепторов TNF		DcR3, DCR3, TR6, M68
CD27	молекула CD27	TNFRSF7	S152, Tp55
TNFRSF8	член 8 суперсемейства рецепторов TNF	CD30, D1S166E	KI-1
TNFRSF9	член 9 суперсемейства рецепторов TNF	ILA	CD137, 4-1BB
TNFRSF10a	член 10a суперсемейства рецепторов TNF		DR4, Apo2, TRAILR-1, CD261, TRAILR1
TNFRSF10b	член 10b суперсемейства рецепторов TNF		DR5, KILLER, TRICK2A, TRAILR-2, TRICKB, CD262, TRAILR2
TNFRSF10c	член 10c суперсемейства рецепторов TNF		DcR1, TRAILR3, LIT, TRID, CD263
TNFRSF10d	член 10d суперсемейства рецепторов TNF		DcR2, TRUNDD, TRAILR4, CD264
TNFRSF11a	член 11a суперсемейства рецепторов TNF	PDB2, LOH18CR1	RANK, CD265, FEO
TNFRSF11b	член 11b суперсемейства рецепторов TNF	OPG	OCIF, TR1
TNFRSF12A	член 12A суперсемейства		FN14, TweakR,

	рецепторов TNF		CD266
TNFRSF13B	член 13B суперсемейства рецепторов TNF		TACI, CD267, IGAD2
TNFRSF13C	член 13C суперсемейства рецепторов TNF		BAFFR, CD268
TNFRSF14	член 14 суперсемейства рецепторов TNF		HVEM, ATAR, TR2, LIGHTR, HVEA, CD270
NGFR	рецептор фактора роста нервов		TNFRSF16, p75NTR, CD271
TNFRSF17	член 17 суперсемейства рецепторов TNF	BCMA	BCM, CD269, TNFRSF13A
TNFRSF18	член 18 суперсемейства рецепторов TNF		AITR, GITR, CD357
TNFRSF19	член 19 суперсемейства рецепторов TNF		TAJ-альфа, TROY, TAJ, TRADE
RELT	RELT, рецептор TNF	TNFRSF19L	FLJ14993
TNFRSF21	член 21 суперсемейства рецепторов TNF		DR6, CD358
TNFRSF25	член 25 суперсемейства рецепторов TNF	TNFRSF12	DR3, TRAMP, WSL- 1, LARD, WSL-LR, DDR3, TR3, APO-3
EDA2R	рецептор эктодисплазина A2		XEDAR, EDAA2R, EDA-A2R, TNFRSF27

[0085] В настоящем описании «агонист TNFRSF» относится к соединению (например, белку, слитому белку, полипептиду, антителу, антигенсвязывающему фрагменту антитела или т.п.), которое активирует TNFRSF, например TNFRSF, указанный в таблице В. Таблица В получена от HGNC, как и таблица А, приведенная выше. Например, агонист TNFRSF может представлять собой агонистическое антитело,

направленное против члена TNFRSF, растворимый агонист TNFRSF, включая, помимо прочего, его природный лиганд или его функциональный фрагмент.

[0086] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления агонист TNFRSF включает, без ограничения, агонист рецепторов LT $\alpha$ 3 (TNFRSF1A, TNFRSF1B или TNFRSF14), агонист рецептора LT $\beta$  (TNFRSF3) (например, LIGHT или LT $\beta$ ), агонист медиатора входа герпесвируса (HVEM или TNFRSF14) (LIGHT), агонист слабого индуктора апоптоза рецептора фактора некроза опухоли (TNFRSF12A) (например, TWEAK, также известный как TNFSF12), агонист кластера фактора дифференцировки 40 (CD40, TNFRSF5) (CD40L), агонист CD27 (TNFRSF7) (CD70), агонист CD30 (TNFRSF8), агонист 4-1BB (CD137, TNFRSF9), агонист рецептора-активатора ядерного фактора KB (RANK, TNFRSF 1 1A), агонист TROY (TNFRSF 19) и агонист рецептора OX40 (TNFRSF4).

[0087] В контексте настоящего описания термин «функциональный фрагмент» относится к фрагменту вещества, который сохраняет одну или более функциональных активностей исходного вещества, предпочтительно все функциональные активности. Например, функциональный фрагмент агониста TNFRSF относится к фрагменту агониста TNFRSF, который сохраняет функцию агониста TNFRSF, как описано и/или заявлено в настоящем описании, например, активирует целевой TNFRSF.

[0088] В контексте настоящего описания термин «лиганд» относится к любому веществу, способному связываться или быть связанным с другим веществом. Лиганд может быть пептидом, полипептидом, белком, аптамером, полисахаридом, молекулой сахара, углеводом, липидом, олигонуклеотидом, полинуклеотидом, синтетической молекулой, неорганической молекулой, органической молекулой и любой их комбинацией. Предпочтительно лиганд представляет собой полипептид.

[0089] В контексте настоящего описания термин «CD40» относится к «кластеру дифференциации 40», члену суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR). CD40 представляет собой костимулирующий белок на антигенпрезентирующих клетках (например, В-клетках, дендритных клетках, моноцитах), гемопоэтических предшественниках, эндотелиальных клетках, гладкомышечных клетках, эпителиальных клетках, а также в большинстве опухолей человека (Grewal & Flavell, *Ann. Immunol.*, 1996, 16:111-35, Toes & Schoenberger, *Seminars in Immunology*, 1998, 10(6):443-8)). Связывание природного лиганда CD154 (CD40L) на клетках T<sub>H</sub> с CD40 активирует антигенпрезентирующие клетки и индуцирует множество последующих эффектов. Адаптерные белки фактора, ассоциированного с TNF-рецептором, TRAF1, TRAF2, TRAF6 и TRAF5, взаимодействуют с CD40 и служат медиаторами передачи сигнала. В итоге передача сигналов CD40 активирует как канонические, так и неканонические пути NF- $\kappa$ B.

#### Агонистические анти-CD40 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты

[0090] В контексте настоящего описания термин «антитело» относится к молекулам иммуноглобулина, содержащим четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимерам (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит варибельную область

тяжелой цепи (сокращенно  $V_H$  или  $V_H$ ) и константную область тяжелой цепи ( $C_H$  или  $C_H$ ). Константная область тяжелой цепи включает три домена:  $C_H1$ ,  $C_H2$  и  $C_H3$ . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно  $V_L$  или  $V_L$ ) и константную область легкой цепи ( $C_L$  или  $C_L$ ). Константная область легкой цепи содержит один домен ( $C_L1$ ). Области  $V_H$  и  $V_L$  можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые «определяющими комплементарность областями» (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми «каркасными областями» (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  состоят из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Каркасные области могут способствовать поддержанию правильной конформации CDR, обеспечивая связывание между антигенсвязывающей областью и антигеном.

[0091] Наиболее часто используемый иммуноглобулин для терапевтического применения представляет собой иммуноглобулин G (или IgG), тетрамерный гликопротеин. В природном иммуноглобулине каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну легкую (примерно 25 кДа) и одну тяжелую (примерно 50-70 кДа) цепи. Aминоконцевая часть каждой цепи включает переменную область, содержащую примерно от 100 до 110 или более аминокислот, главным образом ответственных 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.

[0092] Тяжелые цепи классифицируют как мю ( $\mu$ ), дельта ( $\delta$ ), гамма ( $\gamma$ ), альфа ( $\alpha$ ) и эpsilon ( $\epsilon$ ) и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. Некоторые из них могут быть далее подразделены на подклассы или изотипы, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Разные изотипы имеют разные эффекторные функции; например, изотипы IgG1 и IgG3 обладают антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC). В предпочтительных вариантах осуществления агонистические анти-CD40 антитела или их агонистические антигенсвязывающие фрагменты, содержащиеся в ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белках по изобретению, относятся к классу IgG. В более предпочтительных вариантах осуществления агонистические анти-CD40 антитела или их агонистические антигенсвязывающие фрагменты, содержащиеся в ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белках по изобретению, относятся к подклассам IgG1 или IgG3. В особенно предпочтительных вариантах осуществления агонистические анти-CD40 антитела или их агонистические антигенсвязывающие фрагменты, содержащиеся в ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белках по изобретению, относятся к подклассу IgG1. В других более предпочтительных вариантах осуществления агонистические анти-CD40 антитела или их агонистические антигенсвязывающие

фрагменты, содержащиеся в ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белках по изобретению, относятся к подклассам IgG2 или IgG4. В особенно предпочтительных вариантах осуществления агонистические анти-CD40 антитела или их агонистические антигенсвязывающие фрагменты, содержащиеся в ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белках по изобретению, относятся к подклассу IgG2.

[0093] Человеческие легкие цепи классифицируют как легкие цепи каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления агонистические анти-CD40 антитела или их агонистические антигенсвязывающие фрагменты, содержащиеся в ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белках по изобретению, содержат легкую цепь класса  $\kappa$ . В других вариантах осуществления агонистические анти-CD40 антитела или их агонистические антигенсвязывающие фрагменты, содержащиеся в ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белках по изобретению, содержат легкую цепь класса  $\lambda$ . Внутри легкой и тяжелой цепей вариабельная и константная области соединены областью «J», состоящей примерно из 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь дополнительно включает область «D», состоящую еще из примерно 10 аминокислот. См. *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

[0094] Термин «антитело» дополнительно включает, без ограничения, моноклональные антитела, биспецифические антитела, минитела, 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.

[0095] В контексте настоящего описания термин «агонистическое CD40 антитело» или «агонистическое анти-CD40 антитело» относится к антителу, которое связывается с CD40 и опосредует передачу сигналов CD40. В предпочтительном варианте осуществления оно связывается с человеческим CD40. Как описано ниже, связывание с CD40 можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса, предпочтительно с помощью системы BIAcore®. Агонистическое анти-CD40 антитело может увеличивать активность одного или более CD40 по меньшей мере примерно на 20% при добавлении к клетке, ткани или организму, экспрессирующим CD40. В некоторых вариантах осуществления антитело активирует активность CD40 на по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 85%. Активность CD40 агонистического анти-CD40 антитела может быть измерена с помощью анализа активации поверхностных молекул цельной крови или с помощью 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 создавали 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 продуцированию SEAP, которое можно обнаружить в супернатанте с помощью хромогенных субстратов, таких как QUANTI-Blue™.

[0096] В контексте настоящего изобретения ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки активируют как путь CD40, так и путь IFN. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок активирует путь CD40 с EC<sub>50</sub> менее 400, 300, 200, 150, 100, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 или 15 нг/мл, где активность CD40 предпочтительно определяют с помощью анализа репортерных клеток *in vitro*, необязательно с использованием клеток НЕК-Blue™ CD40L, как описано, например, в Примере I. В более конкретных вариантах осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок активирует путь CD40 с EC<sub>50</sub> в диапазоне от 10 до 200 нг/мл. В еще более конкретных вариантах осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок активирует путь CD40 с EC<sub>50</sub> в диапазоне от 10 до 50 нг/мл, предпочтительно от 10 до 30 нг/мл.

[0097] Примеры подходящих агонистических анти-CD40 антител включают, без ограничения, CP870,893 (Pfizer/Roche), SGN-40 (Seattle Genetics), ADC-1013 (Janssen/Alligator BioSciences), Chi Lob 7/4 (University of Southampton), дацетумумаб (Seattle Genetics), APX005M (Apexigen, Inc.), 3G5 (Celldex) и CDX-1140 (Celldex). Примеры последовательностей легкой и тяжелой цепей агонистического анти-CD40 антитела CP870,893 приведены в Таблице 7. Примеры последовательностей легкой и тяжелой цепей агонистического анти-CD40 антитела 3G5 приведены в Таблице 8.

[0098] В контексте настоящего описания термин «агонистический антигенсвязывающий фрагмент» агонистического анти-CD40 антитела относится к фрагменту агонистического анти-CD40 антитела, который сохраняет одну или более функциональных активностей исходного антитела, таких как способность связываться с CD40 и действовать как агонист передачи сигналов CD40 в клетке, например, оно опосредует передачу сигналов пути CD40. Такой фрагмент может конкурировать с интактным антителом за связывание с CD40.

[0099] Агонистические антигенсвязывающие фрагменты агонистического анти-CD40 антитела могут быть получены методами рекомбинантной ДНК или могут быть получены путем ферментативного или химического расщепления анти-CD40 антитела. Агонистические антигенсвязывающие фрагменты включают, без ограничения, Fab-фрагмент, диатело (вариабельный домен тяжелой цепи на том же полипептиде, что и вариабельный домен легкой цепи, соединенный посредством короткого пептидного линкера, который является слишком коротким, чтобы обеспечить спаривание между двумя доменами на одной цепи), Fab'-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fv-фрагмент, доменные антитела и одноцепочечные антитела, и могут быть получены из любого источника-млекопитающего, включая, без ограничения, человека, мышь, крысу, верблюда или кролика.

[00100] Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к части легкой и/или тяжелой цепей антитела, обычно включающей примерно 120-130 аминоконцевых аминокислот в тяжелой цепи и примерно 100-130 аминокислот в легкой цепи. Вариабельные области разных антител сильно различаются по аминокислотной последовательности даже среди антител, полученных от одного и того же вида или одного и того же класса. Примеры последовательностей доменов  $V_L$  и  $V_H$  агонистического анти-CD40 антитела CP870,893 приведены в таблице 1. Вариабельная область антитела обычно определяет специфичность конкретного антитела к своей мишени, поскольку она содержит CDR. В таблице 1 также показаны примеры последовательностей CDR агонистического анти-CD40 антитела CP870,893.

Таблица 1. Вариабельные области тяжелой/легкой цепей анти-CD40 антитела и CDR агонистического анти-CD40 антитела CP870,893. Последовательности, выделенные жирным курсивом, соответствуют областям CDR согласно определению по Кабат.

Области анти-CD40 антитела	Последовательность
Домен $V_L$ анти-CD40 антитела (SEQ ID NO 51)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRAS <b>QGIYSWLA</b> YQQKPGKAPNLLIY <b>TASTLQ</b> SGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYC <b>QQANIFPLT</b> FGGGTKVEI K
CDRL1 анти-CD40 антитела (SEQ ID NO 52)	RAS <b>QGIYSWLA</b>
CDRL2 анти-CD40 антитела (SEQ ID NO 53)	T <b>ASTLQ</b> S
CDRL3 анти-CD40 антитела (SEQ ID NO 54)	<b>QQANIFPLT</b>
Домен $V_H$ анти-CD40 антитела (SEQ ID NO 55)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <b>SCKASGYTFTGYY</b> <b>MHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQ</b> <b>GRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCAR</b> <b>DQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSS</b>
CDRH1 анти-CD40 антитела (SEQ ID NO 56)	TGYY <b>MH</b>

CDRH2 анти-CD40 антитела (SEQ ID NO 57)	WINPDSGGTNYAQKFQG
CDRH3 анти-CD40 антитела (SEQ ID NO 58)	DQPLGYCTNGVCSYFDY

[00101] Определение CDR и идентификация остатков, содержащих связывающий сайт антитела, могут быть выполнены путем определения структуры антитела и/или определения структуры комплекса антитело-лиганд. Это может быть выполнено с помощью любого из многочисленных методов, известных специалистам в данной области, таких как рентгеновская кристаллография. Для идентификации или аппроксимации областей CDR можно использовать различные методы анализа. Примеры таких методов включают, без ограничения, определение по Кабат, определение по Чотиа, определение по AbM и определение по методу Контакт.

[00102] Определение по Кабат 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 по Чотиа аналогично определению по Кабат, однако определение по Чотиа учитывает положения определенных областей структурных петель. См., например, Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901-17 (1986); Chothia et al., *Nature*, 342:877-83 (1989). В определении по AbM используется интегрированный набор компьютерных программ, разработанных 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 позволяет моделировать третичную структуру антитела на основе первичной последовательности с использованием комбинации баз данных и методов *ab initio*, например, описанных Samudrala et al., «Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach,» в *PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.*, 3:194-198 (1999). Определение по методу Контакта основано на анализе имеющихся сложных кристаллических структур. См., например, MacCalum et al., *J. Mol. Biol.*, 5:732-45 (1996).

[00103] В некоторых вариантах осуществления определяющие комплементарность области (CDR) переменных областей легкой и тяжелой цепей агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента можно привить к каркасным областям (FR) из того же самого или другого вида. В некоторых вариантах осуществления CDR переменных областей легкой и тяжелой цепей агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента могут быть привиты к консенсусным человеческим FR. Для создания консенсусных человеческих FR, в некоторых вариантах осуществления FR из нескольких человеческих аминокислотных последовательностей тяжелой или легкой цепей выравнивают для



идентификации консенсусной аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления FR тяжелой цепи или легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента заменяют FR из другой тяжелой цепи или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления редкие аминокислоты в FR тяжелой и легкой цепей агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента сохраняют, а остальные аминокислоты FR заменяют. Редкие аминокислоты являются специфическими аминокислотами, находящимися в положениях, в которых они обычно не встречаются в FR. В некоторых вариантах осуществления привитые переменные области агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента можно использовать с константной областью, которая отличается от константной области агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления привитые переменные области являются частью одноцепочечного антитела Fv. Прививка CDR описана, например, в патентах США № 6180370, 6054297, 5693762, 5859205, 5693761, 5565332, 5585089 и 5530101, и у Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988), Winter, FEBS Letts., 430:92-94 (1998), которые включены в настоящее описание посредством ссылки для любых целей.

[00104] Область «Fc» обычно содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3 антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и посредством гидрофобных взаимодействий доменов C<sub>H</sub>3.

[00105] «Фрагмент Fab» содержит одну полноразмерную легкую цепь, а также C<sub>H</sub>1 и переменные области одной тяжелой цепи (в настоящем описании комбинация областей V<sub>H</sub> и C<sub>H</sub>1 называется «тяжелой цепью области Fab»).

[00106] «Фрагмент Fab'» содержит одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи, которая содержит домен V<sub>H</sub> и домен C<sub>H</sub>1, а также область между доменами C<sub>H</sub>1 и C<sub>H</sub>2, благодаря чему между двумя цепями тяжелыми двух Fab'-фрагментов возможно образование межцепочечной дисульфидной связи с образованием молекулы F(ab')<sub>2</sub>.

[00107] «Фрагмент F(ab')<sub>2</sub>» содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами C<sub>H</sub>1 и C<sub>H</sub>2, благодаря чему между двумя тяжелыми цепями возможно образование межцепочечной дисульфидной связи. Таким образом, фрагмент F(ab')<sub>2</sub> состоит из двух фрагментов Fab', которые удерживаются вместе дисульфидной связью, образованной между двумя тяжелыми цепями.

[00108] «Область Fv» содержит переменные области как тяжелой, так и легкой цепей, но не содержит константные области.

[00109] «Одноцепочечные антитела» представляют собой молекулы Fv, в которых переменные области тяжелой и легкой цепей соединены гибким линкером с образованием одной полипептидной цепи, образуя антигенсвязывающую область.

Одноцепочечные антитела подробно обсуждаются в публикации международной заявки на патент WO 88/01649 и патентах США 4946778 и 5260203, описания которых включены посредством ссылки.

[00110] «Домен антитела» представляет собой иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи. В некоторых случаях две или более области  $V_H$  ковалентно соединены пептидным линкером с образованием двухвалентного доменного антитела. Две области  $V_H$  двухвалентного доменного антитела могут быть нацелены на один и тот же или разные антигены.

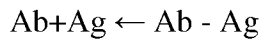
[00111] Антитело или антигенсвязывающий белок, такой как ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок по изобретению, предпочтительно связывается со своим целевым антигеном с константой диссоциации ( $K_d$ )  $\leq 10^{-7}$  М. Антитело или антигенсвязывающий белок связывается со своим антигеном с «высоким сродством», когда  $K_d$  составляет  $\leq 5 \times 10^{-9}$  М, и с «очень высоким сродством», когда  $K_d$  составляет  $\leq 5 \times 10^{-10}$  М. Более предпочтительно антитело или антигенсвязывающий белок имеет  $K_d \leq 10^{-9}$  М. В некоторых вариантах осуществления скорость диссоциации составляет  $< 1 \times 10^{-5}$ . В других вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий белок связывается с человеческим CD40 с  $K_d$  примерно от  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  М, и в другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий белок связывается с ним с  $K_d \leq 1 \times 10^{-10}$ . Как будет понятно специалисту в данной области, в некоторых вариантах осуществления любой или все антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с CD40. Предпочтительно указанные константы определяют методом поверхностного плазмонного резонанса, более предпочтительно с помощью системы BIAcore®.

[00112] Термин «поверхностный плазмонный резонанс» означает оптическое явление, которое позволяет выполнять анализ биоспецифических взаимодействий в реальном времени путем детектирования изменений в концентрациях белков в матрице биосенсора, например, с помощью системы BIAcore® (BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.). Дополнительные описания см. Jönsson et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26. Термин « $K_{on}$ » означает константу скорости ассоциации связывающего белка (например, антитела или антигенсвязывающего белка) с антигеном с образованием, например, комплекса антигенсвязывающий белок/антиген. Термин « $K_{on}$ » или «скорость диссоциации» также означает «константу скорости ассоциации» или « $k_a$ », которые используются в настоящем описании взаимозаменяемо. Это значение, указывающее скорость связывания связывающего белка со своим целевым антигеном или скорость образования комплекса между связывающим белком, например антителом или антигенсвязывающим белком, и антигеном, также показано в виде приведенного ниже уравнения:



[00113] Термин « $K_{off}$ », или «скорость диссоциации», означает известную в данной области «константу скорости диссоциации» связывающего белка (например, антитела или

антигенсвязывающего белка), например, из комплекса антигенсвязывающий белок/антиген. Это значение указывает на скорость диссоциации, с которой связывающий белок, например антитело или антигенсвязывающий белок, отделяется от целевого антигена или с которой происходит разделение комплекса Ab-Ag с течением времени на свободное антитело и антиген, как показано в виде уравнения ниже:



[00114] Термины « $K_d$ » и «равновесная константа диссоциации» относятся к значению, полученному путем измерения при титровании в равновесном состоянии или путем деления константы скорости диссоциации ( $K_{off}$ ) на константу скорости ассоциации ( $K_{on}$ ). Константа скорости ассоциации, константа скорости диссоциации и равновесная константа диссоциации используются для представления сродства связывания связывающего белка (например, антитела или антигенсвязывающего белка) к антигену. Методы определения констант скорости ассоциации и диссоциации хорошо известны в данной области техники. Использование методов, основанных на флуоресценции, обеспечивает высокую чувствительность и возможность исследовать образцы в физиологических буферах в равновесном состоянии. Могут быть использованы и другие экспериментальные подходы и инструменты, такие как анализ BIAcore® (анализ биомолекулярного взаимодействия) (например, инструмент, доступный от BIAcore International AB, компании GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Кроме того, также можно использовать анализ KinExA® (кинетический анализ исключения), доступный от Sapidyne Instruments (Boise, Id.).

[00115] Антигенсвязывающий белок по изобретению может связываться с одной мишенью со сродством, которое на по меньшей мере на порядок, предпочтительно на по меньшей мере два порядка превышает сродство ко второй мишени.

[00116] Термин «мишень» относится к молекуле или части молекулы, способной связываться с антигенсвязывающим белком. В некоторых вариантах осуществления мишень может иметь один или более эпитопов. Следовательно, понятно, что мишень может служить «антигеном» для «антигенсвязывающего белка» по настоящему изобретению.

[00117] Термин «эпитоп» включает любую детерминанту, способную связываться с антигенсвязывающим белком, таким как антитело. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается с антигенсвязывающим белком, нацеленным на этот антиген, и, когда антиген представляет собой белок, включает определенные аминокислоты, которые непосредственно контактируют с этим антигенсвязывающим белком. Чаще всего эпитопы находятся на белках, но в некоторых случаях могут находиться и на других типах молекул, таких как нуклеиновые кислоты. Детерминанты эпитопа 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. Обычно антитела, специфичные к конкретному

целевому антигену, предпочтительно/специфично распознают эпитоп целевого антигена в сложной смеси белков и/или макромолекул.

[00118] В иллюстративных вариантах осуществления агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, образующий часть (I) ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению, содержит три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDR), которые на по меньшей мере 90% идентичны последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO 3; и три CDR тяжелой цепи, которые на по меньшей мере 90% идентичны последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO 6. Агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент также может содержать три определяющие 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 каждую CDR определяют в соответствии с определением CDR по Кабат, Чотиа, АбМ или методу Контакт; предпочтительным является определение каждой CDR по Кабат или Чотиа. В конкретных вариантах осуществления каждую CDR определяют в соответствии с определением по Кабат. В других конкретных вариантах осуществления каждую CDR определяют в соответствии с определением по Чотиа.

[00119] Альтернативно, агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, образующий часть (I) ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению, может содержать (a) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащую определяющую комплементарность область (CDR): CDRH1, которая на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 56, CDRH2, которая на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 57, и CDRH3, которая на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 58; и (b) легкую цепь или ее фрагмент, содержащую CDRL1, которая на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 52, CDRL2, которая на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 53, и CDRL3, которая на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 54.

[00120] В некоторых вариантах осуществления агонистическое анти-CD40 антитело 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.

[00121] Более конкретно, агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область  $V_L$  легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO 51, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%; и/или переменную область  $V_H$  тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO 55, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[00122] Ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению также могут содержать агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь области Fab, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO 12, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[00123] В некоторых вариантах осуществления агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%; 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, SEQ ID NO 12 и SEQ ID NO 50, или последовательность, идентичную им на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[00124] В более конкретных вариантах осуществления агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%; и/или тяжелую цепь (HC), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 6, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[00125] В более конкретных вариантах осуществления агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%; и/или тяжелую цепь (HC), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 9, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%



или по меньшей мере 99%.

[00131] В других более конкретных вариантах осуществления агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 59, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%; и/или тяжелую цепь (HC), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 63, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[00132] В других более конкретных вариантах осуществления агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 59, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%; и/или тяжелую цепь (HC), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 65, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

Варианты и производные ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка или его компонентов

[00133] «Вариант» полипептида (например, ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, антитело, антигенсвязывающий белок или IFN или их компоненты) включает аминокислотную последовательность, в которой один, два, три, четыре, пять или более аминокислотных остатков вставлены, удалены и/или заменены в аминокислотной последовательности относительно другой полипептидной последовательности. 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 аминокислотные замены, как описано ниже.

[00134] «Вариант» полинуклеотидной последовательности (например, РНК или ДНК) содержит одну или более мутаций внутри полинуклеотидной последовательности относительно другой полинуклеотидной последовательности, где один, два, три, четыре, пять или более остатков нуклеиновой кислоты вставлены в последовательность нуклеиновой кислоты, удалены из нее и/или заменены в ней. 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 кодируемой вариантом аминокислотной последовательности относительно другой аминокислотной последовательности (т.е. «немолчащая мутация»). Варианты также включают последовательности нуклеиновой кислоты, в которых один, два, три, четыре, пять или более кодонов заменены их синонимами, которые не приводят к аминокислотной замене и поэтому называются «молчащей мутацией».

[00135] 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, которую определяют путем выравнивания и сравнения последовательностей. «Процент идентичности» означает процент идентичных остатков между аминокислотами или нуклеотидами в сравниваемых молекулах и вычисляют на основе размера наименьшей из сравниваемых молекул. Предпочтительно идентичность определяют по всей длине последовательности. Понятно, что выражение «идентичный на по меньшей мере 80%» включает варианты осуществления, в которых описанная или заявленная последовательность является идентичной эталонной последовательности на по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 98% или еще более предпочтительно по меньшей мере 99%. Выражение «идентичный на по меньшей мере 90%» включает варианты осуществления, в которых описанная или заявленная последовательность является идентичной эталонной последовательности на по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98% или еще более предпочтительно по меньшей мере 99%.

[00136] Для вычисления процента идентичности пробелы при выравнивании (если таковые имеются) предпочтительно устраняют с помощью конкретной математической модели или компьютерной программы (т.е. «алгоритма»). Методы, которые можно использовать для вычисления идентичности выровненных нуклеиновых кислот или полипептидов, включают методы, 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.), 194, 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.

[00137] При вычислении процента идентичности сравниваемые последовательности обычно выравнивают таким образом, чтобы было достигнуто наибольшее совпадение между последовательностями. Одним из примеров компьютерной программы, которую можно использовать для определения процента идентичности, является пакет программ GCG, который включает 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 последовательностей. Последовательности выравнивают путем достижения оптимального совпадения соответствующих аминокислот или нуклеотидов («длины совпадений», как определено алгоритмом). Вместе с алгоритмом используются штраф за открытие пробела (гэпа) (который вычисляют как 3-кратная средняя диагональ, где «средняя диагональ» представляет собой среднее диагонали используемой матрицы сравнения; «диагональ» представляет собой оценку или число, присвоенное каждому идеальному совпадению аминокислот по конкретной матрице сравнения) и штраф за удлинение пробела (который обычно равен 1/10 штрафа за открытие пробела), а также матрица сравнения, такая как PAM 250 или BLOSum 62. В некоторых вариантах осуществления в алгоритме также используется 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. USA 89:10915-10919 для матрицы сравнения BLOSum 62).

[00138] Примерами параметров, которые можно использовать при определении процента идентичности полипептидов или нуклеотидных последовательностей с помощью программы GAP, являются следующие:

- Алгоритм: Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453
- Матрица сравнения: BLOSum 62 от Henikoff et al., 1992, см. выше.
- Штраф за открытие пробела: 12 (но без штрафа за концевые пробелы)
- Штраф за удлинение пробела: 4
- Порог сходства: 0

[00139] Определенные схемы выравнивания для выравнивания двух аминокислотных последовательностей могут привести к совпадению только короткого участка из двух последовательностей, и этот короткий выровненный участок может иметь очень высокий уровень идентичности последовательности, даже если между двумя полноразмерными последовательностями нет значимого родства. Соответственно, выбранный метод выравнивания (программа GAP) может быть скорректирован, при необходимости, для достижения выравнивания, охватывающего по меньшей мере 50 или по меньшей мере 100, предпочтительно всю длину, смежных аминокислот целевого полипептида.

[00140] Консервативные аминокислотные замены могут включать неприродные

аминокислотные остатки, которые обычно вводят в ходе химического синтеза пептидов и которые отсутствуют в результате синтеза в биологических системах. К ним относятся пептидомиметики и другие обращенные или инвертированные формы аминокислотных остатков.

[00141] Встречающиеся в природе остатки можно разделить на классы на основе общих свойств боковых цепей:

- 1) гидрофобные: Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) нейтрально-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.

[00142] Например, неконсервативные замены могут включать замену члена одного из этих классов на члена из другого класса. Такие замещенные остатки могут быть введены, например, в области человеческого антитела, которые гомологичны нечеловеческим антителам, или в негомологичные области молекулы.

[00143] При введении изменений в ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок согласно некоторым вариантам осуществления можно учитывать гидропатический индекс аминокислот. Каждой аминокислоте присвоен гидропатический индекс на основании ее гидрофобности и зарядовых характеристик. Эти индексы являются следующими: 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); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9); и аргинин (-4,5).

[00144] Важность гидропатического индекса аминокислоты для придания белку интерактивной биологической функции признана в данной области техники. 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, с сохранением при этом аналогичной биологической активности. При внесении изменений на основе гидропатического индекса в некоторых вариантах осуществления используют замены аминокислот, гидропатические индексы которых находятся в пределах  $\pm 2$ . В некоторых вариантах осуществления включены замены, которые находятся в пределах  $\pm 1$ , а в некоторых вариантах осуществления включены замены, которые находятся в пределах  $\pm 0,5$ .

[00145] В данной области техники также понятно, что замена подобных аминокислот может быть эффективно выполнена на основе гидрофильности. В некоторых вариантах осуществления наибольшая средняя локальная гидрофильность белка, определяемая гидрофильностью соседних с ним аминокислот, коррелирует с его иммуногенностью и антигенностью, т.е. биологическим свойством белка.

[00146] Таким аминокислотным остаткам присвоены следующие значения гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспартат (+3,0±1); глутамат (+3,0±1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5±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 на основе аналогичных значений гидрофильности в некоторых вариантах осуществления используют замены аминокислот, значения гидрофильности которых находятся в пределах ±2, в некоторых вариантах осуществления включают замены, которые находятся в пределах ±1, а в некоторых вариантах осуществления - в пределах ±0,5.

[00147] Приведенные в качестве примера аминокислотные замены представлены в Таблице 2.

Таблица 2. Аминокислотные замены.

Исходный остаток	Примеры замен	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 диамино-масляная 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

[00148] В свете настоящего изобретения специалист в данной области техники сможет определить подходящие варианты ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белков, представленных в настоящем описании, с помощью хорошо известных методов. В некоторых вариантах осуществления специалист в данной области сможет идентифицировать подходящие области молекулы, которые могут быть изменены без нарушения активности, путем нацеливания на области, которые, как полагают, не являются важными для активности. В некоторых вариантах осуществления можно идентифицировать остатки и части молекул, которые являются консервативными среди подобных полипептидов. В некоторых вариантах осуществления даже в те области, которые могут быть важными для биологической активности или структуры, могут быть введены консервативные аминокислотные замены без нарушения биологической активности или без оказания неблагоприятного воздействия на структуру полипептида.

[00149] Кроме того, специалист в данной области может ознакомиться с исследованиями структурно-функционального характера по определению остатков в подобных полипептидах, которые важны для активности или структуры. С учетом такого сравнения можно предсказать важность аминокислотных остатков в белке, которые соответствуют аминокислотным остаткам, важным для активности или структуры в подобных белках. Специалист в данной области сможет сделать выбор в пользу химически подобных аминокислотных замен для таких предсказанных важных аминокислотных остатков.

[00150] Специалист в данной области также может проанализировать трехмерную структуру и аминокислотную последовательность относительно этой структуры в подобных белках или белковых доменах. Учитывая такую информацию, специалист в данной области сможет предсказать выравнивание аминокислотных остатков ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или интерферона или его функционального фрагмента, представленного в настоящем описании, в отношении его трехмерной структуры. В некоторых вариантах осуществления специалист в данной области сможет прийти к решению о том, что не стоит радикально менять аминокислотные остатки, которые, по прогнозам, находятся на поверхности белка, поскольку такие остатки могут участвовать в важных взаимодействиях с другими молекулами. Более того, специалист в данной области может создать тестовые варианты, содержащие одну аминокислотную замену в каждом желаемом аминокислотном остатке. Затем эти варианты могут быть подвергнуты скринингу с помощью анализов активности, известных специалистам в данной области. Такие варианты можно использовать для сбора информации о подходящих вариантах. Например, если обнаружено, что изменение определенного аминокислотного остатка

привело к нарушению, нежелательному снижению активности или появлению неподходящей активности, вариантов с таким изменением можно избежать. Другими словами, на основе информации, полученной в результате таких экспериментов, специалист в данной области может легко определить аминокислоты, замены которых, как по отдельности, так и в комбинации с другими мутациями, следует в дальнейшем избегать.

[00151] Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотные замены представляют собой замены, которые: (1) снижают восприимчивость к протеолизу, (2) снижают восприимчивость к окислению, (3) изменяют сродство связывания для образования белковых комплексов, (4) изменяют сродство связывания и/или (5) придают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких полипептидов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в природную последовательность (в некоторых вариантах осуществления в часть полипептида, находящуюся вне домена(ов), образующего(их) межмолекулярные контакты) могут быть введены одиночные или многочисленные аминокислотные замены (в некоторых вариантах осуществления консервативные аминокислотные замены). В некоторых вариантах осуществления консервативная аминокислотная замена обычно не может привести к существенному изменению структурной характеристики родительской последовательности (например, замещающая аминокислота не должна иметь тенденции к разрыву спирали, которая присутствует в родительской последовательности, или нарушению других типов вторичной структуры, которая характеризует родительскую последовательность). Примеры известных в данной области вторичных и третичных структур полипептидов описаны в работах *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 посредством ссылки.

[00152] 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, без ограничения, химическую связь с полимерами, липидами или другими органическими или неорганическими фрагментами. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированный ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок может иметь более длинный период полувыведения из крови, чем ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, который химически не модифицирован. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированный ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок может эффективнее нацеливаться на желаемые клетки, ткани и/или органы. В некоторых вариантах осуществления производное ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка ковалентно модифицируют путем включения одного или

более водорастворимых полимерных цепей, включая, без ограничения, полиэтиленгликоль, полиоксиэтиленгликоль или полипропиленгликоль. См., например, патенты США №№ 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 и 4179337. В некоторых вариантах осуществления производное ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка содержит один или более полимеров, включая, без ограничения, монометоксиполиэтиленгликоль, декстран, целлюлозу или другие полимеры на основе углеводов, поли-(N-винилпирролидон)-полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимер полипропиленоксида и этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин) и поливиниловый спирт, а также смеси таких полимеров.

[00153] В некоторых вариантах осуществления производное ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка, представленного в настоящем описании, ковалентно модифицировано субъединицами полиэтиленгликоля (ПЭГ). В некоторых вариантах осуществления один или более водорастворимых полимеров связаны в одном или более конкретных положениях, например, на аминоконце производного. В некоторых вариантах осуществления один или более водорастворимых полимеров случайным образом присоединяют к одной или более боковым цепям производного. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ используют для улучшения терапевтической эффективности ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка. Некоторые такие способы обсуждаются, например, в патенте США № 6133426, который включен в настоящее описание посредством ссылки для любых целей.

[00154] В некоторых вариантах осуществления варианты ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка включают варианты гликозилирования, в которых количество и/или тип сайта гликозилирования изменены относительно аминокислотных последовательностей родительского полипептида. В некоторых вариантах осуществления варианты белка содержат больше сайтов N-связанного гликозилирования, чем нативный белок. В других вариантах осуществления варианты белка содержат меньше сайтов N-связанного гликозилирования, чем нативный белок. Сайт N-связанного гликозилирования характеризуется последовательностью: Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где аминокислотный остаток, обозначенный как X, может представлять собой любой аминокислотный остаток, кроме пролина. Замена аминокислотных остатков для создания этой последовательности обеспечивает потенциальный новый сайт для добавления N-связанной углеводной цепи. Альтернативно, замены, которые упраздняют эту последовательность, удаляют существующую N-связанную углеводную цепь. Также предусмотрена перегруппировка N-связанных углеводных цепей, при которой один, два, три, четыре, пять или более сайтов N-связанного гликозилирования (обычно встречающихся в природе) упраздняют и создают один или более новых N-связанных сайтов. Дополнительные предпочтительные варианты осуществления включают варианты цистеина, в которых один или более остатков цистеина удалены или заменены другой аминокислотой (например, серином) относительно родительской аминокислотной

последовательности. Варианты цистеина могут быть полезны в случае необходимости рефолдинга антитела в биологически активную конформацию, например, после выделения нерастворимых телец включения. Варианты цистеина обычно содержат меньше остатков цистеина, чем нативный белок, и обычно имеют четное количество, чтобы минимизировать взаимодействия, возникающие в результате неспаренных цистеинов.

#### Коронавирусная инфекция

[00155] Ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки, нуклеиновые кислоты, векторы, векторные системы, способы и композиции, представленные в настоящем описании, можно использовать для лечения коронавирусной инфекции, в частности инфекции SARS-CoV-2. В контексте настоящего описания термины «лечить коронавирусную инфекцию» и «лечение коронавирусной инфекции» относятся к одному или более из следующего: (i) спасению клеток от гибели, вызванной коронавирусом; (ii) спасению клеток от цитопатического эффекта, вызванного коронавирусом; (iii) уменьшению одного или более расстройств, связанных с коронавирусом; и (iv) ослаблению одного или более симптомов, связанных с коронавирусом, у субъекта.

[00156] Термины «вирусная нагрузка» и «титр вируса» относятся к числу вирусных частиц в клетке, органе или жидкости организма, такой как кровь или сыворотка. Вирусную нагрузку или титр вируса часто выражают как количество вирусных частиц или инфекционных частиц на мл в зависимости от типа анализа. Сегодня вирусную нагрузку обычно измеряют в международных единицах на миллилитр (МЕ/мл). Альтернативно, вирусная нагрузка или титр вируса могут быть определены в виде так называемого эквивалента вирусного генома. Более высокая вирусная нагрузка или титр вируса часто коррелируют с тяжестью активной вирусной инфекции. Соответственно, снижение вирусной нагрузки или титра вируса коррелирует со снижением количества инфекционных вирусных частиц, например, в сыворотке. Вирусную нагрузку обычно определяют с помощью тестов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот (NAT или NAATs). В тестах NAT/NAAT используются, 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. Благодаря простоте детектирования вирусных нуклеиновых кислот с помощью тестов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, определение вирусной нагрузки полезно в клинических условиях для мониторинга успеха во время лечения.

[00157] Термины «пациент» и «субъект» используются взаимозаменяемо и включают людей и животных, не являющихся людьми, предпочтительно людей, а также субъектов с официально диагностированными расстройствами, субъектов без официально признанных расстройств, субъектов, получающих медицинскую помощь, субъектов с риском развития расстройств и т.д.

[00158] В настоящем описании термин «расстройство, связанное с коронавирусом», в частности, связанное с инфекцией SARS-CoV-2, относится к расстройству, которое возникает в результате заражения субъекта коронавирусом. Заболевания, связанные с коронавирусом, включают, без ограничения, Covid-19, респираторные заболевания, пневмонию, а также симптомы и/или осложнения, возникающие в результате любого из этих заболеваний.

[00159] В контексте настоящего описания термины «симптом, связанный с коронавирусом», «симптом коронавирусной инфекции» или «осложнение, связанное с коронавирусом» включают одно или более физических расстройств, связанных с коронавирусной инфекцией, в частности, связанных с инфекцией SARS-CoV-2. Симптомы и осложнения, вызванные коронавирусной инфекцией, включают, без ограничения, лихорадку, сухой кашель, усталость, затрудненное дыхание или одышку, боль или давление в груди, агевизию, парагевизию, гипогевизию, аносмию, паросмию, гипосмию и т.п.

### Интерфероны

[00160] В контексте настоящего описания «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, без ограничения, полноразмерный IFN, его вариант или производное (например, химически (например, ПЭГилированное) модифицированное производное или мутеин) или его функционально активный фрагмент, который сохраняет одну или более сигнальных активностей полноразмерного IFN.

[00161] 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 раскрыто в настоящем описании, например, опосредует передачу сигналов пути IFN.

[00162] IFN может усиливать активность одного или более рецепторов IFN на по меньшей мере примерно 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 на по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 85%. Активность IFN (т.е. «активность IFN») можно измерить, например, с помощью анализа репортерных клеток *in vitro*, например, с помощью клеток HEK-Blue<sup>TM</sup> IFN- $\alpha/\beta$  (InvivoGen, кат. №: hkb-ifn $\alpha\beta$ ), клеток HEK-Blue<sup>TM</sup> IFN- $\lambda$  (InvivoGen, кат. №: hkb-ifnl) или клеток HEK-Blue<sup>TM</sup> Dual IFN- $\gamma$  (InvivoGen, кат. №: hkb-ifng), как более подробно описано в примере I. Эти репортерные клетки созданы путем стабильной трансфекции клеток HEK293 генами человеческого рецептора IFN и конструкцией секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы



(SEAP), контролируемой IFN-стимулируемым ответным элементом, для измерения активности IFN. 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 продуцирование и высвобождение SEAP.

[00163] В контексте настоящего изобретения ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки активируют как путь CD40, так и путь IFN. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок активирует путь IFN с EC<sub>50</sub> менее 100, 60, 50, 40, 30, 20, 10 или 1 нг/мл, предпочтительно с EC<sub>50</sub> менее 11 нг/мл, более предпочтительно с EC<sub>50</sub> менее 6 нг/мл, при этом активность IFN предпочтительно определяют с помощью анализа репортерных клеток *in vitro*, необязательно с использованием IFN-клеток HEK-Blue™, как описано, например, в Примере I.

[00164] 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).

[00165] Согласно некоторым иллюстративным вариантам осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, представленный в настоящем описании, содержит полноразмерный IFN, его вариант или производное (например, химически (например, ПЭГилированное) модифицированное производное или мутеин) или его функциональный активный фрагмент, который сохраняет одну или более сигнальных активностей полноразмерного IFN. В некоторых вариантах осуществления IFN представляет собой человеческий IFN.

[00166] В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, представленный в настоящем описании, 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.

[00167] В конкретных вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN типа I или его 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 его функциональный фрагмент. В более конкретных вариантах осуществления IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$  или IFN $\beta$  или его 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.

[00168] 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 функциональные фрагменты. В конкретных вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$  или IFN $\beta$  или их функциональные фрагменты.

[00169] 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, представленную в SEQ ID NO 17, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

[00170] В некоторых вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\beta$  или его функциональный фрагмент. IFN $\beta$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 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 C17S относительно SEQ ID NO 14. В некоторых вариантах осуществления IFN $\beta$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO 15. В других вариантах осуществления IFN $\beta$  содержит аминокислотные замены C17S и N80Q относительно SEQ ID NO 14. В других вариантах осуществления IFN $\beta$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO 16.

[00171] В некоторых вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\gamma$  или IFN $\lambda$  или их функциональные фрагменты. 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, представленную в SEQ ID NO 19, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 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, представленную в SEQ ID NO 18, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

[00172] В некоторых вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\epsilon$  или его функциональный фрагмент. IFN $\epsilon$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 80, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

[00173] В некоторых вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\omega$  или его функциональный фрагмент. IFN $\omega$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 79, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

[00174] В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии одного или более биомаркеров сигнального пути IFN в инфицированных коронавирусом клетках, обработанных ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белком, представленным в настоящем описании, изменен, т.е. повышен или понижен. Согласно некоторым иллюстративным вариантам осуществления уровень экспрессии одного или более биомаркеров пути IFN повышается в инфицированных коронавирусом клетках, обработанных ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белком, представленным в настоящем описании. В контексте настоящего описания «биомаркер» следует понимать как характеристику, объективно измеряемую и оцениваемую в качестве индикатора нормальных биологических процессов, патогенных процессов или фармакологических ответов на терапевтическое вмешательство.

[00175] Согласно некоторым вариантам осуществления, подходящий биомаркер пути IFN, представленный в настоящем описании, представляет собой хемокин, например, хемокин C-X-C, выбранный из группы, состоящей из CXCL9, CXCL10 и CXCL11. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления подходящими биомаркерами, индуцируемыми путем IFN, являются CXCL9, CXCL10 и/или CXCL11, а также стимулируемый интерфероном ген ISG20. Индукцию или высвобождение цитокинов можно количественно оценить известными в данной области методами, такими как ELISA. Альтернативно, индукцию также можно определить с помощью анализов на основе РНК, таких как RNAseq или кОТ-ПЦР. В некоторых вариантах осуществления повышение регуляции может относиться к по меньшей мере 1,5-кратному, по меньшей мере 2-кратному, по меньшей мере 2,5-кратному, по меньшей мере 3-кратному, по меньшей мере 4-кратному, по меньшей мере 5-кратному или по меньшей мере 10-кратному увеличению экспрессии или секреции этих цитокинов.

[00176] В этих или других иллюстративных вариантах осуществления при обработке клеток цельной крови человека ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белком по изобретению не приводит к существенному повышению регуляции уровня экспрессии провоспалительных цитокинов, например, IL10, IL1 $\beta$  и/или IL2. В некоторых вариантах осуществления при обработке клеток цельной крови человека ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белком по изобретению не приводит к существенному повышению регуляции уровня экспрессии IL10. В некоторых вариантах осуществления при обработке клеток цельной крови человека ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белком по изобретению не приводит к существенному повышению регуляции уровня экспрессии IL1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления при обработке инфицированных коронавирусом клеток ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белком по изобретению не

приводит к существенному повышению регуляции уровня экспрессии IL2. В некоторых вариантах осуществления при обработке инфицированных коронавирусом клеток ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белком по изобретению не приводит к существенному повышению регуляции уровней экспрессии IL10 и IL1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления при обработке инфицированных коронавирусом клеток ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белком по изобретению не приводит к существенному повышению регуляции уровней экспрессии IL10 и IL2. В некоторых вариантах осуществления при обработке инфицированных коронавирусом клеток ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белком по изобретению не приводит к существенному повышению регуляции уровней экспрессии IL1 $\beta$  и IL2. В некоторых вариантах осуществления при обработке инфицированных коронавирусом клеток ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белком по изобретению не приводит к существенному повышению регуляции уровней экспрессии IL10, IL1 $\beta$  и IL2.

#### Ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки

[00177] Термин «ассоциированный», используемый в настоящем описании, обычно относится к ковалентной или нековалентной связи двух (или более) молекул. Ассоциированные белки создают путем соединения двух или более разных пептидов или белков, в результате чего образуется белок с одним или более функциональными свойствами, полученными от каждого из исходных белков. В контексте настоящего изобретения ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки активируют как путь CD40, так и путь IFN. Ассоциированный белок включает мономерные и мультимерные, например, димерные, тримерные, тетрамерные и т.п. комплексы различных ассоциированных или слитых белков. В этом контексте нековалентная связь возникает в результате сильных взаимодействий между двумя областями поверхности белков, обычно посредством взаимодействий ионных, Ван-дер-Ваальсовых и/или водородных связей. С другой стороны, ковалентная связь требует наличия реальных химических связей, таких как пептидные связи, дисульфидные мостики и т.д. Термин «слитый», в контексте настоящего описания, обычно относится к соединению двух или более разных пептидов или белков ковалентным способом через пептидную связь. Таким образом, «слитый белок» относится к одному белку, созданному путем соединения двух или более разных пептидов или белков посредством пептидной связи, с одним или более функциональными свойствами, полученными от каждого из исходных белков. В некоторых вариантах осуществления два или более разных пептидов или белков могут быть слиты друг с другом посредством одного или более пептидных линкеров («L»).

[00178] В определенном аспекте изобретения ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой белок, содержащий агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и IFN или его функциональный фрагмент.

[00179] В некоторых вариантах осуществления IFN или его функциональный

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

[00180] В других вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент ковалентно связан с агонистическим анти-CD40 антителом или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом. В предпочтительных вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с агонистическим анти-CD40 антителом или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом. IFN или его функциональный фрагмент может быть слит с легкой цепью агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с N-концом легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В других вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с C-концом легкой цепи агонистического анти-CD40-антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. IFN или его функциональный фрагмент также могут быть слиты с тяжелой цепью агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с N-концом тяжелой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В других вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с C-концом тяжелой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В любом из этих вариантов осуществления агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и IFN или его функциональный фрагмент могут быть слиты друг с другом через линкер.

[00181] Термин «линкер» или «L», используемый в настоящем описании, относится к любому фрагменту, который ковалентно соединяет одно или более агонистических анти-CD40 антител или их агонистических антигенсвязывающих фрагментов с одним или более интерферонами или их функциональными фрагментами. В иллюстративных вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер. Термин «пептидный линкер», используемый в настоящем описании, относится к пептиду, адаптированному для связывания двух или более фрагментов. Пептидный линкер, упомянутый в настоящем описании, может обладать одним или более описанными ниже свойствами. Последовательности пептидного линкера согласно некоторым иллюстративным вариантам осуществления представлены в Таблице 7.

[00182] 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.

[00183] Линкер обычно имеет достаточную длину для обеспечения гибкости, достаточной для того, чтобы активности связанных фрагментов не интерферировали друг с другом, например, чтобы фрагмент не мог связаться 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 аминокислот. 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.

[00184] В некоторых вариантах осуществления линкер выбирают из группы, включающей жесткие, гибкие и/или спиралеобразующие линкеры. Понятно, что спиралеобразующие линкеры также могут быть жесткими линкерами, поскольку  $\alpha$ -спираль обладает меньшей степенью свободы, чем пептид, принимающий более случайную конформацию спирали. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой жесткий линкер. В одном из примеров жесткий линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 20. В дополнительных примерах жесткий линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 22 или SEQ ID NO 23. В родственных вариантах осуществления линкер представляет собой спиралеобразующий линкер. В одном из примеров спиралеобразующий линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 22 или SEQ ID NO 23. В других вариантах осуществления линкер представляет собой гибкий линкер. В одном из примеров гибкий линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25 или SEQ ID NO 26.

[00185] Линкер также может иметь различные химические свойства. Линкер может быть выбран из кислотных, основных или нейтральных линкеров. Обычно кислотные 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 являются в высокой степени гидрофильными. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой кислотный линкер. В одном из примеров кислотный линкер содержит последовательность, представленную в 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. В одном из примеров нейтральный линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25 или SEQ ID NO 26.

[00186] В предпочтительных вариантах осуществления линкер представляет собой Gly-Ser или линкер Gly-Ser-Thr, состоящий из множества 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, представленную в 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, представленную в SEQ ID NO 21.

[00187] В иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержит линкер, содержащий последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO 20-26, предпочтительно из последовательностей, представленных в SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25 или SEQ ID NO 26. В предпочтительном варианте осуществления линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 24. В другом предпочтительном варианте осуществления линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 25. В другом предпочтительном варианте осуществления линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 26.

[00188] В различных вариантах осуществления любого из аспектов изобретения ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержит только те аминокислоты, которые образуют (I) указанное агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и (II) указанный IFN или его функциональный фрагмент. В родственных вариантах осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержит только те аминокислоты, которые образуют (I) указанное агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, (II) указанный IFN или его функциональный фрагмент и (III) указанный линкер.

[00189] В иллюстративных вариантах осуществления, представляющие всевозможные разные конфигурации (I) агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, (II) интерферона (IFN) или его функционального фрагмента и (III) линкера, описаны в следующее.

[00190] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с С-концом тяжелой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер, представленный в Таблице 3А или Таблице 3В. В этих вариантах осуществления тяжелая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента может содержать последовательность, представленную в 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, представленную в SEQ ID NO 17. IFN $\beta$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO 16. IFN $\beta$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 14. IFN $\beta$ \_C17S может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 15. IFN $\beta$ \_C17S, N80Q может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO: ID NO 16. IFN $\gamma$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 19. IFN $\lambda$ 2 может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 18. IFN $\epsilon$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 80. IFN $\omega$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 79. Упомянутые линкеры представлены в Таблице 7.

[00191] В вариантах осуществления, где IFN слит с C-концом тяжелой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок дополнительно содержит легкую цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В более конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, представленную в 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, представленную в SEQ ID NO 3. В других более конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 61 или SEQ ID NO 63, и легкая цепь содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 59.

Таблица 3. Интерферон или его функциональный фрагмент, слитый с C-концом тяжелой цепи анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента.

<b><u>A</u></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>	Анти- CD40_HC -RL- IFN $\alpha$ 2a	Анти- CD40_H C-RL- IFN $\beta$	Анти- CD40_HC- RL- IFN $\beta$ _C17S	Анти- CD40_HC-RL- IFN $\beta$ _C17S, N80Q	Анти- CD40_HC -RL-IFN $\gamma$	Анти- CD40_HC -RL- IFN $\lambda$ 2
<b>GST линкер</b>	Анти- CD40_HC -GST- IFN $\alpha$ 2a	Анти- CD40_H C-GST- IFN $\beta$	Анти- CD40_HC- GST- IFN $\beta$ _C17S	Анти- CD40_HC-GST- IFN $\beta$ _C17S, N80Q	Анти- CD40_HC -GST- IFN $\gamma$	Анти- CD40_HC -GST- IFN $\lambda$ 2
<b>HL линкер</b>	Анти- CD40_HC -HL- IFN $\alpha$ 2a	Анти- CD40_H C-HL- IFN $\beta$	Анти- CD40_HC- HL- IFN $\beta$ _C17S	Анти- CD40_HC-HL- IFN $\beta$ _C17S, N80Q	Анти- CD40_HC -HL-IFN $\gamma$	Анти- CD40_HC -HL- IFN $\lambda$ 2
<b>HL2 линкер</b>	Анти- CD40_HC -HL2- IFN $\alpha$ 2a	Анти- CD40_H C-HL2- IFN $\beta$	Анти- CD40_HC- HL2- IFN $\beta$ _C17S	Анти- CD40_HC-HL2- IFN $\beta$ _C17S, N80Q	Анти- CD40_HC -HL2- IFN $\gamma$	Анти- CD40_HC -HL2- IFN $\lambda$ 2



<b>(G4S)2</b> <b>линке</b> <b>р</b>	Анти- CD40_HC -(G4S)2- IFN $\alpha$ 2a	Анти- CD40_Н С- (G4S)2- IFN $\beta$	Анти- CD40_HC- (G4S)2- IFN $\beta$ _C17S	Анти- CD40_HC- (G4S)2- IFN $\beta$ _C17S, N80Q	Анти- CD40_HC -(G4S)2- IFN $\gamma$	Анти- CD40_HC -(G4S)2- IFN $\lambda$ 2
<b>(G4S)3</b> <b>линке</b> <b>р</b>	Анти- CD40_HC -(G4S)3- IFN $\alpha$ 2a	Анти- CD40_Н С- (G4S)3- IFN $\beta$	Анти- CD40_HC- (G4S)3- IFN $\beta$ _C17S	Анти- CD40_HC- (G4S)3- IFN $\beta$ _C17S, N80Q	Анти- CD40_HC -(G4S)3- IFN $\gamma$	Анти- CD40_HC -(G4S)3- IFN $\lambda$ 2
<b>(G4S)4</b> <b>линке</b> <b>р</b>	Анти- CD40_HC -(G4S)4- IFN $\alpha$ 2a	Анти- CD40_Н С- (G4S)4- IFN $\beta$	Анти- CD40_HC- (G4S)4- IFN $\beta$ _C17S	Анти- CD40_HC- (G4S)4- IFN $\beta$ _C17S, N80Q	Анти- CD40_HC -(G4S)4- IFN $\gamma$	Анти- CD40_HC -(G4S)4- IFN $\lambda$ 2
<b><u>В</u></b>	<b>IFN<math>\epsilon</math></b>	<b>IFN<math>\omega</math></b>				
<b>RL</b> <b>линке</b> <b>р</b>	Анти- CD40_HC -RL-IFN $\epsilon$	Анти- CD40_Н С-RL- IFN $\omega$				
<b>GST</b> <b>линке</b> <b>р</b>	Анти- CD40_HC -GST- IFN $\epsilon$	Анти- CD40_Н С-GST- IFN $\omega$				
<b>HL</b> <b>линке</b> <b>р</b>	Анти- CD40_HC -HL-IFN $\epsilon$	Анти- CD40_Н С-HL- IFN $\omega$				
<b>HL2</b> <b>линке</b> <b>р</b>	Анти- CD40_HC -HL2- IFN $\epsilon$	Анти- CD40_Н С-HL2- IFN $\omega$				
<b>(G4S)2</b> <b>линке</b> <b>р</b>	Анти- CD40_HC -(G4S)2- IFN $\epsilon$	Анти- CD40_Н С- (G4S)2- IFN $\omega$				
<b>(G4S)3</b> <b>линке</b> <b>р</b>	Анти- CD40_HC -(G4S)3- IFN $\epsilon$	Анти- CD40_Н С- (G4S)3- IFN $\omega$				

<b>(G4S)4 линке р</b>	Анти- CD40_HC -(G4S)4- IFN $\epsilon$	Анти- CD40_H C- (G4S)4- IFN $\omega$
-------------------------------	--	--

[00192] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления IFN или его функциональный фрагмент слит с N-концом тяжелой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер, представленный в Таблице 4А или Таблице 4В. В этих вариантах осуществления тяжелая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента может содержать последовательность, представленную в 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, представленную в SEQ ID NO 17. IFN $\beta$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 или SEQ ID NO 16. IFN $\beta$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 14. IFN $\beta$ \_C17S может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 15. IFN $\beta$ \_C17S, N80Q может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 16. IFN $\gamma$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 19. IFN $\lambda$ 2 может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 18. IFN $\epsilon$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 80. IFN $\omega$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 79. Упомянутые линкеры представлены в Таблице 7.

[00193] В вариантах осуществления, где IFN слит с N-концом тяжелой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок дополнительно содержит легкую цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В более конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, представленную в 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, и легкая цепь содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3. В других более конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, представленную в SEQ ID 61, SEQ ID 63 или SEQ ID 65, и легкая цепь содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 59.

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

<b><u>A</u></b>	<b>IFN<math>\alpha</math>2a</b>	<b>IFN<math>\beta</math></b>	<b>IFN<math>\beta</math>_C1 7S</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> линкер	IFN $\alpha$ 2a- RL-анти- CD40_HC	IFN $\beta$ -RL- анти- CD40_HC	IFN $\beta$ _C1 7S-RL- анти- CD40_H C	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-RL-анти- CD40_HC	IFN $\gamma$ -RL- анти- CD40_H C	IFN $\lambda$ 2- RL-анти- CD40_H C
<b>GST</b> линкер	IFN $\alpha$ 2a- GST- анти- CD40_HC	IFN $\beta$ - GST- анти- CD40_HC	IFN $\beta$ _C1 7S-GST- анти- CD40_H C	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-GST-анти- CD40_HC	IFN $\gamma$ - GST- анти- CD40_H C	IFN $\lambda$ 2- GST- анти- CD40_H C
<b>HL</b> линкер	IFN $\alpha$ 2a- HL-анти- CD40_HC	IFN $\beta$ -HL- анти- CD40_HC	IFN $\beta$ _C1 7S-HL- анти- CD40_H C	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-HL-анти- CD40_HC	IFN $\gamma$ -HL- анти- CD40_H C	IFN $\lambda$ 2- HL-анти- CD40_H C
<b>HL2</b> линкер	IFN $\alpha$ 2a- HL2- анти- CD40_HC	IFN $\beta$ - HL2- анти- CD40_HC	IFN $\beta$ _C1 7S-HL2- анти- CD40_H C	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-HL2-анти- CD40_HC	IFN $\gamma$ - HL2- анти- CD40_H C	IFN $\lambda$ 2- HL2- анти- CD40_H C
<b>(G4S)2</b> линкер	IFN $\alpha$ 2a- (G4S)2- анти- CD40_HC	IFN $\beta$ - (G4S)2- анти- CD40_HC	IFN $\beta$ _C1 7S- (G4S)2- анти- CD40_H C	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-(G4S)2- анти-CD40_HC	IFN $\gamma$ - (G4S)2- анти- CD40_H C	IFN $\lambda$ 2- (G4S)2- анти- CD40_H C
<b>(G4S)3</b> линкер	IFN $\alpha$ 2a- (G4S)3- анти- CD40_HC	IFN $\beta$ - (G4S)3- анти- CD40_HC	IFN $\beta$ _C1 7S- (G4S)3- анти- CD40_H C	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-(G4S)3- анти-CD40_HC	IFN $\gamma$ - (G4S)3- анти- CD40_H C	IFN $\lambda$ 2- (G4S)3- анти- CD40_H C
<b>(G4S)4</b> линкер	IFN $\alpha$ 2a- (G4S)4- анти- CD40_HC	IFN $\beta$ - (G4S)4- анти- CD40_HC	IFN $\beta$ _C1 7S- (G4S)4- анти- CD40_H C	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-(G4S)4- анти-CD40_HC	IFN $\gamma$ - (G4S)4- анти- CD40_H C	IFN $\lambda$ 2- (G4S)4- анти- CD40_H C
<b><u>B</u></b>	<b>IFN<math>\epsilon</math></b>	<b>IFN<math>\omega</math></b>				
<b>RL</b> линкер	IFN $\epsilon$ -RL- анти- CD40_HC	IFN $\omega$ -RL- анти- CD40_HC				

<b>GST</b> линкер	IFN $\epsilon$ - GST- анти- CD40_HC	IFN $\omega$ - GST- анти- CD40_HC
<b>HL</b> линкер	IFN $\epsilon$ -HL- анти- CD40_HC	IFN $\omega$ -HL- анти- CD40_HC
<b>HL2</b> линкер	IFN $\epsilon$ - HL2- анти- CD40_HC	IFN $\omega$ - HL2- анти- CD40_HC
<b>(G4S)2</b> линкер	IFN $\epsilon$ - (G4S)2- анти- CD40_HC	IFN $\omega$ - (G4S)2- анти- CD40_HC
<b>(G4S)3</b> линкер	IFN $\epsilon$ - (G4S)3- анти- CD40_HC	IFN $\omega$ - (G4S)3- анти- CD40_HC
<b>(G4S)4</b> линкер	IFN $\epsilon$ - (G4S)4- анти- CD40_HC	IFN $\omega$ - (G4S)4- анти- CD40_HC

[00194] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления IFN слит с С-концом легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер, представленный в Таблице 5А или Таблице 5В. В этих вариантах осуществления легкая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 3. В других вариантах осуществления легкая цепь может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 59. IFN $\alpha$ 2a может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 17. IFN $\beta$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 или SEQ ID NO 16. IFN $\beta$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 14. IFN $\beta$ \_C17S может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 15. IFN $\beta$ \_C17S, N80Q может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 16. IFN $\gamma$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 19. IFN $\lambda$ 2 может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 18. IFN $\epsilon$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 80. IFN $\omega$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 79. Упомянутые линкеры представлены в Таблице 7.

[00195] В вариантах осуществления, где IFN слит с С-концом легкой цепи агонистического анти-CD40-антитела или его агонистического антигенсвязывающего

фрагмента, ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок дополнительно содержит тяжелую цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В более конкретных вариантах осуществления легкая цепь содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3, и тяжелая цепь содержит последовательность, представленную в 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, представленную в SEQ ID NO 59, и тяжелая цепь содержит последовательность, представленную в 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 анти-CD40 антитела 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>_C17 S</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>	анти- CD40_L C-RL- IFN $\alpha$ 2a	анти- CD40_LC -RL-IFN $\beta$	анти- CD40_LC- RL- IFN $\beta$ _C17 S	анти-CD40_LC- RL-IFN $\beta$ _C17S, N80Q	анти- CD40_LC -RL-IFN $\gamma$	анти- CD40_LC -RL- IFN $\lambda$ 2
<b>GST линкер</b>	анти- CD40_L C-GST- IFN $\alpha$ 2a	анти- CD40_LC -GST- IFN $\beta$	анти- CD40_LC- GST- IFN $\beta$ _C17 S	анти-CD40_LC- GST- IFN $\beta$ _C17S, N80Q	анти- CD40_LC -GST- IFN $\gamma$	анти- CD40_LC -GST- IFN $\lambda$ 2
<b>HL линкер</b>	анти- CD40_L C-HL- IFN $\alpha$ 2a	анти- CD40_LC -HL-IFN $\beta$	анти- CD40_LC- HL- IFN $\beta$ _C17 S	анти-CD40_LC- HL-IFN $\beta$ _C17S, N80Q	анти- CD40_LC -HL-IFN $\gamma$	анти- CD40_LC -HL- IFN $\lambda$ 2
<b>HL2 линкер</b>	анти- CD40_L C-HL2- IFN $\alpha$ 2a	анти- CD40_LC -HL2- IFN $\beta$	анти- CD40_LC- HL2- IFN $\beta$ _C17 S	анти-CD40_LC- HL2- IFN $\beta$ _C17S, N80Q	анти- CD40_LC -HL2- IFN $\gamma$	анти- CD40_LC -HL2- IFN $\lambda$ 2
<b>(G4S)2 линкер</b>	анти- CD40_L C- (G4S)2- IFN $\alpha$ 2a	анти- CD40_LC -(G4S)2- IFN $\beta$	анти- CD40_LC- (G4S)2- IFN $\beta$ _C17 S	анти-CD40_LC- (G4S)2- IFN $\beta$ _C17S, N80Q	анти- CD40_LC -(G4S)2- IFN $\gamma$	анти- CD40_LC -(G4S)2- IFN $\lambda$ 2

<b>(G4S)3 линкер</b>	анти- CD40_L C- (G4S)3- IFN $\alpha$ 2a	анти- CD40_LC -(G4S)3- IFN $\beta$	анти- CD40_LC- (G4S)3- IFN $\beta$ _C17 S	анти-CD40_LC- (G4S)3- IFN $\beta$ _C17S, N80Q	анти- CD40_LC -(G4S)3- IFN $\gamma$	анти- CD40_LC -(G4S)3- IFN $\lambda$ 2
<b>(G4S)4 линкер</b>	анти- CD40_L C- (G4S)4- IFN $\alpha$ 2a	анти- CD40_LC -(G4S)4- IFN $\beta$	анти- CD40_LC- (G4S)4- IFN $\beta$ _C17 S	анти-CD40_LC- (G4S)4- IFN $\beta$ _C17S, N80Q	анти- CD40_LC -(G4S)4- IFN $\gamma$	анти- CD40_LC -(G4S)4- IFN $\lambda$ 2
<b><u>B</u></b>	<b>IFN<math>\epsilon</math></b>	<b>IFN<math>\omega</math></b>				
<b>RL линкер</b>	анти- CD40_L C-RL- IFN $\epsilon$	анти- CD40_LC -RL-IFN $\omega$				
<b>GST линкер</b>	анти- CD40_L C-GST- IFN $\epsilon$	анти- CD40_LC -GST- IFN $\omega$				
<b>HL линкер</b>	анти- CD40_L C-HL- IFN $\epsilon$	анти- CD40_LC -HL-IFN $\omega$				
<b>HL2 линкер</b>	анти- CD40_L C-HL2- IFN $\epsilon$	анти- CD40_LC -HL2- IFN $\omega$				
<b>(G4S)2 линкер</b>	анти- CD40_L C- (G4S)2- IFN $\epsilon$	анти- CD40_LC -(G4S)2- IFN $\omega$				
<b>(G4S)3 линкер</b>	анти- CD40_L C- (G4S)3- IFN $\epsilon$	анти- CD40_LC -(G4S)3- IFN $\omega$				
<b>(G4S)4 линкер</b>	анти- CD40_L C- (G4S)4- IFN $\epsilon$	анти- CD40_LC -(G4S)4- IFN $\omega$				

[00196] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления IFN слит с N-

концом легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер, представленный в Таблице 6А или Таблице 6В. В этих вариантах осуществления легкая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 3 или SEQ ID NO 59. IFN $\alpha$ 2a может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 17. IFN $\beta$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 или SEQ ID NO 16. IFN $\beta$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 14. IFN $\beta$ \_C17S может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 15. IFN $\beta$ \_C17S,N80Q может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 16. IFN $\gamma$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 19. IFN $\lambda$ 2 может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 18. IFN $\epsilon$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 80. IFN $\omega$  может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO 79. Упомянутые линкеры представлены в Таблице 7.

[00197] В вариантах осуществления, где IFN слит с N-концом легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок дополнительно содержит тяжелую цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В более конкретных вариантах осуществления легкая цепь содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3, и тяжелая цепь содержит последовательность, представленную в 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, представленную в SEQ ID NO 59, и тяжелая цепь содержит последовательность, представленную в 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 анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента.

<b><u>A</u></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- анти- CD40_L C	IFN $\beta$ - RL- анти- CD40_L C	IFN $\beta$ _C17S- RL-анти- CD40_LC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-RL-анти- CD40_LC	IFN $\gamma$ -RL- анти- CD40_L C	IFN $\lambda$ 2- RL-анти- CD40_LC
<b>GST линкер</b>	IFN $\alpha$ 2a- GST- анти- CD40_L C	IFN $\beta$ - GST- анти- CD40_L C	IFN $\beta$ _C17S- GST-анти- CD40_LC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-GST-анти- CD40_LC	IFN $\gamma$ - GST- анти- CD40_L C	IFN $\lambda$ 2- GST- анти- CD40_LC

<b>HL</b> линкер	IFN $\alpha$ 2a- HL- анти- CD40_L C	IFN $\beta$ - HL- анти- CD40_L C	IFN $\beta$ _C17S- HL-анти- CD40_LC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-HL-анти- CD40_LC	IFN $\gamma$ -HL- анти- CD40_L C	IFN $\lambda$ 2- HL-анти- CD40_LC
<b>HL2</b> линкер	IFN $\alpha$ 2a- HL2- анти- CD40_L C	IFN $\beta$ - HL2- анти- CD40_L C	IFN $\beta$ _C17S- HL2-анти- CD40_LC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-HL2-анти- CD40_LC	IFN $\gamma$ - HL2- анти- CD40_L C	IFN $\lambda$ 2- HL2- анти- CD40_LC
<b>(G4S)2</b> линкер	IFN $\alpha$ 2a- (G4S)2- анти- CD40_L C	IFN $\beta$ - (G4S)2- анти- CD40_L C	IFN $\beta$ _C17S- (G4S)2- анти- CD40_LC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-(G4S)2- анти-CD40_LC	IFN $\gamma$ - (G4S)2- анти- CD40_L C	IFN $\lambda$ 2- (G4S)2- анти- CD40_LC
<b>(G4S)3</b> линкер	IFN $\alpha$ 2a- (G4S)3- анти- CD40_L C	IFN $\beta$ - (G4S)3- анти- CD40_L C	IFN $\beta$ _C17S- (G4S)3- анти- CD40_LC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-(G4S)3- анти-CD40_LC	IFN $\gamma$ - (G4S)3- анти- CD40_L C	IFN $\lambda$ 2- (G4S)3- анти- CD40_LC
<b>(G4S)4</b> линкер	IFN $\alpha$ 2a- (G4S)4- анти- CD40_L C	IFN $\beta$ - (G4S)4- анти- CD40_L C	IFN $\beta$ _C17S- (G4S)4- анти- CD40_LC	IFN $\beta$ _C17S, N80Q-(G4S)4- анти-CD40_LC	IFN $\gamma$ - (G4S)4- анти- CD40_L C	IFN $\lambda$ 2- (G4S)4- анти- CD40_LC
<b><u>B</u></b>	<b>IFN<math>\epsilon</math></b>	<b>IFN<math>\omega</math></b>				
<b>RL</b> линкер	IFN $\epsilon$ - RL- анти- CD40_L C	IFN $\omega$ - RL- анти- CD40_L C				
<b>GST</b> линкер	IFN $\epsilon$ - GST- анти- CD40_L C	IFN $\omega$ - GST- анти- CD40_L C				
<b>HL</b> линкер	IFN $\epsilon$ - HL- анти- CD40_L C	IFN $\omega$ - HL- анти- CD40_L C				



<b>HL2</b> линкер	IFN $\epsilon$ - HL2- анти- CD40_L C	IFN $\omega$ - HL2- анти- CD40_L C
<b>(G4S)2</b> линкер	IFN $\epsilon$ - (G4S)2- анти- CD40_L C	IFN $\omega$ - (G4S)2- анти- CD40_L C
<b>(G4S)3</b> линкер	IFN $\epsilon$ - (G4S)3- анти- CD40_L C	IFN $\omega$ - (G4S)3- анти- CD40_L C
<b>(G4S)4</b> линкер	IFN $\epsilon$ - (G4S)4- анти- CD40_L C	IFN $\omega$ - (G4S)4- анти- CD40_L C

[00198] Примеры последовательностей, содержащихся в ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белках по настоящему изобретению или их предшественниках, приведены в Таблице 7.

[00199] В иллюстративных предпочтительных вариантах осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержит слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28-47 или SEQ ID NO: 66-75. В других иллюстративных вариантах осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержит слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 81-88. В иллюстративных предпочтительных вариантах осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28-47 или SEQ ID NO: 66-75. В других иллюстративных вариантах осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 81-88. В других иллюстративных вариантах осуществления





88. В другом иллюстративном варианте осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический связывающий фрагмент, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO 88.

[00210] В более предпочтительных вариантах осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержит слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие 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. В более предпочтительных вариантах осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие 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. В других более предпочтительных вариантах осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержит слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательность, выбранную из SEQ ID NO 72, SEQ ID NO 73, SEQ ID NO 74 и SEQ ID NO 75. В еще одном более предпочтительном варианте осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательность, выбранную из SEQ ID NO 72, SEQ ID NO 73, SEQ ID NO 74 и SEQ ID NO 75.

[00211] В еще более предпочтительном варианте осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержит слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический связывающий фрагмент, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO 38. В другом еще более предпочтительном варианте осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический связывающий фрагмент, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO 38.

[00212] В другом еще более предпочтительном варианте осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержит слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический связывающий фрагмент, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO 39. В другом еще более предпочтительном варианте осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его



интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический связывающий фрагмент, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO 72. В другом еще более предпочтительном варианте осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический связывающий фрагмент, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO 72.

[00218] В другом еще более предпочтительном варианте осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержит слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический связывающий фрагмент, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO 73. В другом еще более предпочтительном варианте осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический связывающий фрагмент, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO 73.

[00219] В другом еще более предпочтительном варианте осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержит слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический связывающий фрагмент, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO 74. В другом еще более предпочтительном варианте осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический связывающий фрагмент, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO 74.

[00220] В другом еще более предпочтительном варианте осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержит слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический связывающий фрагмент, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO 75. В другом еще более предпочтительном варианте осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический связывающий фрагмент, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO 75.

Таблица 7. Последовательности приведенного в качестве примера ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка и его компонентов на основе анти-CD40 антитела 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, но не выделенные курсивом, соответствуют линкерам.

Мутированные аминокислоты подчеркнуты.

Название/SEQ ID NO	Последовательность
Сигнальный пептид 1 (SEQ ID NO 1)	<i>MGWSCIILFLVATATGVHS</i>
Сигнальный пептид 2 (SEQ ID NO 2)	<i>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC</i>
Легкая цепь анти-CD40 антитела (SEQ ID NO 3)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQA NIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Легкая цепь анти-CD40 антитела с сигнальным пептидом 1 (SEQ ID NO 4)	<i>MGWSCIILFLVATATGVHS</i> DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Легкая цепь анти-CD40 антитела с сигнальным пептидом 2 (SEQ ID NO 5)	<i>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC</i> DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Тяжелая цепь dK hIgG2 анти-CD40 антитела (SEQ ID NO 6)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVRKCCEPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
Тяжелая цепь dK hIgG2 анти-CD40 антитела с сигнальным пептидом 1 (SEQ ID NO 7)	<i>MGWSCIILFLVATATGVHS</i> QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVRKCCEPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV

	<p>HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>
<p>Тяжелая цепь dK hIgG2 анти-CD40 антитела с сигнальным пептидом 2 (SEQ ID NO 8)</p>	<p><i>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC</i>  <i>KASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQK</i>  <i>FQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTN</i>  <i>GVCSYFDYWGQGLTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG</i>  <i>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</i>  <i>PSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVA</i>  <i>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD</i>  <i>GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKV</i>  <i>SNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV</i>  <i>KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVD</i>  <i>KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i></p>
<p>Тяжелая цепь hIgG2 анти-CD40 антитела (SEQ ID NO 9)</p>	<p><i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPG</i>  <i>QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFKQGRVTMTRDTSISTAYMELNR</i>  <i>LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTLVTVSSAS</i>  <i>TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT</i>  <i>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNT</i>  <i>KVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE</i>  <i>VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR</i>  <i>VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE</i>  <i>PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE</i>  <i>NYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL</i>  <i>HNHYTQKSLSLSPGK</i></p>
<p>Тяжелая цепь hIgG2 анти-CD40 антитела с сигнальным пептидом 1 (SEQ ID NO 10)</p>	<p><i>MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG</i>  <i>YFTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFKQGR</i>  <i>VTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCS</i>  <i>YFDYWGQGLTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV</i>  <i>KDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVVPSN</i>  <i>FGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSV</i>  <i>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV</i>  <i>HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL</i>  <i>PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY</i>  <i>PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRW</i>  <i>QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i></p>
<p>Тяжелая цепь hIgG2 анти-CD40 антитела с сигнальным пептидом 2 (SEQ ID NO 11)</p>	<p><i>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC</i>  <i>KASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQK</i>  <i>FQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTN</i>  <i>GVCSYFDYWGQGLTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG</i>  <i>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</i>  <i>PSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVA</i>  <i>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD</i>  <i>GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKV</i>  <i>SNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV</i>  <i>KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVD</i>  <i>KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i></p>



<p>Тяжелая цепь hIgG1-NNAS анти-CD40 антитела  (SEQ ID NO 48)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>NNASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAK</u> GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>Тяжелая цепь hIgG1-NNAS-dK анти-CD40 антитела  (SEQ ID NO 49)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>NNASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAK</u> GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG</p>
<p>Тяжелая цепь области Fab hIgG2 анти-CD40 антитела  (SEQ ID NO 12)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKTVERKCCVE</p>
<p>Тяжелая цепь области Fab hIgG2 анти-CD40 антитела с сигнальным пептидом 1  (SEQ ID NO 13)</p>	<p><i>MGWSCIILFLVATATGVHS</i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGR VTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCS YFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVE</p>
<p>Тяжелая цепь области Fab hIgG2--TEV--6His меченного анти- CD40 антитела  (SEQ ID NO 50)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKTVERKCCVEENLYFQSHHHHHH</p>
<p>IFN<math>\beta</math> dM  (SEQ ID NO 76)</p>	<p>SYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIK QLQQFQKEDAALTIYEMLNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLAN VYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLK AKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNR</p>

IFN $\beta$ dM C17S (SEQ ID NO 77)	SYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIK QLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLAN VYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLK AKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNRN
IFN $\beta$ (SEQ ID NO 14)	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEI KQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLA NVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYL KAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNRN
IFN $\beta$ C17S (SEQ ID NO 15)	MSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEI KQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLA NVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYL KAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNRN
IFN $\beta$ C17S,N80Q (SEQ ID NO 16)	MSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEI KQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWQETIVENLLA NVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYL KAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNRN
IFN $\alpha$ 2a (SEQ ID NO 17)	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFG NQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELY QQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEK KYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
IFN $\lambda$ 2 (SEQ ID NO 18)	VPVARLHGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLL LKDCRCHSRFPRTWDLRQLQVRERPMALAEALATLKVLEATA DTPALVDVLDQPLHTLHHILSQFRACIQPQPTAGPRTRGRLHHW LYRLQEAPKKESPGCLEASVTFNLFRLLTRDLNVCVAGDLCV
IFN $\gamma$ (SEQ ID NO 19)	QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRK IMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKK RDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIVMAELSPAAGTGKRKRS QMLFRGRRASQ
IFN $\omega$ (SEQ ID NO 79)	LGCDLPQNHGLLSRNTLVLLHQMRRISPFLCLKDRRDFRFPQEM VKGSQIQKAHVMSVLHEMLQQIFSLFHTERSAAWNMTLLDQL HTGLHQQLQHLETCLLQVVGEGESAGAISSPALTLRRYFQGIRVY LKEKKYSDCAWEVVRMEIMKSLFLSTNMQERLRSKDRDLGSS
IFN $\epsilon$ (SEQ ID NO 80)	LDLKLIIFFQQRQVNQESLKLLNKLQTLISIQQCLPHRKNFLLPQKS LSPQQYQKGHTLAILHEMLQQIFSLFRANISLDGWEENHTEKFLI QLHQQLEYLEALMGLEAEKLSGTLGSDNLRQLVKMYFRRIHDY LENQDYSTCAWAIVQVEISRCLFFVFSLTEKLSKQGRPLNDMKQE LTTEFRSPR
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>AЕАААКЕАААКА</b>
HL2 линкер (SEQ ID NO 23)	<b>AЕАААКЕАААКААЕАААКЕАААКА</b>
(G4S)2 линкер (SEQ ID NO 24)	<b>GGGGSGGGGS</b>
(G4S)3 линкер (SEQ ID NO 25)	<b>GGGGSGGGGSGGGGS</b>
(G4S)4 линкер (SEQ ID NO 26)	<b>GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS</b>
TEV-6His метка (SEQ ID NO 27)	ENLYFQSHHHHHH
Анти-CD40_LC-- HL--IFN $\beta$ (SEQ ID NO 28)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECAEAAAKEAA AKAMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDI PEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVEN LLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIL HYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN
Анти-CD40_LC-- HL--IFN $\beta$ _C17S (SEQ ID NO 29)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECAEAAAKEAA AKAMSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDI PEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVEN LLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIL HYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN
Анти- CD40_hIgG2_dK_ HC--RL--IFN $\beta$ (SEQ ID NO 30)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNT KVDKTVRKKCCVECPKAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVELTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPMLDSGSEFLYSLKLVTDKSRWQQGNVVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGAPAMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNG RLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFR

	QDSSSTGWNENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGK LMSSLHLKRYYGRIHLYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRL TGYLRN
Анти- CD40_hIgG2_dK_ HC--RL-- IFN $\beta$ _C17S (SEQ ID NO 31)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHVWRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNT KVDKTVRKKCCVECPAPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVELTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPMLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGPA <b>P</b> AMSYNLLGFLQRSSNFQ <b>S</b> QKLLWQLNG RLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFR QDSSSTGWNENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGK LMSSLHLKRYYGRIHLYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRL TGYLRN
Анти- CD40_hIgG2_dK_ HC--HL--IFN $\beta$ (SEQ ID NO 32)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHVWRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNT KVDKTVRKKCCVECPAPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVELTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPMLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGA <b>EAAAKEAAA</b> KAMSYNLLGFLQRSSNFQ <b>C</b> QKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYE MLQNIFAIFRQDSSSTGWNENLLANVYHQINHLKTVLEEKLE EKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIHLYLKAKEYSHCAWTIVRVEI LRNFYFINRLTGYLRN
Анти- CD40_hIgG2_dK_ HC--HL-- IFN $\beta$ _C17S (SEQ ID NO 33)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHVWRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNT KVDKTVRKKCCVECPAPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVELTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPMLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGA <b>EAAAKEAAA</b> KAMSYNLLGFLQRSSNFQ <b>S</b> QKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYE MLQNIFAIFRQDSSSTGWNENLLANVYHQINHLKTVLEEKLE EKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIHLYLKAKEYSHCAWTIVRVEI LRNFYFINRLTGYLRN
Анти-CD40_LC--	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP

<p>RL--IFN<math>\beta</math> (SEQ ID NO 34)</p>	<p>NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<b>PAP</b>AMSYNL LGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQ FQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQ INHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEY SHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN</p>
<p>Анти-CD40_LC-- RL--IFN<math>\beta</math>_C17S (SEQ ID NO 35)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<b>PAP</b>AMSYNL LGFLQRSSNFQ<b>SQ</b>KLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQ FQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQ INHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEY SHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN</p>
<p>Анти-CD40_LC-- GST--IFN<math>\beta</math>_C17S (SEQ ID NO 36)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<b>SGGTS</b> <b>GTG</b>SMSYNLLGFLQRSSNFQ<b>SQ</b>KLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDI IPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVE NLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIL HYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN</p>
<p>Анти-CD40_LC-- HL2--IFN<math>\beta</math>_C17S (SEQ ID NO 37)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<b>AEAAAKEAA</b> <b>AKAAEAAAKEAAK</b>MSYNLLGFLQRSSNFQ<b>SQ</b>KLLWQLNGR LEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQ DSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKL MSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLT GYL RN</p>
<p>Анти- CD40_hIgG2_dK_ HC--(G4S)2-- IFN<math>\alpha</math>2a (SEQ ID NO 38)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHVWRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR LRSDDTAVYYCARDQLPGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNT KVDKTVRKKCCVECPKAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVELTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPMLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGSCDLPQTHSLGSRRTLMMLLA QMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQIF NLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTET</p>

	PLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
Анти- CD40_hIgG2_dK_ HC--(G4S)3-- IFN $\alpha$ 2a  (SEQ ID NO 39)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHVWRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNT KVDKTVRKCCEPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVELTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTKSKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPMLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEAL HNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSCDLPQTHSLGSRRT LMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQG VGVTEETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEI MRSFSLSTNLQESLRSKE
Анти- CD40_hIgG2_dK_ HC--(G4S)4-- IFN $\alpha$ 2a  (SEQ ID NO 40)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHVWRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNT KVDKTVRKCCEPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVELTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTKSKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPMLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEAL HNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSCDLPQTHS LGSRRRLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETI PVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEA CVIQGVGVTEETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWE VVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
Анти-CD40_LC-- (G4S)2--IFN $\alpha$ 2a  (SEQ ID NO 41)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTAATLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYAPREKVKWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGSGGG GSCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEF GNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTEETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKE KKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
Анти-CD40_LC-- (G4S)3--IFN $\alpha$ 2a  (SEQ ID NO 42)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTAATLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYAPREKVKWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGSGGG GSGGGGSCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFG FPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLD KFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTEETPLMKEDSILAVRKYFQRIT

	LYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
Анти-CD40_LC-- (G4S)4--IFN $\alpha$ 2a (SEQ ID NO 43)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC <b>GGGGSGGG</b> <b>GSGGGGSGGGG</b> SCDLPQTHSLGSRRTLMMLLAQMRKISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAW DETLDDKDYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
IFN $\beta$ --(G4S)3- анти-CD40_LC) (SEQ ID NO 44)	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEI KQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLA NVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYL KAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNR <b>GGGGSGGGGS</b> <b>GGGG</b> SDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGIYSWLAWYQQ KPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Анти-CD40_LC-- (G4S)4--IFN $\beta$ (SEQ ID NO 45)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC <b>GGGGSGGG</b> <b>GSGGGGSGGGGS</b> MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEY CLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSS TGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSL HLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL R N
IFN $\beta$ --(G4S)3- анти- CD40_HC_IgG1_ NNAS_dK (SEQ ID NO 46)	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEI KQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLA NVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYL KAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNR <b>GGGGSGGGGS</b> <b>GGGG</b> SQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHW VRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNNASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
Анти- CD40_HC_IgG1_ NNAS_dK--	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT

<p>(G4S)4--IFN<math>\beta</math> (SEQ ID NO 47)</p>	<p>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>NNASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAK</u> GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSMSYN LLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQ QFQKEDAALTIYEMLQNFIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYH QINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKE YSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNR</p>
<p>Анти-CD40_hIgG2 dK_HC--HL-- IFN<math>\alpha</math>2A (SEQ ID NO 81)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHVVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNT KVDKTVRKCCECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP VTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NYKTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGAEAAAKEAAAKACDLPQTHSLGSRRTLML LAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQ IFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGT ETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVR AEIMRSF SLSTNLQESLRSKE</p>
<p>Анти-CD40_LC- derivative--HL-- IFN<math>\alpha</math>2A (SEQ ID NO 82)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIY TASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGEKSLSLSPGAEAA <b>AAKEAAAKACDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRH</b> DFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYF QRITLYLKEKKYSPCAWEVVR AEIMRSFSLSTNLQESLRSKE</p>
<p>Анти-CD40_LC-- (G4S)4--IFN<math>\gamma</math> (SEQ ID NO 83)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIY TASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGEC<b>GGGGSGGG</b> <b>GSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFL</b> GILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKFNKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIVMA ELSPA AKTGKRKRSQMLFRGRRASQ</p>
<p>Анти-CD40_hIgG2 dK_HC--(G4S)4-- IFN<math>\gamma</math> (SEQ ID NO 84)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHVVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNT</p>



	<p>KVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE  VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR  VVSVELTAVHVDWLNGLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE  PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  NYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEAL  HNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDPYPVKE  AENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVS  FYFKLKFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKL  TNYSVTDLNVQRKAIHELIVMAELSPAACKTGKRKRSQMLFRG  RRASQ</p>
<p>Анти-CD40<sub>LC</sub>--  (G4S)<sub>4</sub>--IFN<math>\lambda</math><sub>2</sub>  (SEQ ID NO 85)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP  NLLIYTAATLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQ  ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT  LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGSGGG  GGGGGGSGGGGSPVARLHGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQA  FKRAKDALEESLLKDCRCHSRFPRTWDLRQLQVRERPMAL  AELALTLKVLEATADTDPALVDVLDQPLHTLHHILSQFRACIQPQ  PTAGPRTRGRLHHWLYRLQEAPKKESPGCLEASVTFNLFRLTRD  LNCVASGDLCV</p>
<p>Анти-CD40<sub>hIgG2</sub>  dK<sub>HC</sub>--(G4S)<sub>4</sub>--  IFN<math>\lambda</math><sub>2</sub>  (SEQ ID NO 86)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHVWRQAPG  QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR  LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSAS  TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNT  KVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE  VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR  VVSVELTAVHVDWLNGLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE  PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  NYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEAL  HNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSPVARLHG  ALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLKDCRCHS  RFPRTWDLRQLQVRERPMALAEALALTLKVLEATADTDPALVD  VLDQPLHTLHHILSQFRACIQPQPTAGPRTRGRLHHWLYRLQEAP  KKESPGCLEASVTFNLFRLTRDLNLCVASGDLCV</p>
<p>Анти-CD40<sub>LC</sub>--  (G4S)<sub>4</sub>--IFN<math>\omega</math>  (SEQ ID NO 87)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP  NLLIYTAATLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQ  ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT  LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGSGGG  GGGGGGSGGGGSLGCDLPQNHGLLSRNTLVLLHQMRRISPFLC  LKDRRDFRFPQEMVKGSQLQKAHVMSVLHEMLQQIFSLFHTER  SSAAWNMTLLDQLHTGLHQQQLHLETCLLQVVGEGESAGAISSP  ALTLRRYFQGIRVYLKEKKYSDCAWEVVRMEIMKSLFLSTNMQE  RLRSKDRDLGSS</p>
<p>Анти-CD40<sub>hIgG2</sub>  dK<sub>HC</sub>--(G4S)<sub>4</sub>--  IFN<math>\epsilon</math></p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHVWRQAPG  QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNR  LRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSSAS  TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT</p>

(SEQ ID NO 88)	SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNT KVDKTVERKCCVECPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLDLKLIIFQ QRQVNQESLKLNLKQLTSLIQQLPHRKNFLLPQKSLSPQQYQK GHTLAILHEMLQQIFSLFRANISLDGWEENHTEKFLIQLHQQLEY LEALMGLEAEKLSGTLGSDNRLQVKMYFRRIHDYLENQDYST CAWAIVQVEISRCLFFVFSLTEKLSKQGRPLNDMKQELTTEFRSP R
Анти-CD40_LC-- (G4S)3-- IFN $\beta$ _C17S (SEQ ID NO 94)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTAATLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC <b>GGGGSGGG</b> <b>GSGGGG</b> SMSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDR MNFDIPEEIKQLQFQKEDAALTIYEMLNIFAIFRQDSSSTGWN ETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKR YYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRLN

Таблица 8. Последовательности приведенного в качестве примера ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка и его компонентов на основе анти-CD40 антитела 3G5. Последовательности, выделенные курсивом, соответствуют сигнальным пептидам. Последовательности, выделенные жирным шрифтом, но не выделенные курсивом, соответствуют линкерам. Мутированные аминокислоты подчеркнуты.

Название/SEQ ID NO	Последовательность
Анти-CD40_легкая цепь (SEQ ID NO 59)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRL LIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTINSLQSEDFAVYYCQQHNK WITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Анти-CD40_легкая цепь с сигнальным пептидом 1	<i>MGWSCIIIFLVATATGVHSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSV</i> RSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIN SLQSEDFAVYYCQQHNKWITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C

(SEQ ID NO 60)	
Анти- CD40_тяжелая цепь hIgG2 dK (SEQ ID NO 61)	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGL EWVAVIWSDGSNKIFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKCCV ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS DGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
Анти- CD40_тяжелая цепь hIgG2 dK с сигнальным пептидом 1 (SEQ ID NO 62)	<i>MGWSCIIIFLVATATGVHS</i> QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFT FSSNGIHWVRQAPGKGLEWVAVIWSDGSNKIFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGL VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DH KPSNTKVDKTV ERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
Тяжелая цепь области Fab hIgG2 анти- CD40 антитела (SEQ ID NO 63)	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGL EWVAVIWSDGSNKIFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKCCV E
Тяжелая цепь области Fab hIgG2 анти- CD40 антитела с	<i>MGWSCIIIFLVATATGVHS</i> QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFT FSSNGIHWVRQAPGKGLEWVAVIWSDGSNKIFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGL VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW

<p>сигнальным пептидом 1 (SEQ ID NO 64)</p>	<p>NSGALTS<del>GVHTFPAVLQSSGLY</del>SLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV<del>DH</del> KPSNTKVDK<del>TVERKCCVE</del></p>
<p>Тяжелая цепь области Fab hIgG2--TEV-- 6His меченного анти-CD40 антитела (SEQ ID NO 65)</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGKSLRLS<del>CAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGL</del> EWVAVI<del>WSDGSNKFYADSVKGRFTISRDN</del>SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGT<del>LVTVSSASTKGPSVFPLAP</del> CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<del>GVHTFPAVLQ</del> SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV<del>DH</del>KPSNTKVDK<del>TVERKCCV</del> EENLYFQSHHHHHH</p>
<p>Анти-CD40_hIgG2 dK_HC--RL-- IFNβdM (SEQ ID NO 66)</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGKSLRLS<del>CAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGL</del> EWVAVI<del>WSDGSNKFYADSVKGRFTISRDN</del>SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGT<del>LVTVSSASTKGPSVFPLAP</del> CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<del>GVHTFPAVLQ</del> SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV<del>DH</del>KPSNTKVDK<del>TVERKCCV</del> ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS<del>VLTVVHQD</del>WLN GKEYKCKVSNKGLPAPIEK<del>TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN</del> QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<del>TPPMLDS</del>DG<del>SFFLY</del> SKLTVDKSRWQQGNV<del>FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</del><b>PAP</b>ASY NLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLN<del>GRLEYCLKDRMNF</del>DIPEEIKQLQ QFQKEDAALTIYEMLQ<del>NIFAIFRQDSSSTG</del>WNETIVENLLANVYHQ INHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRY<del>YGRILHYLKAKEYS</del> HCAWTIVRVEILRN<del>FYFINRLTGYLRN</del></p>
<p>Анти-CD40_hIgG2 dK_HC--RL-- IFNβdM_C17S (SEQ ID NO 67)</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGKSLRLS<del>CAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGL</del> EWVAVI<del>WSDGSNKFYADSVKGRFTISRDN</del>SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGT<del>LVTVSSASTKGPSVFPLAP</del> CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<del>GVHTFPAVLQ</del> SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV<del>DH</del>KPSNTKVDK<del>TVERKCCV</del> ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS<del>VLTVVHQD</del>WLN GKEYKCKVSNKGLPAPIEK<del>TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN</del></p>

	<p>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDGSSFFLY  SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGPAPASY  NLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQ  QFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQ  INHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYS  HCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNRN</p>
<p>Анти-  CD40_hIgG2  dK_HC--HL--  IFNβdM  (SEQ ID NO 68)</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGKSLRSLCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGL  EWVAVIWSGDGSKNFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED  TAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP  CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKCCV  ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLN  GKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDGSSFFLY  SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAEAAA  <b>KEAAAK</b>ASYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMN  FDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIV  ENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRI  LHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNRN</p>
<p>Анти-  CD40_hIgG2  dK_HC--HL--  IFNβdM_C17S  (SEQ ID NO 69)</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGKSLRSLCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGL  EWVAVIWSGDGSKNFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED  TAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP  CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKCCV  ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLN  GKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDGSSFFLY  SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAEAAA  <b>KEAAAK</b>ASYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNF  DIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVE  NLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIL</p>

	HYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRN
Анти-CD40_LC- -HL2-- IFN $\beta$ _C17S (SEQ ID NO 70)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRL LIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTINSLQSEDFAVYYCQQHNK WITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC <b>AEEAAKEAAAKAAE</b> <b>AAAKEAAAK</b> AMSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLK DRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGW NETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKR YYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRN
Анти-CD40_LC- -(G4S)3-- IFN $\beta$ _C17S (SEQ ID NO 71)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRL LIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTINSLQSEDFAVYYCQQHNK WITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC <b>GGGGSGGGGSGGGG</b> <b>S</b> MSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEI KQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWN <b>NETIVENLLAN</b> <b>VYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRY</b> YYGRILHYLKA KEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRN
Анти- CD40_hIgG2 dK_HC--(G4S)2- -IFN $\alpha$ 2a (SEQ ID NO 72)	QVQLVESGGGVVQPGLSLRSLCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGL EWVAVIWSDGSNKIFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRRAED TAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCV ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSIVLTVVHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG <b>GGGGG</b> <b>GGGG</b> SCDLPQTHSLGSRRTLM <b>LLA</b> QMRKISLFSCLKDRHDFGFPQ EEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYT ELYQQLNDLEACVIQGVGVTEPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKE KKYSPCAWEVVR <b>AEIMRSFSLSTNLQESLRSKE</b>

<p>Анти- CD40_hIgG2 dK_HC--(G4S)3- -IFN<math>\alpha</math>2a  (SEQ ID NO 73)</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGL EWVAVIWSDGSNKIFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ERKCCV ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS DGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS <b>GGGGSGGGGSCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRH</b> DFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETL LDKFYTELYQQLN DLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE</p>
<p>Анти- CD40_hIgG2 dK_HC--(G4S)4- -IFN<math>\alpha</math>2a  (SEQ ID NO 74)</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGL EWVAVIWSDGSNKIFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ERKCCV ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS DGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS <b>GGGGSGGGGSGGGGSCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCL</b> LKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAA WDETL LDKFYTELYQQLN DLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE</p>
<p>Анти- CD40_hIgG2 dK_HC--HL-- IFN<math>\alpha</math>2a  (SEQ ID NO 75)</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGL EWVAVIWSDGSNKIFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ERKCCV</p>

	<p>ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLN  GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLY  SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAEAAA  <b>KEAAAK</b>ACDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGF  PQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKF  YTELYQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYL  KEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE</p>
<p>Анти-CD40  _hIgG2 dK_HC--  (G4S)4--IFN<math>\gamma</math>  <input type="checkbox"/> SEQ ID NO  93<input type="checkbox"/></p>	<p>QVQLVESGGGVVQPQKSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGL  EWVAVIWSGDSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED  TAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP  CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  SGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKCCV  ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLN  GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLY  SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS  <b>GGGSGGGSGGGGS</b>QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGT  LFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIK  EDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIVMA  ELSPA AKTGKRKRSQMLFRGRRASQ</p>

[00221] В предпочтительных вариантах осуществления ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки, представленные в настоящем описании, представляют собой слитые с интерфероном антигенсвязывающие белки, содержащие полипептиды, полученные из полипептидов, приведенных в Таблице 9, в частности Таблице 9А или Таблице 9В, более конкретно приведенной ниже Таблице 9А, и в частности 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, приведенных выше. В предпочтительных вариантах осуществления ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки, представленные в настоящем описании, представляют собой слитые с интерфероном антигенсвязывающие белки, состоящие из полипептидов, полученных из полипептидов, приведенных в Таблице 9, в частности Таблице 9А или Таблице 9В, более конкретно приведенной ниже Таблице 9А, и в частности 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, указанных выше. В более предпочтительных вариантах осуществления слитое с интерфероном антитело содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO 38 и SEQ ID NO 3. В других более предпочтительных вариантах осуществления слитое с интерфероном антитело содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO 39 и SEQ ID NO 3. В других более предпочтительных вариантах осуществления слитое с интерфероном антитело содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO 40 и SEQ ID NO 3. В других более предпочтительных вариантах осуществления слитое с интерфероном антитело содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO 41 и SEQ ID NO 9. В других более предпочтительных вариантах осуществления слитое с интерфероном антитело содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO 42 и SEQ ID NO 9. В других более предпочтительных вариантах осуществления слитое с интерфероном антитело содержит последовательности, представленные в 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 анти-CD40 антитела CP870,893, их средние значения  $EC_{50}$  с учетом активации путей CD40 и IFN и продуктивности (т.е. выхода на литр культуры). Каждая указанная комбинация последовательностей содержится в соответствующем IFA в двух экземплярах. SN: супернатант.

Слитое с интерфероном антитело (IFA)	Комбинация последовательностей	CD40 $EC_{50}$ (нг/мл)	IFN $\beta$ $EC_{50}$ (нг/мл)	IFN $\alpha$ $EC_{50}$ (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

	9)				
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)	актив. (SN)	актив. (SN)		нет значимого уровня продуцирования
IFA35	(SEQ ID NO 45) + (SEQ ID NO 49)	актив. (SN)	актив. (SN)		нет значимого уровня продуцирования
IFA36	(SEQ ID NO 46) + (SEQ ID NO 3)	актив. (SN)	актив. (SN)		нет значимого уровня продуцирования
IFA37	(SEQ ID NO 47) + (SEQ ID NO 3)	актив. (SN)	актив. (SN)		нет значимого уровня продуцирования
IFA126	(SEQ ID NO 94) + (SEQ ID NO 9)	364,05	2,075		не определено

## В

Слитое с интерфер оном антителом (IFA)	Комбинация последователь ностей	CD40	IFN $\alpha$	IFN $\lambda$	IFN $\gamma$	IFN $\epsilon$	IFN $\omega$	продуктив ность (мг/л)
		EC <sub>50</sub> (нг/мл)	EC <sub>50</sub> (нг/мл)	EC <sub>50</sub> (нг/мл)	EC <sub>50</sub> (нг/мл)	EC <sub>50</sub> (нг/мл)	EC <sub>50</sub> (нг/мл)	
IFA38	(SEQ ID NO 81) + (SEQ ID NO	22,7	3,77					1,32

	3)							
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

[00223] В других предпочтительных вариантах осуществления ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки, представленные в настоящем описании, представляют собой слитые с интерфероном антигенсвязывающие белки, содержащие полипептиды, полученные из полипептидов, приведенных ниже в Таблице 10. В предпочтительных вариантах осуществления ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки, представленные в настоящем описании, представляют собой слитые с интерфероном антигенсвязывающие белки, состоящие из полипептидов,

полученных из полипептидов, приведенных в Таблице 10 ниже.

Таблица 10. Комбинации полипептидов, обнаруженные в предпочтительных слитых с интерфероном антигенсвязывающих белках по изобретению на основе анти-CD40 антитела 3G5, их средние значения  $EC_{50}$  с учетом активации путей CD40 и IFN. Каждая указанная комбинация последовательностей содержится в соответствующем в двух экземплярах IFA. SN: супернатант.

## А

Слитое с интерфероном антитело (IFA)	Комбинация последовательностей	CD40 $EC_{50}$ (нг/мл)	IFN $\beta$ $EC_{50}$ (нг/мл)	IFN $\alpha$ $EC_{50}$ (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)	актив. (SN)	актив. (SN)		нет значимого уровня продуцирования
IFA115	(seq ID NO 71) + (seq ID NO 61)	актив. (SN)	актив. (SN)		нет значимого уровня продуцирования
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

## В

Слитое с интерфероном антитело	Комбинация последовательностей	CD40 $EC_{50}$ (нг/мл)	IFN $\alpha$ $EC_{50}$ (нг/мл)	IFN $\lambda$ $EC_{50}$ (нг/мл)	IFN $\gamma$ $EC_{50}$ (нг/мл)	IFN $\epsilon$ $EC_{50}$ (нг/мл)	IFN $\omega$ $EC_{50}$ (нг/мл)	продуктивность (мг/л)
--------------------------------	--------------------------------	------------------------	--------------------------------	---------------------------------	--------------------------------	----------------------------------	--------------------------------	-----------------------

<b>(IFA)</b>								
IFA125	(seq ID NO 93) + (seq ID NO 59)	8,8			0,142			1,79

Нуклеиновые кислоты и векторы экспрессии

[00224] В одном из аспектов предложена комбинация полинуклеотидов, кодирующих ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок. Также предложены способы получения ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка, включающие экспрессию этих полинуклеотидов.

[00225] В некоторых вариантах осуществления представлена нуклеиновая кислота, кодирующая IFN или его функциональный фрагмент, слитая с агонистическим анти-CD40 антителом или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует IFN или его функциональный фрагмент, слитый с агонистическим анти-CD40 антителом или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом, с любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO 93-94, или он кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, идентичной на по меньшей мере на 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% нуклеиновой кислоте, кодирующей любую из этих последовательностей. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления указанная нуклеиновая кислота является на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной нуклеиновой кислоте, кодирующей любую из SEQ ID NO: от 93 до 94. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует IFN или его функциональный фрагмент, слитый с агонистическим анти-CD40 антителом или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом, с любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO 81-88, или он кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, идентичной на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% нуклеиновой кислоте, кодирующей любую из этих последовательностей. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления указанная нуклеиновая кислота на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична нуклеиновой кислоте, кодирующей любую из SEQ ID NO: от 81 до 88. В предпочтительных вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует IFN или его функциональный фрагмент, слитый с агонистическим анти-CD40 антителом или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом, с любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO 28-47, или он кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, идентичной на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере

99% нуклеиновой кислоте, кодирующей любую из этих последовательностей. В еще более конкретных вариантах осуществления указанная нуклеиновая кислота является на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной нуклеиновой кислоте, кодирующей любую из SEQ ID NO 28-47. В других предпочтительных вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует IFN или его функциональный фрагмент, слитый с агонистическим анти-CD40 антителом или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом, с любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO 66-75, или он кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична нуклеиновой кислоте, кодирующей любую из этих последовательностей. В еще более конкретных вариантах осуществления указанная нуклеиновая кислота на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична нуклеиновой кислоте, кодирующей любую из SEQ ID NO: 66-75.

[00226] В тех вариантах осуществления, где нуклеиновая кислота кодирует IFN или его функциональный фрагмент, слитый с легкой цепью агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновая кислота может дополнительно кодировать тяжелую цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В более конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 49 или SEQ ID NO 50, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична нуклеиновой кислоте, кодирующей любую из этих последовательностей. В еще более конкретных вариантах осуществления указанная нуклеиновая кислота является на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной нуклеиновой кислоте, кодирующей SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 49 или SEQ ID NO 50. В других более конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 61, SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 63, SEQ ID NO 64 или SEQ ID NO 65, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична нуклеиновой кислоте, кодирующей любую из этих последовательностей. В других таких еще более конкретных вариантах осуществления указанная нуклеиновая кислота является на по меньшей мере на 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной нуклеиновой кислоте,

кодирующей SEQ ID NO 61, SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 63, SEQ ID NO 64 или SEQ ID NO 65.

[00227] В тех вариантах осуществления, где нуклеиновая кислота кодирует IFN или его функциональный фрагмент, слитый с тяжелой цепью агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновая кислота может дополнительно кодировать легкую цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента. В более конкретных вариантах осуществления легкая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4 или SEQ ID NO 5, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична нуклеиновой кислоте, кодирующей любую из этих последовательностей. В еще более конкретных вариантах осуществления указанная нуклеиновая кислота является на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной 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 анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 59 или SEQ ID NO 60, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична нуклеиновой кислоте, кодирующей любую из этих последовательностей. В еще более конкретных вариантах осуществления указанная нуклеиновая кислота является на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной нуклеиновой кислоте, кодирующей SEQ ID NO 59 или SEQ ID NO 60.

[00228] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, представленные в настоящем описании, могут содержать последовательность, кодирующую последовательность, позволяющую увеличить выход (например, метка растворимости) или облегчить очистку экспрессированных белков (т.е. метку очистки). Метки очистки известны специалисту в данной области и могут быть выбраны из меток на основе глутатион-S-трансферазы (GST), меток на основе мальтозосвязывающего белка (MBP), меток на основе кальмодулинсвязывающего пептида (CBP), меток на основе интеин-хитинсвязывающего домена (интеин-CBD), меток на основе стрептавидина/биотина (например, метки на основе сигнального пептида биотинилирования (BCSP), метки на основе стрептавидин-связывающего пептида (SBP)), меток His-patch ThioFusion, меток тандемной аффинной очистки (TAP), меток на основе малого убиквитиноподобного модификатора (SUMO), HaloTag® (Promega), системы Profinity eXact™ (Bio-Rad). В некоторых вариантах осуществления изобретения метка очистки может представлять собой полигистидиновую метку (например, His<sub>6</sub>-, His<sub>7</sub>-, His<sub>8</sub>-,

His<sub>9</sub>- или His<sub>10</sub>-метку). В других вариантах осуществления метка очистки может представлять собой Strep-метку (например, Strep-tag® или Strep-tag II®; IBA Life Sciences). В других вариантах осуществления метка очистки может представлять собой мальтозосвязывающий белок (MBP).

[00229] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать последовательность, кодирующую сайт расщепления для удаления метки очистки. Такие последовательности расщепления известны специалисту в данной области и могут быть выбраны из последовательности, распознаваемой и расщепляемой эндопротеазой или экзопроптазой. В некоторых вариантах осуществления эндопротеаза для удаления метки очистки может быть выбрана из: энтеропептидазы, тромбина, фактора Ха, протеазы TEV или протеазы риновируса ЗС. В некоторых вариантах осуществления экзопроптаза для удаления метки очистки может быть выбрана из: карбоксипептидазы А, карбоксипептидазы В или DAPазы. В предпочтительных вариантах осуществления протеазой для удаления метки очистки является протеаза TEV. В более конкретном предпочтительном варианте осуществления нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую His<sub>6</sub>-метку и сайт расщепления TEV. В еще более предпочтительном конкретном варианте осуществления указанная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID NO 27.

[00230] Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению также могут содержать последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Специалисту известны различные сигнальные пептиды, доступные для нацеливания экспрессированного белка на желаемый участок фолдинга, сборки и/или созревания, а также для воздействия на секрецию конечного белка в среде для облегчения последующей обработки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой секреторный сигнальный пептид. Кодированный сигнальный пептид может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления сигнальный пептид содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

[00231] Сигнальный пептид 1 (SEQ ID NO 1) использовали для синтеза полипептидных последовательностей, представленных в 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, изначально присутствующий на N-конце соответствующей последовательности полипептида, отщепляется во время синтеза.

[00232] Сигнальный пептид 2 (SEQ ID NO 2) использовали для синтеза полипептидных последовательностей, представленных в 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, изначально присутствующий на N-конце соответствующей последовательности полипептида, отщепляется во время синтеза.

[00233] Для синтеза полипептидных последовательностей, представленных в 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: ID NO 88 использовали сигнальный пептид MGWSCILFLVATATGVHS (SEQ ID NO 1). Такой сигнальный пептид, изначально присутствующий на N-конце соответствующей последовательности полипептида, отщепляется во время синтеза.

[00234] Для синтеза полипептидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO 93 и SEQ ID NO 94, использовали сигнальный пептид 1 (SEQ ID NO 1). Такой сигнальный пептид, изначально присутствующий на N-конце соответствующей последовательности полипептида, отщепляется во время синтеза.

[00235] Полинуклеотиды, кодирующие IFN или его функциональный фрагмент, слитые с агонистическим анти-CD40 антителом или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом, представленным в настоящем описании, обычно встраивают в вектор экспрессии для введения в клетки-хозяева, которые можно использовать для получения желаемого количества описанных или заявленных ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белков. Соответственно, в некоторых аспектах изобретение относится к векторам экспрессии, содержащим полинуклеотиды, представленные в настоящем описании, и клеткам-хозяевам, содержащим эти векторы и полинуклеотиды.

[00236] Термин «вектор» или «вектор экспрессии» используется в настоящем описании и формуле изобретения и означает векторы, используемые 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. В общем случае, векторы, совместимые с настоящим изобретением, будут содержать маркер селекции, соответствующие сайты рестрикции для облегчения клонирования желаемого гена и обеспечения возможности проникать и/или реплицироваться в эукариотических или прокариотических клетках.

[00237] Для целей настоящего изобретения можно использовать многочисленные системы векторов экспрессии. Например, в одном из классов векторов используются элементы ДНК, полученные из вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус коровьей оспы, бакуловирус, ретровирусы (RSV, MMTV или MOMLV) или вирус SV40. Другие примеры включают использование полицистронных систем с внутренними сайтами связывания рибосом. Кроме того, клетки, которые интегрировали ДНК в свои хромосомы, можно отбирать путем введения одного или более маркеров, позволяющих отбирать трансфицированные клетки-хозяева. Маркер может обеспечивать прототрофию по отношению к

ауксотрофному хозяину, устойчивость к биоцидам (например, антибиотикам) или устойчивость к тяжелым металлам, таким как медь. Ген маркера селекции может быть связан либо непосредственно с последовательностями ДНК, подлежащими экспрессии, либо введен в ту же клетку путем котрансформации. Для оптимального синтеза мРНК также могут быть необходимы дополнительные элементы. Эти элементы могут включать сигнальные последовательности, сигналы сплайсинга, а также промоторы транскрипции, энхансеры и сигналы терминации. В некоторых вариантах осуществления клонированные гены варибельной области, один из которых слит с геном, кодирующим IFN или его функциональный фрагмент, встраивают в вектор экспрессии вместе с генами константной области тяжелой и легкой цепей (такими как человеческие гены), синтезированными, как обсуждалось выше.

[00238] В других вариантах осуществления векторная система по настоящему 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 анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, и второй вектор для экспрессии тяжелой цепи агонистического анти-CD40 антитела 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 анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, и второй вектор для экспрессии легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента.

[00239] В других вариантах осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, представленный в настоящем описании, может быть экспрессирован с помощью полицистронных конструкций. В таких системах экспрессии многочисленные представляющие интерес генные продукты, такие как продукты, кодирующие IFN или его функциональный фрагмент, слитые с тяжелой цепью агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, и кодирующие легкую цепь указанного антитела, или кодирующие IFN или его функциональный фрагмент, слитые с легкой цепью агонистического анти-CD40 антитела 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 входа в рибосому (IRES) для обеспечения относительно высоких уровней полипептидов в эукариотических клетках-хозяевах. Подходящие последовательности IRES раскрыты в патенте США № 6193980, который включен в описание посредством ссылки. Специалисты в данной области поймут, что такие системы экспрессии можно использовать для эффективного получения всего спектра полипептидов, раскрытых в настоящей заявке.

[00240] В более общем смысле, после получения вектора или последовательности ДНК, кодирующей ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению, вектор экспрессии может быть введен в соответствующую клетку-хозяина. Иными словами, клетка-хозяин может быть трансформирована. Введение плазмиды в клетку-хозяина можно осуществить различными методами, хорошо известными специалистам в данной области. К ним относятся, помимо прочего, трансфекция (включая электрофорез и электропорацию), слияние протопластов, осаждение фосфатом кальция, слияние клеток с оболочечой ДНК, микроинъекция и инфицирование 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 продуцирования легких и тяжелых цепей, и анализируют синтез белков тяжелых и/или легких цепей. Типичные методы анализа включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) или анализ с помощью активируемого флуоресценцией сортировщика клеток (FACS), иммуногистохимию и т.п.

[00241] В настоящем описании термин «трансформация» следует использовать в широком смысле для обозначения введения ДНК в клетку-реципиента с изменением генотипа и, следовательно, изменениям в клетке-реципиенте.

[00242] Аналогично, «клетки-хозяева» относятся к клеткам, которые были трансформированы векторами, сконструированными методами рекомбинантной ДНК и кодирующими по меньшей мере один гетерологичный ген. В описаниях способов выделения полипептидов из рекомбинантных хозяев термины «клетка» и «клеточная культура» используются взаимозаменяемо для обозначения источника ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка, если в явном виде не указано иное. Другими словами, извлечение полипептида из «клеток» может означать извлечение либо из центрифугированных цельных клеток, либо из клеточной культуры, содержащей как среду, так и суспендированные клетки.

[00243] В одном из вариантов осуществления линия клеток-хозяев, используемая для экспрессии ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка, имеет эукариотическое или прокариотическое происхождение. В настоящем описании термин «экспрессия» может включать транскрипцию и трансляцию более чем одной полипептидной цепи (например, тяжелой и легкой цепей фрагмента антитела ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка), которые связываются с образованием конечного ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка. В одном из вариантов осуществления линия клеток-хозяев, используемая для экспрессии ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка, имеет бактериальное происхождение. В одном из вариантов осуществления линия клеток-хозяев, используемая для экспрессии ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка, происходит от млекопитающих; специалисты в данной области могут определить конкретные линии клеток-хозяев, которые лучше всего подходят для экспрессии в них

желаемого генного продукта. Типичные линии клеток-хозяев включают, помимо прочего, GS нокаутные CHO K1 от Horizon, DG44 и DUXB11 (линии клеток яичников китайского хомячка, минус DHFR), HELA (карцинома шейки матки человека), CV1 (линия клеток почек обезьяны), COS (производное CV1 с Т-антигеном SV40), R1610 (фибробласты китайского хомячка), BALBC/3T3 (мышинные фибробласты), HAK (линия клеток почек хомячка), SP2/O (мышинная миелома), BFA-1c1BPT (бычьи эндотелиальные клетки), RAJI (лимфоциты человека), HEK 293 (клетки человеческой почки). В предпочтительном варианте осуществления можно использовать клетки HEK FS S11/254. В другом предпочтительном варианте осуществления можно использовать клетки CHO K1 GS от Horizon. В одном из вариантов осуществления клеточная линия обеспечивает измененное гликозилирование, например афукозилирование, антитела, экспрессируемого ею (например, клеточные линии CHO с нокаутом FUT8 (клетки POTELLIGENTTM) (Biowa, Princeton, NJ). В одном из вариантов осуществления можно использовать клетки NS0. Линии клеток-хозяев обычно доступны в коммерческих службах, Американской коллекции тканевых культур или из доступных литературных источников.

[00244] В одном из вариантов осуществления хозяин, используемый для экспрессии ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка, представляет собой нечеловеческое трансгенное животное или трансгенное растение.

[00245] Ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению также можно получать трансгенно путем создания животного, отличного от человека (например, млекопитающего) или растения, которое является трансгенным по представляющим интерес последовательностям и продуцированию ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка в извлекаемой из него форме. В случае трансгенного продуцирования у млекопитающих ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки могут быть получены и выделены из молока коз, коров или других млекопитающих. См., например, патенты США №№ 5827690, 5756687, 5750172 и 5741957. Типичными растениями-хозяевами являются *Nicotiana*, *Arabidopsis*, ряска, кукуруза, пшеница, картофель и т.д. Способы экспрессии антител в растениях, включая описание промоторов и векторов, а также способы трансформации растений известны в данной области. См., например, патент США 6517529, включенный в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления трансгенные животные или растения, отличные от человека, получают путем введения одной или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению, животному или растению стандартными методами получения трансгенных организмов. См. Hogan и патент США № 6417429. Трансгенные клетки, используемые для создания 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., *Manipulations the Mouse Embryo: A Laboratory Guide*, 2nd ed., Cold Spring Harbour Press

(1999); Jackson et al., *Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach*, Oxford University Press (2000); and Pinkert, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press (1999). В некоторых вариантах осуществления трансгенные животные, отличные от человека, имеют целевое нарушение и замену, обеспеченную нацеливающей конструкцией, которая кодирует представляющую(ие) интерес последовательность(и). Ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки могут быть получены в организме любого трансгенного животного. В предпочтительном варианте осуществления животные, отличные от человека, представляют собой мышей, крыс, овец, свиней, коз, крупный рогатый скот или лошадей. Трансгенное животное, отличное от человека, экспрессирует указанные ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки в крови, молоке, моче, слюне, слезной жидкости, слизи и других жидкостях организма.

[00246] Продуцирование *in vitro* позволяет масштабировать производство для получения больших количеств желаемых ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белков. Методы культивирования клеток млекопитающих в условиях культуры тканей известны в данной области техники и включают гомогенную суспензионную культуру, например, в эрлифтном реакторе или в реакторе с непрерывной мешалкой, или в иммобилизованной или захваченной культуре клеток, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на агарозных микрогранулах или керамических картриджах. При необходимости и/или желании раствор ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка можно очистить обычными методами хроматографии, например, гель-фильтрацией, ионообменной хроматографией, хроматографией на DEAE-целлюлозе и/или (иммуно-)аффинной хроматографией.

[00247] Один или более генов, кодирующих ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, также могут быть экспрессированы в клетках немлекопитающих, таких как бактерии или дрожжи, или растительные клетки. В этом отношении следует понимать, что различные одноклеточные микроорганизмы, не относящиеся к млекопитающим, такие как бактерии, также могут быть трансформированы; т.е., их можно выращивать в культурах или ферментировать. Бактерии, которые подвержены трансформации, включают представителей энтеробактерий, таких как штаммы *Escherichia coli* или *Salmonella*; Bacillaceae, например *Bacillus subtilis*; Pneumococcus; Streptococcus, и *Haemophilus influenzae*. Кроме того, следует понимать, что при экспрессии в бактериях ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки по изобретению или их компоненты (т.е. агонистические анти-CD40 антитела или их агонистические антигенсвязывающие фрагменты, а также интерфероны или функциональные фрагменты интерферонов) могут становиться частью телец включения. Желаемые ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки затем могут быть выделены, и необязательно подвернуты рефолдингу и очистке.

[00248] Помимо прокариотов, также можно использовать эукариотические микроорганизмы. Среди эукариотических микроорганизмов наиболее часто используемыми являются *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, хотя

широко доступен ряд других штаммов. Для экспрессии в *Saccharomyces* используется, например, 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 обеспечивает маркер селекции для мутантного штамма дрожжей, лишенного способности расти в триптофане, например ATCC № 44076 или PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). Нарушение гена *trp1* в качестве характеристики генома дрожжевой клетки-хозяина обеспечивает эффективную среду для детектирования трансформации путем культивирования клетки в отсутствие триптофана.

#### Терапевтические векторы

[00249] Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, может быть вставлена в вектор и использована в качестве терапевтического вектора, например вектора, который экспрессирует ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению. Конструирование подходящих функциональных экспрессирующих конструкций и терапевтических векторов экспрессии известно обычному специалисту в данной области. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок можно вводить субъекту посредством генетической доставки последовательностей РНК или ДНК, вектора или векторной системы, кодирующих ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок.

[00250] Терапевтические векторы можно доставлять субъекту, например, посредством внутривенной инъекции, местного введения (см. патент США № 5328470) или стереотаксической инъекции (см., например, Chen et al., *PNAS* 91:3054-3057 (1994)). Фармацевтический препарат терапевтического вектора может включать вектор в приемлемом разбавителе.

[00251] Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, кодирующий нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты, может быть включен в генную конструкцию, предназначенную для использования в качестве части протокола терапии для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок. Предложены векторы экспрессии для трансфекции *in vivo* и экспрессии ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка.

[00252] Экспрессирующие конструкции таких компонентов можно вводить в любом биологически эффективном носителе, например, в любом составе или композиции, способной эффективно доставлять последовательность нуклеиновой кислоты компонента в клетки *in vivo*, известном обычному специалисту в данной области. Подходы включают, без ограничения, встраивание рассматриваемой последовательности нуклеиновой кислоты в вирусные векторы, включая, без ограничения, векторы на основе рекомбинантных ретровирусов, аденовируса, аденоассоциированного вируса и вируса простого герпеса-1, рекомбинантные бактериальные или эукариотические плазмиды и т.п.

[00253] Для переноса последовательностей экзогенных нуклеиновых кислот *in vivo*, в частности человеку, в качестве рекомбинантной системы доставки можно использовать ретровирусные векторы и векторы на основе аденоассоциированного вируса. Такие векторы обеспечивают эффективную доставку генов в клетки, а перенесенные нуклеиновые кислоты способны стабильно интегрироваться в хромосомную ДНК хозяина.

[00254] Разработка специализированных клеточных линий (называемых «пакующими клетками»), которые продуцируют только дефектные по репликации ретровирусы, увеличила степень использования ретровирусов для генной терапии. Также охарактеризованы дефектные ретровирусы, пригодные для использования для переноса генов в целях генной терапии (для обзора см., например, Miller, Blood 76:271-78 (1990)). Ретровирус с дефектом репликации может быть упакован в вирионы, которые можно использовать для заражения клетки-мишени с помощью вируса-помощника стандартными методами. Протоколы получения рекомбинантных ретровирусов и инфицирования клеток такими вирусами *in vitro* или *in vivo* можно найти в Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, et al., (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14, и других стандартных лабораторных руководствах. Неограничивающие примеры подходящих ретровирусов включают рLJ, рZIP, рWE и рEM, которые известны специалистам в данной области. Примеры подходящих пакующих 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).

[00255] В другом варианте осуществления предложены векторы доставки, полученные из аденовируса. Манипуляция геномом аденовируса можно добиться того, чтобы он кодировал и экспрессировал представляющий интерес генный продукт, но его способность реплицироваться в нормальном литическом жизненном цикле вируса была при этом инактивирована. См., например, Berkner et al., BioTechniques 6:616 (1988); Rosenfeld, et al., Science 252:431-434 (1991); and 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. Рекомбинантные аденовирусы могут оказаться полезными в определенных обстоятельствах, поскольку они не способны инфицировать неделящиеся клетки и могут использоваться для инфицирования самых разных типов клеток, включая эпителиальные клетки (Rosenfeld, et al. (1992), см. выше). Более того, вирусная частица является относительно стабильной, поддается очистке и концентрации

и, как указано выше, может быть модифицирована для изменения спектра инфекционности. Кроме того, введенная аденовирусная ДНК (и содержащаяся в ней чужеродная ДНК) не интегрируется в геном клетки-хозяина, а остается эписомальной, 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, емкость аденовирусного генома как носителя чужеродной ДНК велика (до 8 тысяч оснований) по сравнению с другими векторами доставки (Berkner, et al. (1998), см. выше; Naj-Ahmand and Graham, J. Virol. 57:267 (1986)).

[00256] Еще одной вирусной векторной системой, полезной для доставки последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, является аденоассоциированный вирус (AAV). AAV является природным дефектным вирусом, которому требуется другой вирус, например аденовирус или вирус герпеса, в качестве вируса-помощника для эффективной репликации и продуктивного жизненного цикла. (Обзор см. в Muzyczka et al., Curr. Topics in Micro. and Immunol. 158:97-129 (1992)). Он также является одним из немногих вирусов, которые способны интегрировать свою ДНК в неделящиеся клетки, демонстрируя при этом 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) и McLaughlin et al., J. Virol. 62:1963-1973 (1989)). Можно упаковать и интегрировать векторы, содержащие всего лишь 300 пар оснований AAV. Пространство для экзогенной ДНК ограничено примерно 4,5 т.п.н. Вектор AAV, такой как описан Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985), можно использовать для введения ДНК в клетки. С помощью векторов AAV было введено множество нуклеиновых кислот в различные типы клеток (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); and Flotte, et al., J. Biol. Chem. 268:3781-3790 (1993)).

[00257] Помимо способов вирусного переноса, экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, в ткани субъекта также можно получить путем использования способов невирусного переноса. Большинство методов невирусного переноса генов основаны на нормальных механизмах, используемых клетками млекопитающих для поглощения и внутриклеточного транспорта макромолекул. В некоторых вариантах осуществления невирусные системы доставки основаны на эндоцитарных путях поглощения представляющего интерес гена целевой клеткой. Типичные системы доставки этого типа включают системы, полученные из липосом, конъюгаты полилизина и искусственные вирусные оболочки. Другие варианты осуществления включают системы инъекции плазмиды, такие как описаны Meuli, et al., J. Invest. Dermatol. 16 (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).



[00258] В клинических условиях системы доставки могут быть введены субъекту любым из нескольких способов, каждый из которых известен в данной области техники. Например, фармацевтический препарат системы доставки можно вводить системно, например, посредством внутривенной инъекции. Специфическая трансдукция белка в клетках-мишенях происходит преимущественно за счет специфичности трансфекции, обеспечиваемой средством доставки, экспрессией клеточного или тканевого типа, обусловленной последовательностями регуляции транскрипции, которые контролируют экспрессию рецепторного гена, или за счет их комбинации. В других вариантах осуществления первоначальная доставка рекомбинантного гена более ограничена, поскольку введение животному является весьма локализованным. Например, средство доставки может быть введено с помощью катетера (см. патент США № 5328470) или с помощью стереотаксической инъекции (например, Chen, et al., PNAS 91:3054-3057 (1994)).

[00259] 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, если полную систему доставки можно получить в интактном виде из рекомбинантных клеток, например, ретровирусные векторы, то фармацевтический препарат может содержать одну или более клеток, продуцирующих такую систему доставки.

#### Методы лечения и соответствующее применение

[00260] В одном из аспектов изобретение относится к способам лечения нуждающегося в этом пациента (например, пациента, инфицированного коронавирусом, в частности SARS-CoV-2), включающим введение эффективного количества ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка или последовательности нуклеиновой кислоты (например, мРНК), кодирующей ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, представленный в настоящем описании. Изобретение также относится к применению ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка или последовательности нуклеиновой кислоты (например, мРНК), кодирующей ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, представленный в настоящем описании, при получении лекарственного средства для лечения коронавирусной инфекции. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к наборам и способам для лечения расстройств и/или симптомов, например расстройств, связанных с коронавирусом, и/или симптомов, связанных с коронавирусом, у нуждающегося в таком лечении млекопитающего. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления субъектом является человек. Ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки или кодирующие их последовательности нуклеиновых кислот по настоящему изобретению полезны в ряде различных применений. Например, в одном из вариантов осуществления рассматриваемые ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки или кодирующие их последовательности нуклеиновых кислот полезны для спасения инфицированных коронавирусом клеток от гибели и/или от

цитопатического эффекта, индуцированного коронавирусом.

[00261] В другом варианте осуществления рассматриваемые ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки или кодирующие их последовательности нуклеиновых кислот полезны для уменьшения одного или более симптомов и/или осложнений, связанных с коронавирусной инфекцией, как раскрыто в настоящем описании (ниже).

[00262] Соответственно, настоящее изобретение также относится к способу лечения одного или более расстройств, симптомов и/или осложнений, связанных с коронавирусной инфекцией, у человека или другого животного, путем введения такому человеку или животному эффективного нетоксичного количества ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка или кодирующей его последовательности нуклеиновой кислоты. Специалист в данной области сможет с помощью обычных экспериментов определить необходимое для лечения коронавирусной инфекции эффективное нетоксичное количество ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка или кодирующей его последовательности нуклеиновой кислоты.

[00263] Например, «терапевтически активное количество» ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению может меняться в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания (например, острая или хроническая), возраст, пол, медицинские осложнения (например, коинфекция ВИЧ, иммуносупрессивные состояния или заболевания) и вес субъекта, а также способность ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка вызывать желаемый ответ у субъекта. Режим дозирования может быть скорректирован для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Например, возможно ежедневное введение нескольких разделенных доз, или пропорциональное уменьшение дозы, как указано, в зависимости от терапевтической ситуации.

[00264] В общем случае, композиции, предложенные в настоящем изобретении, можно использовать для профилактического лечения неинфицированных клеток или для терапевтического лечения любых инфицированных коронавирусом клеток, содержащих антигенный маркер, который позволяет нацеливать ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок на инфицированные коронавирусом клетки.

[00265] Лечение или профилактика коронавирусной инфекции в соответствии со способами и применениями, раскрытыми и заявленными в настоящем изобретении, может включать введение агониста TNFRSF или его функционального фрагмента (например, «в комбинации» с IFN или его функциональным фрагментом, и наоборот. Если агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент и IFN или его функциональный фрагмент присутствуют в разных фармацевтических композициях, такая комбинация может быть осуществлена путем одновременного введения. Альтернативно, комбинированное введение может быть достигнуто в этом случае за счет последовательного введения. Например, агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент могут быть введены до

введения IFN или его функционального фрагмента. Альтернативно, IFN или его функциональный фрагмент могут быть введены до введения агониста TNFRSF или его функционального фрагмента. В случае последовательного введения его осуществляют таким образом, чтобы комбинированное введение приводило к усилению эффективности лечения, например, в отношении спасения клеток от вызванной коронавирусом гибели и/или от индуцированного коронавирусом цитопатического эффекта предпочтительно по сравнению с введением только IFN или его функционального фрагмента. Специалист сможет легко определить подходящие схемы введения, соответствующие дозы, интервалы введения и, если выбрано последовательное введение отдельных фармацевтических композиций, интервалы между введениями указанных отдельных фармацевтических композиций, при которых достигается такое усиление.

#### Фармацевтические композиции и их применение

[00266] В некоторых вариантах осуществления ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению или кодирующие их последовательности нуклеиновых кислот (включая векторы или векторные системы) содержатся в фармацевтической композиции. Способы получения и введения ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белков или кодирующих их последовательностей нуклеиновых кислот по настоящему изобретению хорошо известны субъекту или могут быть легко определены специалистами в данной области, исходя из настоящего описания и знаний в области техники, используемых в качестве руководства. Путь введения ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белков или кодирующих их последовательностей нуклеиновых кислот 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 указанные формы введения в явном виде рассматриваются как входящие в объем настоящего изобретения, форма для введения может представлять собой 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. В еще 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-активным веществом является полисорбат. В более предпочтительных вариантах осуществления поверхностно-

активным веществом является полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80 или полисорбат 100, предпочтительно полисорбат 20 или полисорбат 80.

[00267] В некоторых вариантах осуществления ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки или кодирующие их последовательности нуклеиновых кислот могут быть доставлены непосредственно к месту нахождения неблагоприятной клеточной популяции (например, в печень), тем самым увеличивая воздействие терапевтического агента на больную ткань.

[00268] 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 органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и буферные среды. В композициях и способах по настоящему изобретению фармацевтически приемлемые носители включают, помимо прочего, 0,01-0,1 М, например, 0,05 М фосфатный буфер или 0,8% физиологический раствор. Другие распространенные парентеральные носители включают растворы фосфата натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или нелетучие масла. Внутривенные носители включают восполнители жидкости и питательных веществ, восполнители электролитов, например, на основе декстрозы Рингера и т.п. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные препараты, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и т.п. Более конкретно, фармацевтические композиции, подходящие для применения в виде инъекции, включают стерильные водные растворы (если они водорастворимы) или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. В таких случаях композиция должна быть стерильной и жидкой настолько, чтобы ее можно было легко ввести с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и, как правило, защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси.

[00269] Защиты от воздействия микроорганизмов можно достичь путем использования различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях в композицию могут быть включены изотонические агенты, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированную абсорбцию инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию агента, замедляющего абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

[00270] В любом случае стерильные растворы для инъекций можно приготовить путем включения активного соединения, такого как ассоциированный с интерфероном

антигенсвязывающий белок, или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению, отдельно или в комбинацию с другими активными агентами в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных в настоящем описании, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций типичные способы приготовления включают вакуумную сушку и лиофилизацию, в результате чего получают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из содержащего его предварительно стерильно отфильтрованного раствора. Препараты для инъекций обрабатывают, расфасовывают в контейнеры, такие как ампулы, пакеты, флаконы, шприцы или флаконы, и герметизируют в асептических условиях в соответствии со способами, известными в данной области техники. Кроме того, препараты могут быть упакованы и проданы в виде набора. Такие изделия обычно имеют этикетки или вкладыши, указывающие, что соответствующие композиции полезны для лечения субъекта, страдающего коронавирусной инфекцией.

[00271] Эффективные дозы композиций по настоящему изобретению для лечения вышеописанных состояний, связанных с коронавирусной инфекцией, меняются в зависимости от множества различных факторов, включая способ введения, целевой участок, физиологическое состояние пациента, являющегося человеком или животным, другие принимаемые лекарства и исходя из того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациентом является человек, но можно лечить и млекопитающих, отличных от человека, включая трансгенных млекопитающих, в частности приматов, отличных от человека. Лечебные дозы можно титровать обычными методами, известными специалистам в данной области, для оптимизации безопасности и эффективности.

[00272] Для лечения ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белком доза может находиться в диапазоне, например, от примерно 0,0001 до примерно 100 мг/кг, более предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 5 мг/кг массы тела хозяина (например, может составлять 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.). Например, дозы могут составлять примерно 1 мг/кг массы тела или примерно 10 мг/кг массы тела или могут находиться в диапазоне от примерно 1 до примерно 10 мг/кг, например могут составлять по меньшей мере примерно 1 мг/кг. Промежуточные дозы в вышеуказанных диапазонах также входят в объем настоящего изобретения. Субъектам можно вводить такие дозы ежедневно, через день, еженедельно или в соответствии с любым другим графиком, определенным эмпирическим анализом. Типичное лечение включает введение нескольких доз в течение длительного периода, например, по меньшей мере, шести

месяцев. Дополнительные типичные схемы лечения предполагают введение примерно один раз в две недели, или примерно один раз в месяц, или примерно один раз каждые 3-6 месяцев. Представленные в качестве примера схемы дозирования включают от примерно 1 до примерно 10 мг/кг или примерно 15 мг/кг каждый день, примерно 30 мг/кг через день или примерно 60 мг/кг еженедельно.

[00273] Ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки или последовательности нуклеиновых кислот, экспрессирующие любой из этих белков, можно вводить многократно. Интервалы между разовыми дозами могут быть еженедельными, ежемесячными или ежегодными. Интервалы также могут быть нерегулярными, в зависимости от результатов измерений уровней ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белков или их компонентов в крови у пациента. Альтернативно, ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки или последовательности нуклеиновых кислот, экспрессирующие любой из этих белков, можно вводить в виде препарата с пролонгированным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота меняются в зависимости от периода полувыведения ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белков из организма пациента.

[00274] Термин «период полувыведения» или « $t_{1/2}$ », как указано в настоящем описании, относится к стабильности и/или скорости выведения соединения, такого как ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению. На практике период полувыведения соединения обычно измеряют в сыворотке, который обозначает время после введения, спустя которое концентрация в сыворотке составляет 50% от концентрации в сыворотке во время введения. Ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению характеризуются длительным периодом полувыведения из сыворотки мышей. В некоторых вариантах осуществления период полувыведения ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка составляет по меньшей мере 50 часов, по меньшей мере 60 часов, по меньшей мере 70 часов, по меньшей мере 80 часов, по меньшей мере 90 часов или по меньшей мере 100 часов. В некоторых вариантах осуществления период полувыведения ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка составляет по меньшей мере 100 часов. В предпочтительных вариантах осуществления период полувыведения ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка у мышей составляет от 116 до 158 часов.

[00275] Период полувыведения белка связан с его клиренсом. Термин «клиренс» или «скорость клиренса» в контексте настоящего описания относится к объему плазмы, очищенному от белка в единицу времени. Клиренс ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белков по изобретению является низким. В некоторых вариантах осуществления клиренс ассоциированного с интерфероном 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 ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка составляет менее 5 мл/ч/кг. В некоторых

вариантах осуществления клиренс ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка составляет менее 1 мл/ч/кг. В некоторых вариантах осуществления клиренс ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка у мышей находится в диапазоне от 0,28 до 0,49 мл/ч/кг.

[00276] Термины «объем распределения», « $V_D$ », « $V_{SS}$ » или «кажущийся объем распределения», используемые в настоящем описании, относятся к теоретическому объему, который был бы необходим для содержания общего количества введенного соединения, такого как ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок по изобретению, в той же концентрации, в которой он наблюдается в плазме крови, и относится к распределению указанного соединения между плазмой и остальной частью организма после перорального или парентерального введения. В некоторых вариантах осуществления объем распределения  $V_{ss}$  ассоциированного с интерфероном 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  $V_{ss}$  ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка составляет менее 100 мл/кг. В некоторых вариантах осуществления объем распределения  $V_{ss}$  ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка у мышей составляет от 50 до 98 мл/кг.

[00277] Другим родственным фармакокинетическим параметром является системное воздействие. В контексте настоящего описания 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). Ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению циркулируют в крови с более высоким системным воздействием (AUC (0-inf)), чем родительское антитело. В некоторых вариантах осуществления родительское антитело представляет собой CP870,893. В других вариантах осуществления родительское антитело представляет собой 3G5. В некоторых вариантах осуществления системное воздействие ассоциированного с интерфероном 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 ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка у мышей находится в диапазоне от 1033 мкг\*ч/мл до 1793 мкг\*ч/мл.

[00278] Как обсуждалось ранее, ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению можно вводить в фармацевтически эффективном количестве для лечения заболеваний у млекопитающих *in vivo*. В этом отношении следует понимать, что, согласно описанию, приготовленный состав, содержащий ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, позволяет облегчить введение и повысить стабильность активного агента.

[00279] 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 ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка обычно представляет собой количество, достаточное для достижения одного или более из следующего: снижения гибели клеток, индуцированной коронавирусом, в частности гибели клеток, индуцированной SARS-CoV-2; и стимуляции сигнального пути IFN в инфицированной клетке. Конечно, фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в виде одной или более доз для обеспечения фармацевтически эффективного количества ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка.

[00280] В соответствии с объемом настоящего изобретения ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки или последовательности нуклеиновых кислот, экспрессирующие любой из этих белков, можно вводить человеку или другому животному в соответствии с вышеупомянутыми способами лечения в количестве, достаточном для достижения терапевтического эффекта. Ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки или последовательности нуклеиновых кислот, экспрессирующие любой из этих белков, можно вводить человеку или животному в традиционной лекарственной форме, приготовленной путем объединения ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белков или последовательностей нуклеиновых кислот, экспрессирующих любой из этих белков, с обычным фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем согласно известным методам. Специалисту в данной области техники будет понятно, что форма и характер фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя определяются количеством активного ингредиента, с которым его следует комбинировать, способом введения и другими хорошо известными переменными. Специалистам в данной области также будет очевидно, что коктейль, включающий один или более видов ассоциированных с интерфероном антигенсвязывающих белков или последовательностей нуклеиновых кислот, экспрессирующих любой из этих белков по изобретению, может оказаться эффективным.

[00281] 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 меняться. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем описании, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения.

[00282] Кроме того, в экспериментах, описанных в настоящем описании, если не указано иное, используются традиционные молекулярные и клеточные биологические и иммунологические методы, известные в данной области техники. Такие методы хорошо известны специалисту в данной области техники 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 добавки, *Molecular Cloning: A Laboratory Guide* (четвертое издание). 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).

[00283] Если не указано иное, научные и технические термины, используемые в настоящем описании, имеют значения, в которых их обычно понимают специалисты в данной области техники. В случае любой скрытой неоднозначности, представленные в настоящем описании определения имеют приоритет перед любым словарным определением или определением из внешнего источника. Если иное не следует из контекста, 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 «включающий», а также другие его формы, такие как «включает» и «включенный», не является ограничивающим. Использование термина «содержащий» включает термин «состоящий из», если не указано иное.

[00284] В целом, номенклатура, используемая в связи с культурой клеток и тканей, молекулярной биологией, иммунологией, микробиологией, генетикой, а также химией белков и нуклеиновых кислот и гибридизацией, раскрытая в настоящем описании, хорошо известна и широко используется в данной области техники. Способы и методы, представленные в настоящем описании, обычно выполняют в соответствии с традиционными способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных ссылочных документах, которые процитированы и обсуждаются в настоящем описании, если не указано иное. Ферментативные реакции и методы очистки выполняют в соответствии со спецификациями производителя, в том виде как их обычно выполняют в данной области техники или как раскрыто в настоящем описании. Номенклатура, используемая в связи с раскрытыми в настоящем описании лабораторными процедурами и методами аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии, хорошо известна и широко используется в данной области техники. Для химического синтеза, химического анализа, фармацевтического приготовления, составления и доставки, а также лечения пациентов используются стандартные методы.

[00285] Заголовки разделов, используемые в настоящем описании, предназначены только для организационных целей и не должны быть истолкованы как ограничивающие описываемый предмет изобретения. Содержание статей, патентов и патентных заявок, а также всех других документов и информация, доступная в электронном виде, упомянутых или цитируемых в настоящем документе, включены в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте в той степени, как если бы каждая отдельная публикация была специально и отдельно указана как включенная посредством ссылки. Авторы заявки оставляют за собой право физически включать в настоящую заявку любые материалы и информацию из любых таких статей, патентов, патентных заявок или других физических

и электронных документов.

[00286] Хотя настоящее изобретение описано со ссылкой на конкретные варианты осуществления, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что могут быть сделаны различные изменения и заменены эквивалентами без отклонения от сути и объема изобретения с использованием настоящего раскрытия в качестве руководства. После подробного описания некоторых вариантов осуществления изобретение станет более понятным из приведенных ниже примеров, которые включены исключительно в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения.

## **ПРИМЕРЫ**

### **ПРИМЕР I**

#### Получение слитых с интерфероном антител (IFA) на основе агонистического анти-CD40 антитела CP870,893 и их характеристика в репортерных клетках

##### *I.a - Разработка IFA*

[00287] Комбинации последовательностей приведенных в качестве примера IFA, созданных с использованием агонистического анти-CD40 антитела CP870,893 в качестве каркасного антитела, с расположением IFN и природой линкеров приведены в таблице 7 и таблице 9. IFN сливали через линкер с N- или C-концевой частью легкой цепи (LC) или тяжелой цепи (HC), как указано в таблице 7. Нуклеиновые кислоты, кодирующие HC, LC или продукты слияния, синтезировали с оптимизированными кодонами для экспрессии в млекопитающих и клонировали в эукариотический вектор экспрессии, такой как pcDNA3.1 (Invitrogen). На фиг. 2A изображена типовая карта плазмиды pcDNA3.1, кодирующей Seq ID NO 32, под контролем промотора pCMV.

##### *I.b - Продуцирование IFA*

[00288] Клетки Freestyle 293-F (Invitrogen) временно 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 0,22 мкм фильтры. Процесс очистки выполняли в два этапа в хроматографической системе AktaExpress (GE Healthcare) с колонкой MabSelect Sure 5 мл 1,6/2,5 см (GE Healthcare) с белком А при скорости потока 5 мл/мин. Связывание образца осуществляли в буфере D-PBS1X, pH 7,5, и элюировали 0,1 М буфером глицин/HCl, pH 3,0. Пик элюирования хранили в петле, и затем вводили в колонку HiTrap Desalting 26/10 (GE Healthcare) со скоростью потока 10 мл/мин в буфере D-PBS1XpH 7,5. Пик элюирования собирали в 96-луночный микропланшет (фракции по 2 мл). Объединение выполняли в соответствии с профилем УФ-пика. После фильтрации на 0,22 мкм фильтрах (Sartorius MiniSart) осуществляли контроль качества, включая бактериальные эндотоксины, с помощью прибора Endosafe® nexgen-PTS™ (Charles River), эксклюзионную хроматографию на колонке SEC 200 Enhance 10/300 (GE Healthcare) для определения чистоты и используя олигомеры, и SDS-PAGE в редуцирующих и нередуцирующих условиях в гелевой системе NuPAGE (Invitrogen) в рабочем буфере MES SDS. Выход продукта указан в таблице 9. Для некоторых IFA выход был очень низким. В этом случае

агонистическую активность CD40 и активность IFN оценивали непосредственно в супернатанте, содержащем IFA, без какой-либо дополнительной очистки.

[00289] Анализ очищенных IFA с помощью SDS-PAGE показал наличие двух основных полос, соответствующих HC и LC. Когда IFN (независимо от члена семейства IFN) сливали с HC, наблюдали сдвиг молекулярной массы, и такое же явление наблюдали для LC, слитых с любым IFN (фиг. 2B).

*I.c - Характеристика IFA на репортерных клетках*

[00290] Клетки HEK-Blue™ CD40L (InvivoGen Кат. №: hkb-cd40) или клетки HEK-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  (InvivoGen, Кат. №: hkb-ifn $\alpha\beta$ ) использовали для мониторинга, соответственно, активации пути NF $\kappa$ B агонистами CD40 или пути IFN, индуцируемой IFN типа I.

[00291] Клетки HEK-Blue™ CD40L получали путем стабильной трансфекции клеток HEK293 человеческим геном CD40 и конструкцией NF $\kappa$ B-индуцируемой секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) (Invivogen) для измерения биологической активности агонистов CD40. Стимуляция CD40 приводит к индукции NF $\kappa$ B, и затем к продуцированию SEAP, которое детектируют в супернатанте с помощью QUANTI-Blue™ (Invivogen, кат. # Rep-qbs2).

[00292] IFN-клетки HEK-Blue™ предназначены для мониторинга активации путей JAK/STAT/ISGF3, индуцируемых I-IFN типа I. Активация этого пути индуцирует выработку и высвобождение SEAP. Уровни SEAP легко определить в супернатанте с помощью QUANTI-Blue™.

[00293] HEK-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  используют для мониторинга активности человеческого IFN $\alpha$  или IFN $\beta$ .

[00294] Клетки высевали в 96-луночных планшетах (50000 клеток на лунку) и стимулировали концентрацией, указанной для каждого IFA или контроля, и инкубировали при 37°C в течение 24 часов. Затем супернатанты собирали и выполняли количественное определение уровней SEAP после инкубации супернатанта в течение примерно 30 минут с помощью QuantiBlue™ и оценки оптической плотности (OD) при 620 нм на ридере многолуночных планшетов Ensignt или PheraStar (Lab Biotech).

[00295] Для соответствующего мониторинга активности IFN типа II и типа III можно использовать клетки HEK-Blue™ Dual IFN- $\gamma$  (InvivoGen, кат. №: hkb-ifng) или HEK-Blue™ IFN- $\lambda$  (InvivoGen, кат. №: hkb-ifnl). Клетки HEK-Blue™ IFN- $\lambda$  предназначены для мониторинга активности IFN- $\lambda$ . Клетки HEK-Blue™ Dual IFN- $\gamma$  позволяют детектировать биологически активный человеческий IFN $\gamma$ .

*I.d - Функциональная активность IFA на основе IFN $\alpha/\beta$  на репортерных клетках*

[00296] На фиг. 3 показаны примеры эффекта дозы IFA, в которых IFN $\beta$  или его мутированную версию, как указано в таблице 7, сливали с HC, как показано в таблице 7, на клетки HEK-Blue™ CD40L (фиг. 3A-3B) и HEK-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  (фиг. 3C-3D). Агонистическая анти-CD40 активность IFA суммирована в таблице 9, а примеры показаны на фиг.3A и фиг.3B. Результаты показывают, что все протестированные IFA способны

активировать как путь CD40, так и путь IFN- $\alpha/\beta$  дозозависимым образом. Для продуктов слияния с С-концом HC или LC значения EC<sub>50</sub> для агониста CD40 находятся в диапазоне от 11,1 нг/мл до 192 нг/мл (таблица 9). Среднее значение EC<sub>50</sub> для родительского антитела составляет 48 нг/мл и 57 нг/мл в эксперименте, показанном на фиг. 3. IFA с IFN, слитым с N-концом HC или LC, также были способны активировать путь CD40, но точные значения EC<sub>50</sub> для этих IFA определить не удалось, поскольку активность определяли непосредственно в супернатанте, а не у очищенных белков (фиг. 3B).

[00297] Активность IFN у различных IFA суммирована в таблице 9, а примеры показаны на фиг. 3C-3D. Активность IFN у продуктов слияния IFN $\beta$  или мутированного IFN $\beta$  (как указано в таблице 7) с С-концом HC или LC варьирует в зависимости от последовательности линкера со значениями EC<sub>50</sub> в диапазоне от 0,14 нг/мл до 4,5 нг/мл (фиг. 3C и таблица 9). На фиг. 3D показано, что IFA с IFN $\beta$ , слитым с N-концевой частью, демонстрируют высокую активность IFN. Родительское антитело, использованное в качестве отрицательного контроля, не проявляло никакой активности, тогда как рекомбинантный IFN $\beta$  показал сильный дозозависимый ответ. В целом эти результаты демонстрируют, что продукт слияния IFN $\beta$  или его мутированной версии, как показано в таблице 7, с антителом, независимо от местоположения, сохраняет обе биологические функции, хотя и разные по эффективности.

[00298] На фиг. 4 показаны примеры эффекта дозы IFA, в которых IFN $\alpha$  слит с HC или LC, как указано в таблице 7, на клетки HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L (фиг. 4A и фиг. 4C) и HEK-Blue<sup>TM</sup> IFN- $\alpha/\beta$  (фиг. 4B и фиг. 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 воздействия на путь CD40 была воспроизводимо выше, чем у родительского антитела. Значения EC<sub>50</sub> для IFA на основе IFN- $\alpha$  находились в диапазоне от 11,1 нг/мл до 22,7 нг/мл, и EC<sub>50</sub> для CP870,893 были в диапазоне от 30 нг/мл до 80 нг/мл (среднее значение EC<sub>50</sub>: 48 нг/мл).

[00299] Активность IFN менялась у IFA в зависимости от линкерной последовательности со значениями EC<sub>50</sub> в диапазоне от 1,6 нг/мл до 5,1 нг/мл. В том же анализе ПЭГилированный IFN $\alpha$ 2a (Pegasys®) также показал дозозависимую активность со значением EC<sub>50</sub>, составляющим примерно 1 нг/мл.

*I.e - Создание и характеристика IFA без области Fc.*

[00300] Подходящие конструкции по изобретению также могут представлять собой ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки без области Fc. Разрабатывали конструкцию, кодирующую тяжелую цепь фрагмента Fab CP870,893, слитую с меткой TEV-His (SEQ ID NO 50), которую клонировали в экспрессирующую плазмиду pcDNA3.1. Эту конструкцию котрансфицировали в клетки HEK, как описано ранее, при этом LC сливали 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 оценивали в

репортерных клетках. Специалисту в данной области техники будет понятно, что конструкции для применения в терапии не будут содержать метку TEV-His. Эти конструкции также являются вариантами осуществления изобретения. Ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки без оюласти Fc будут активны против коронавирусной инфекции. Затем получали два IFA, функциональная характеристика которых 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 IFA на клетки, инфицированные SARS-CoV-2

###### *II.a - Клеточная культура*

[00301] Клетки Vero E6, выделенные из клеточной линии CCL81, полученной из почек африканской зеленой мартышки, приобретали в компании ElabScience (кат. № EP-CL-0491). Линию адгезивных клеток поддерживали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM; Gibco cat#21885-025, Carlsbad, CA, USA) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS; Gibco, Carlsbad, CA, USA). Клетки культивировали во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

###### *II.b - Изоляты вируса*

[00302] Следующие штаммы SARS-CoV-2, использованные в экспериментах, получали от BEI Resources:

- изолят USA-WA1/2020 (NR-52281),
- изолят Germany/BavPat1/2020 (NR-52370),
- изолят hCoV-19/South Africa/KRISP-EC-K005325/2020 (NR-54009),
- изолят USA/CA\_CDC\_5574/2020 (NR-54011),
- изолят hCoV-19/England/204820464/2020 (NR-54000),
- изолят CoV-19/South Africa/KRISP-EC-K005321/2020 (NR-54008),
- изолят hCoV-19/Japan/TY7-503/2021 (NR-57982),
- изолят hCoV-19/USA/PHC658/2021 (NR-55611) и
- изолят hCoV-19/USA/MD-HP20874/2021 (NR-56461).

###### *II.c - Последовательности контрольных IFA*

Таблица С. Последовательности контрольного ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка на основе изотипического контроля Evi5. Последовательности, выделенные курсивом, соответствуют сигнальным пептидам. Последовательности, выделенные жирным шрифтом и не выделенные курсивом, соответствуют линкерам.

Название/SEQ ID NO	Последовательность
eVi-5 D1.3-h1v2_hIgG2	<i>MGWSCILFLVATATGVHS</i> <b>EVKLQESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTGYGVNWVVRQPPGKGL</b>

dK_HC (SEQ ID NO 89)	EWLGMIWGDGNTDYN SALKSRLSISKDNSK SQVFLKMNSLHTD DTARYYC ARERDYRLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVERKCCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS DGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
evi-5 D1.3-hk-LC (SEQ ID NO 90)	<i>MGWSCIIIFLVATATGVHS</i> IELTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQL LVYYTTTLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYQC HF WSTPRTFGGGTKLELKRVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASV VCLL NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
eVi-5 D1.3- h1v2_hIgG2 dK_HC--(G4S)2-- IFN $\alpha$ 2A (SEQ ID NO 91)	<i>MGWSCIIIFLVATATGVHS</i> EVKLQESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTGYGVNWVVRQPPGKGL EWLGMIWGDGNTDYN SALKSRLSISKDNSK SQVFLKMNSLHTD DTARYYC ARERDYRLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVERKCCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS DGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG <b>GGGGSGGGG</b> SCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDR HDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDE TLLDKFYTELYQQLN DLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRKY FQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
eVi-5 D1.3- h1v2_hIgG2	<i>MGWSCIIIFLVATATGVHS</i> EVKLQESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTGYGVNWVVRQPPGKGL

dK_HC--(G4S)4-- IFN $\alpha$ 2A  (SEQ ID NO 92)	EWLGMIWGDGNTDYN SALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLHTD DTARYYCARE RDYRLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTV PSSNFGTQTYTCNV D HKPSNTKVDKTVERKCCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVH QDWL NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG <b>GGGGSGGGGSGGGGSGGGG</b> SCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQM RKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLF STKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGV TETPLM KEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTN LQESLRSKE
--	--

Таблица D. Полипептидные комбинации, обнаруженные в контрольных антигенсвязывающих белках, слитых с интерфероном, на основе изотипического контроля Evi5 (= (SEQ ID NO 89) + (SEQ ID NO 90); комбинация последовательностей включена дважды). Каждая указанная комбинация последовательностей содержится в соответствующем IFA в двух экземплярах.

Слитое с интерфероном антитело (IFA)	Комбинация последовательностей
IFA201	(seq ID NO 90) + (seq ID NO 92)
IFA202	(seq ID NO 90) + (seq ID NO 91)

*II.d - Цитометрический анализ: окрашивание CD40*

[00303] Клетки Vero E6 ( $1.10^6$  клеток/лунка) ресуспендировали в буфере РЕВ в присутствии антител, блокирующих FcR (MilteNY 130-059-901), в течение 15 минут при 4°C. После центрифугирования при 1500 об/мин в течение 2 минут при 4°C клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера отдельно или в присутствии изотипического антитела (MilteNY 130-113-438) или анти-CD40-APCVio770 антитела (MilteNY, 130-123-395) и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки центрифугировали, промывали, фиксировали в течение 10 мин при 4°C 4% PFA. После центрифугирования и промывки лунки ресуспендировали в буфере РЕВ и анализировали на цитометре MACSQuant16.

*II.e - Анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo*

[00304] Люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (CTG) выполняли для каждого образца в соответствии с инструкциями производителя (Promega, кат. №: G7570). Вкратце, клетки высевали в трех экземплярах в 96-луночные планшеты и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Через двадцать четыре часа после посева клетки инфицировали при множественности заражения (MOI) 0,05 (за исключением вариантов

Gamma и Omicron с MOI 0,5 и 0,1, соответственно) в течение 1 часа, один раз промывали PBS и затем обрабатывали Ремдесивиром (Sigma-Aldrich, S.t Louis, MO, USA; Wang (2020) *Cel Res.* 30:2-71) или тестируемыми образцами в указанных концентрациях. В случае процедуры предварительной обработки (фиг. 5F и 5G, фиг. 5F.bis и фиг. 5G.bis) клетки обрабатывали Ремдесивиром или тестируемыми образцами в указанных концентрациях в течение 1 часа при 37°C, один раз промывали PBS и инфицировали при MOI 0,05 в течение 72 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Для анализа нейтрализации вирус смешивали при MOI 0,05 с S309 (Pinto (2020) *Nature Jul*; 583(7815):290-295) в указанных концентрациях и выдерживали в течение 1 часа при 37°C, чтобы антитело могло связаться с шиповидным белок вируса. Затем клетки инфицировали смесью вирус/антитело и инкубировали в течение 72 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Для всех описанных выше процедур через 72 часа после заражения клетки один раз промывали PBS и инкубировали в течение 10 минут с реагентом CellTiter-Glo. Далее измеряли люминесценцию с помощью ридера 96-луночного планшета (микропланшетного люминометра для GloMax-96; Promega) в микропланшетном ридере (Perkin Elmer Ensign) со временем интегрирования 0,1 с на лунку. Фоновую люминесценцию измеряли в среде без клеток и вычитали из экспериментальных значений.

#### *II.f - Проверка модели инфицирования SARS-CoV-2 (в анализе CTG)*

[00305] Для проверки модели инфицирования выполняли два эксперимента с использованием нейтрализующего антитела и ингибитора полимеразы, Ремдесивира. Для анализа нейтрализации нейтрализующее антитело S309 и вирус (изолят USA-WA1/2020) предварительно инкубировали в течение 1 часа перед инфицированием клеток, и жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня после заражения. На фиг. 5A показано, что S309 эффективно нейтрализует SARS-CoV-2 с EC<sub>50</sub> 858 нг/мл.

[00306] Эффект Ремдесивира также оценивали путем обработки клеток тестируемым продуктом в диапазоне возрастающих доз через один час после инфицирования в течение 72 часов. Результаты показывают, что Ремдесивир способен ингибировать репликацию вируса и индуцированный вирусом цитопатический эффект дозозависимым образом с EC<sub>50</sub> 1,341 мкМ (фиг. 5B).

#### *II.g.1 - Эффект IFA 27 на инфицирование SARS-CoV-2 (в анализе CTG)*

[00307] Было показано, что клетки Vero E6 экспрессируют CD40 на своей клеточной поверхности (фиг. 5C). Таким образом, влияние IFA27 на инфицирование SARS-CoV-2 оценивали относительно Ремдесивира в двух режимах проведения эксперимента. Клетки обрабатывали диапазоном доз IFA27 или Ремдесивира через 1 час после заражения SARS-CoV-2 (фиг. 5D и 5E). Жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня с помощью анализа CTG. Результаты показывают, что IFA27 эффективно спасал Vero E6 от цитопатического эффекта, индуцированного SARS-CoV-2, дозозависимым образом с EC<sub>50</sub> 8×10<sup>-5</sup> мкМ (фиг. 5D). В том же эксперименте EC<sub>50</sub> для Ремдесивира составила >1 мкМ (фиг. 5E). Во втором режиме проведения эксперимента клетки предварительно инкубировали в течение 1 часа с IFA27 или Ремдесивиром, промывали



PBS и инфицировали при MOI 0,05 в течение 72 часов при 37°C. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализа CTG. Результаты показывают, что кратковременная обработка IFA27 (фиг. 5F), но не Ремдесивиром (фиг. 5G), спасает клетки Vero E6 от гибели, вызванной SARS-CoV-2. Несмотря на короткую продолжительность обработки, EC<sub>50</sub> составила  $3,45 \times 10^{-4}$  мкМ (фиг. 5F).

*И.г.2. - Эффект IFA 25 на инфицирование SARS-CoV-2 (в анализе CTG)*

[00308] Эффект IFA25 на инфицирование SARS-CoV-2 оценивали по сравнению с Ремдесивиром в 2 режимах проведения эксперимента. Клетки обрабатывали диапазоном доз IFA25 или Ремдесивира через 1 час после заражения SARS-CoV-2 (фиг. 5D.bis и 5E.bis). Жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня с помощью анализа CTG. Результаты показывают, что IFA25 эффективно спасал Vero E6 от цитопатического эффекта, индуцированного SARS-CoV-2, дозозависимым образом с EC<sub>50</sub>  $2,231 \times 10^{-5}$  мкМ (фиг. 5D.bis). В том же эксперименте EC<sub>50</sub> для Ремдесивира составила 1,756 мкМ (фиг. 5E.bis). Во втором режиме проведения эксперимента клетки предварительно инкубировали в течение 1 часа с IFA25 или Ремдесивиром, промывали PBS и инфицировали при MOI 0,05 в течение 72 часов при 37°C. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализа CTG. Результаты показывают, что кратковременная обработка IFA25 (фиг. 5F.bis), но не Ремдесивиром (фиг. 5G.bis), спасает клетки Vero E6 от гибели, вызванной SARS-CoV-2. Несмотря на короткую продолжительность обработки, EC<sub>50</sub> IFA25 составила  $4,813 \times 10^{-5}$  мкМ. Такой противовирусный эффект IFA25 при применении до или после заражения демонстрирует, что он способен защищать как инфицированные клетки, так и окружающие неинфицированные клетки, присутствующие в месте инфекции в клинической ситуации. Соответственно, эти результаты подтверждают способность конструкций по изобретению не только обеспечивать лечение, но и предотвращать развитие коронавирусной инфекции. Кроме того, защитный эффект в отношении окружающих неинфицированных клеток делает лечение особенно эффективным.

*И.и - Эффект IFA25, IFA27 на инфицирование SARS-CoV-2 по сравнению с контрольными IFA, CP870, 893 и Пегасис (в анализе CTG)*

[00309] Затем оценивали влияние IFA27 относительно родительского антитела (CP870,893) или контрольного IFA (IFA201) с IFNA2A, слитым с контрольным антителом (без агонистической активности CD40) посредством того же (G4S)<sub>4</sub> линкера. Клетки обрабатывали через 1 час после заражения и жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня с помощью анализа CTG. Результаты показывают, что CP870,893 само по себе не оказывает никакого влияния на гибель клеток, вызванную SARS-CoV-2. Контрольный IFA продемонстрировал дозозависимый эффект, обеспечиваемый присутствием IFNA2A, однако IFA27 оказался более эффективным в спасении клеток Vero E6 от гибели, вызванной SARS-CoV-2, более чем в 100 раз, чем контрольный IFA, (фиг. 5H).

[00310] IFA25 продемонстрировал активность, очень похожую на активность IFA27, и оказался высокоэффективным по сравнению с контрольным IFA (IFA202) или

препаратом Пегасис® (фиг. 5I).

[00311] Затем оценивали влияние IFA25 относительно родительского антитела (CP870,893) или контрольного IFA (IFA202) с IFNA2A, слитым с контрольным антителом (EVI5, без агонистической активности CD40) посредством того же (G4S)<sub>2</sub> линкера. Клетки обрабатывали через 1 час после заражения и жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня с помощью анализа CTG. Результаты показывают, что CP870,893 само по себе не оказывает сильного влияния на защиту клеток от гибели, вызванной SARS-CoV-2. Контрольный IFA202 продемонстрировал дозозависимый эффект, обеспечиваемый присутствием IFNA2A, при этом IFA25 был более эффективным в спасении клеток Vero E6 от гибели, индуцированной SARS-CoV-2, чем контрольный IFA. Интересно, что IFA25, отдельно или в комбинации с изотипом EVI5 (с той же нагрузкой антитела, что и в комбинации CP870,893 и IFA202), также был более эффективным по сравнению с комбинацией CP870,893 и IFA202, тем самым демонстрируя преимущество наличия в одной молекуле обеих функций CD40 и IFN (фиг. 5I.bis).

*II.i - Эффект IFA25 на изолят SARS-CoV-2 (в анализе CTG)*

[00312] Клетки Vero E6 инфицировали разными изолятами и обрабатывали IFA25 в течение 3 дней. Результаты показывают, что независимо от изолята IFA25 очень эффективно предотвращает гибель клеток при инфицировании SARS-CoV-2, при этом EC<sub>50</sub> находится на уровне примерно 10<sup>-6</sup> мкМ, что свидетельствует о его потенциально широком применении при любом варианте SARS-CoV-2 или даже при любом коронавирусе (фиг. 5J-5O).

[00313] На фиг. 5P-5R дополнительные результаты по другим изолятам показывают, что и в этих изолятах IFA25 очень эффективно предотвращает гибель клеток при инфицировании SARS-CoV-2, с EC<sub>50</sub> на уровне примерно 10<sup>-5</sup> мкМ.

[00314] Во всех этих экспериментах (фиг. 5J-5R) применялся один и тот же протокол, и в качестве препарата сравнения использовали Ремдесивир (RDV), противовирусный препарат прямого действия, используемый для лечения COVID19. Для сравнения эффективности IFA25 и Ремдесивира оценивали абсолютное значение EC<sub>50</sub> Log10 (LogAbsoluteEC50), которое представлено в таблице 14. Во всех тестируемых условиях эффективность IFA25 по защите клеток VeroE6 от гибели была выше, чем у RDV. Более того, было обнаружено, что IFA25 значительно отличается от RDV (таблица 14) при сравнении обработок с помощью парного t-теста, примененного к значениям LogAbsoluteEC50, при p < 0,00,1. Это говорит о потенциально широком спектре применения IFA25 при любых вариантах SARS-CoV-2 или даже при любом коронавирусе.

*II.j - Эффект IFA126 на изолят SARS-CoV-2 (в анализе CTG)*

[00315] Эффект IFA126 на инфицирование SARS-CoV-2 оценивали в диапазоне доз в экспериментах последующей обработки по 3 основным вариантам: изолят USA-WA1/2020 (MOI 0,05), изолят CoV-19/USA/PHC658/2021 (вариант Delta, MOI 0,05) и изолят hCoV-19/USA/MD-HP20874/2021 (вариант Omicron, MOI 0,1) (фиг. 5S-5U). Жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня с помощью анализа CTG.

[00316] IFA126 эффективно спасал клетки Vero E6 от цитопатического эффекта, индуцированного SARS-CoV-2, дозозависимым образом с  $EC_{50}$   $9,5 \times 10^{-6}$  мкМ против изолята USA-WA1/2020 (фиг. 5S), с  $EC_{50}$   $1,445 \times 10^{-5}$  мкМ против варианта Delta (фиг. 5T) и  $EC_{50}$   $2,72 \times 10^{-5}$  мкМ против варианта Omicron (фиг. 5U).

*И.к - Система клеточного анализа в реальном времени (RTCA xCELLigence; Nat Med. 2020, Sep; 26(9):1422-1427)*

[00317] В приборах RTCA используются микропланшеты, которые содержат содержащие золото биосенсоры, встроенные в дно каждой лунки. Наличие адгезивных клеток на содержащих золото биосенсорах препятствует прохождению тока, и величина импеданса зависит от количества клеток, размера клеток, качества прикрепления клеток к субстрату и межклеточной адгезии (барьерной функции). При заражении вирусом клетки-хозяева часто демонстрируют микроскопически видимые изменения, которые в совокупности называются цитопатическим эффектом (CPE). CPE может включать сокращение или увеличение клеток, разрушение/лизис, слияние клеток и/или образование телец включения. Инфицированные клетки, которые проходят через континуум цитопатического эффекта (CPE), становятся менее эффективными в препятствовании прохождению электрического тока. Постоянно измеряя эти изменения, RTCA позволяет детально отслеживать вирусный CPE и дает количественную кинетику процесса. В исследовании использовали устройство и программное обеспечение xCELLigence RTCA SP (Agilent) и RTCA Software 2.0 (Agilent), соответственно, в соответствии с инструкциями производителя. RTCA выполняли для каждого образца, как описано ниже. Вкратце, клетки высевали в трех экземплярах в 96-луночные E-планшеты (Agilent, кат. № 5232368001) и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Через двадцать четыре часа после посева планшет помещали в станцию xCELLigence, расположенную в инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, и начинали регистрацию электрического тока в каждой лунке следующим образом: 61 последовательное считывание с 1-минутным интервалом, 100 последовательных считываний с 15-минутным интервалом и 200 последовательных считываний с 1-часовым интервалом. Электрический импеданс (называемый клеточным индексом (CI), фиг. 6) отслеживали в течение 1 часа для оценки фона клеточного монослоя. Затем клетки инфицировали при MOI 0,05 в течение 1 часа, один раз промывали PBS и затем обрабатывали препаратом Пегасис® или тестируемыми образцами в указанных концентрациях. Клеточный индекс непрерывно отслеживали в течение 55 часов. Данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8. Для фиг. 6D, 6F и 6H, CI нормализовали следующим образом: 100% соответствует самому высокому зарегистрированному значению CI (через 25 часов) для неинфицированного состояния (NI), и 0% соответствует CI, полученному через 55 часов, когда все клетки погибли. Для определения  $EC_{50}$ , показанного на фиг. 6E, 6G и 6I, данные для каждой концентрации тестируемых объектов в 45-часовой момент времени наносили на график с помощью нелинейного регрессионного анализа 4PL.

*И.1 - Проверка модели инфицирования с помощью системы клеточного анализа в*

*реальном времени.*

[00318] Систему xCELLigence использовали для оценки влияния IFA в реальном времени на гибель клеток при инфицировании клеток Vero E6 SARS-CoV-2. Сначала оценили влияние концентрации вируса на вирус-индуцированный цитопатический эффект, выраженный в этом примере как клеточный индекс. Клетки держали неинфицированными или инфицированными различным количеством бляшкообразующих единиц (БОЕ) SARS-CoV-2 в течение 75 часов. Результаты указывают на хорошую корреляцию между клеточным индексом и количеством БОЕ (фиг. 6А). Затем подтверждали способность нейтрализующего антитела S309 предотвращать гибель клеток, вызванную SARS-CoV-2 (фиг. 6В), и способность Ремдесивира также предотвращать цитопатический эффект, индуцированный SARS-CoV-2, в клетках Vero E6 дозозависимым образом (фиг. 6В).

*И.т - Эффект IFA25 на инфицирование SARS-CoV-2 с использованием системы анализа клеток в реальном времени*

[00319] Влияние IFA25 в реальном времени по сравнению с препаратом Пегасис® и связанным с ним контрольным IFA отслеживали на клетках Vero-E6, инфицированных SARS-CoV-2. Результаты демонстрируют мощное влияние IFA25 по сравнению с препаратом Пегасис® или контрольным IFA (IFA202), тем самым подтверждая предыдущие результаты с помощью анализа СТГ, с  $EC_{50}$   $4,4 \times 10^{-7}$  мкМ (фиг. 6D-E).

### ПРИМЕР III

#### Высвобождение цитокинов

*III.a - Оценка высвобождения цитокинов (CRA) из клеток человеческой цельной крови*

[00320] Анализ стимуляции клеток цельной крови (WBC) *ex vivo* использовали для изучения высвобождения цитокинов после стимуляции IFA. Лейкоциты собирали у четырех здоровых доноров, разводили в отношении 1/3 в RPMI1640 (72400-021, Gibco) и распределяли по стерильным реакционным пробиркам (300 мкл). Клетки оставляли нестимулированными, либо стимулировали LPS (липополисахарид) 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 часов при 37°C. Затем супернатанты собирали и замораживали при -20°C до дня анализа.

[00321] Провоспалительные цитокины человека анализировали с помощью 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).

[00322] На фиг. 7 представлен пример результатов оценки высвобождения цитокинов *in vitro* из человеческих лейкоцитов, как нестимулированных, так и обработанных LPS или IFA1.

[00323] Дополнительные результаты тестирования IFA на основе IFN $\beta$ /мутированного IFN $\beta$  и IFA на основе IFN $\alpha$  суммированы в таблицах 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 индуцирует IP10 (CXCL10), который является биомаркером пути IFN и уменьшает уровень IL-10. Тестировали два IFA на основе IFN $\beta$  (таблица 11a) и шесть IFA на основе IFN $\alpha$  (таблица 11b). Все IFA индуцировали биомаркер IP10. Однако они не индуцировали IL-10, IL-1 $\beta$  и IL-2, но индуцировали высвобождение только IFN $\gamma$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  на уровне от очень низкого до умеренного, что указывает на благоприятный профиль безопасности в отношении индукции воспалительных цитокинов.

#### ПРИМЕР IV

##### Фармакокинетические исследования

##### *IV.a - Разработка анализа ELISA для количественного определения IFA*

[00324] Для количественного анализа ELISA 96-луночные планшеты (PLATES 96-луночный Maxisorp, THERMO Scientifique; 442404) покрывали в течение ночи при 4°C 100 мкл рекомбинантного человеческого CD40/TNFRSF5 химерного белка Fc, состоящего из внеклеточного домена человеческого CD40, слитого с областью Fc человеческого IgG1 (CD40-Fc; R&D Systems; 1493-CDB-050), в концентрации 0,5 мкг/мл в карбонате натрия (0,05 М, pH 9,6, C-3041, Sigma). Планшеты, после их опорожнения путем переворачивания, инкубировали в течение 1 часа при 37°C в PBS, содержащем 0,05% Tween20 и 1% молоко (SIGMA; 70166-500 г), с последующей промывкой PBS-0,05% Tween20. Образцы и контрольные образцы (100 мкл 1/2 серийных разведений) затем инкубировали в течение 90 минут при 37°C с последующими тремя промывками (PBS - 0,05% Tween20), после чего инкубировали с HRP-конъюгатом вторичного анти-IgG2 антитела (1/5000, ab99779, Abcam) или HRP-конъюгатом анти-IFN $\alpha$  антитела (1/1000, eBIOSCIENCE/Invitrogen; BMS216MST) в PBS, содержащем 0,05% Tween20 и 1% молоко. После трех промывок PBS добавляли 0,05% Tween2, TMB (тетраметилбензидин, Tebu Bio; TMBW-1000-01), и планшеты инкубировали в течение 20 минут в темноте. Реакцию останавливали добавлением 1M HCl. Планшеты считывали при 450-650 нм на ридере для многолуночных планшетов Ensign (Perkin Elmer). Количественное определение Пегасис оценивали с помощью аналогичных этапов протокола, но с парами антител, соответствующих IFN $\alpha$  человека, от eBioscience/Invitrogen. Захват осуществляли с помощью 100 мкл человеческого анти-IFN $\alpha$  антитела (eBioscience/Invitrogen; BMS216MST) в концентрации 1 мкг/мл в карбонате натрия (0,05 М, pH 9,6, C-3041, Sigma). Для детектирования использовали вторичное HRP-конъюгированное анти-IFN $\alpha$  антитело (1/1000, Affymetrix eBioscience/BMS216MST; 15501707) в PBS, содержащим 0,05% Tween20 и 1% молоко.

##### *IV.b - Биодоступность in vivo у мышей*

[00325] Для определения фармакокинетических параметров мышам-самцам CD1-Swiss вводили внутривенную болюсную инъекцию CP870,893, IFA25, IFA26, IFA27, IFA28, IFA29 и IFA30 вводили в дозе 0,5 мг/кг и Пегасис в дозе 0,3 мг/кг, и образцы крови собирали в разные моменты времени. Примеры количественного определения

циркулирующих молекул с помощью подхода ELISA, описанного выше, и их выявления с помощью HRP-конъюгированного анти-IFN $\alpha$  антитела показаны на фиг. 8A и 8B, тогда как примеры количественного определения, выявленного с помощью HRP-конъюгированного анти-IgG2 антитела, показаны на фиг. 8C; количественная оценка препарата Пегасис показана на фиг. 8D. В одной серии экспериментов, обобщенных в таблице 12A, параметры PK для CP870,893 исследовали в 7-дневном эксперименте, а параметры IFA27, IFA29 и IFA30 исследовали в 10-дневных экспериментах (количественное определение IFA27 выполняли с помощью 2 разных подходов ELISA). В другой серии экспериментов, обобщенных в Таблице 12B, параметры PK для CP870,893 и IFA25, IFA26, IFA28 и Пегасис исследовали в 21-дневных экспериментах (количественное определение IFA25 выполняли с помощью двух разных подходов ELISA).

[00326] После короткой фазы распределения фармакокинетические профили IFA характеризуются длительным периодом полувыведения из сыворотки, составляющим от 116 до 218 часов (таблица 12A и таблица 12B). Очень похожие фармакокинетические профили были получены для 6 протестированных IFA с высоким уровнем циркуляции даже через десять дней после введения однократной дозы. Фармакокинетические параметры, суммированные в таблице 12A/B, показывают, что циркулирующие в крови IFA неожиданно продемонстрировали более высокое системное воздействие (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, родительского антитела CP870,893 (3,2-кратное увеличение), что также отражает более низкие значения клиренса IFA. Объем распределения  $V_{ss}$  был низким и составлял от 50 до 105 мл/кг, несколько превышая сосудистый объем плазмы (50 мл/кг) у этого вида. Для всех IFA клиренс был оценен как являющийся низким (от 0,28 до 0,49 мл/ч/кг). Интересно, что клиренс Пегасиса (1,4 мл/час/кг) почти в 7 раз превышал клиренс IFA (например, 0,2 мл/час/кг для IFA27), что демонстрирует более высокую системную экспозицию IFA.

#### ПРИМЕР V

##### *V.a - Функциональная активность IFA без области Fc на репортерных клетках*

[00327] Для определения, необходима ли область Fc IFA для активности, разрабатывали и получали продукты слияния IFN $\alpha$  с C-концевой частью LC, связанной с фрагментом Fab HC. IFN $\alpha$  связывали с частью LC с помощью линкера (G4S) $_2$  (IFA50) или (G4S) $_3$  (IFA51).

[00328] Оценка на клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L показала, что такие IFA все еще проявляют CD40 агонистическую активность (фиг. 9A) и активируют путь CD40 со значением EC $_{50}$  примерно 128 нг/мл (IFA50) и 123 нг/мл (IFA51), соответственно.

[00329] Оценка активности IFN на клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> IFN- $\alpha/\beta$  показала, что оба тестируемых IFA проявляют активность IFN (фиг. 9B). Значения EC $_{50}$  указаны в таблице 9B и составляют примерно 1,36 нг/мл для IFA50 и 1,43 нг/мл для IFA51.

*V.b - Функциональная активность IFA на основе IFN $\epsilon$  на репортерных клетках и клетках, инфицированных SARS-CoV-2*

[00330] Также разрабатывали и получали продукты слияния CP870,893 с интерфероном I третьего типа (IFN-эпсилон; IFN $\epsilon$ ). Такие IFA тестировали на клетках НЕК-Blue<sup>TM</sup> CD40L, и это позволило продемонстрировать, что они сохраняют агонистическую активность CD40. Результаты для одного такого IFA (IFA49) показаны на фиг. 10А. Оценка клеток НЕК-Blue<sup>TM</sup> hIFN- $\alpha/\beta$  (которые фактически активируются любым интерфероном I типа) показала, что IFA49 также способен активировать пути IFN-I (фиг. 10В). Значения EC<sub>50</sub> приведены в таблице 9В.

[00331] Эти результаты демонстрируют, что IFA с IFN $\epsilon$  поддерживают как IFN, так и CD40 агонистическую активность (т.е. являются бифункциональными).

[00332] Эффект IFA49 на инфицирование SARS-CoV-2 оценивали в диапазоне доз в экспериментах в режиме последующей обработки по 3 основным вариантам: изолят USA-WA1/2020 (MOI 0,05), изолят CoV-19/USA/PHC658/2021 (вариант Delta, MOI 0,05) и изолят hCoV-19/USA/MD-HP20874/2021 (вариант Omicron, MOI 0,1) (фиг. 10С-10Е). Жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня с помощью анализа СТГ.

[00333] IFA49 эффективно спасал клетки Vero E6 от цитопатического эффекта, индуцированного SARS-CoV-2, дозозависимым образом с EC<sub>50</sub>  $6,565 \times 10^{-4}$  мкМ против изолята USA-WA1/2020 (фиг. 10С), EC<sub>50</sub>  $5,45 \times 10^{-4}$  мкМ против варианта Delta (фиг. 10D) и EC<sub>50</sub>  $1,517 \times 10^{-3}$  мкМ против варианта Omicron (фиг. 10Е).

*В.с - Функциональная активность IFA на основе IFN $\omega$  на репортерных клетках и клетках, инфицированных SARS-CoV-2*

[00334] Также разрабатывали и получали продукты слияния CP870,893 с четвертым интерфероном I типа (IFN омега; IFN $\omega$ ). Такие IFA тестировали на клетках НЕК-Blue<sup>TM</sup> CD40L, и результаты показали, что они сохраняют CD40 агонистическую активность. Результаты для одного такого IFA (IFA46) показаны на фиг. 11А. Оценка клеток НЕК-Blue<sup>TM</sup> hIFN- $\alpha/\beta$  (которые фактически активируются любым интерфероном I типа) показала, что IFA46 также способен активировать пути IFN-I (фиг. 11В). Значения EC<sub>50</sub> приведены в таблице 9В.

[00335] Эти результаты демонстрируют, что IFA с IFN $\omega$  поддерживают как активность IFN, так и CD40 агонистическую активность (т.е. являются бифункциональными).

[00336] Влияние IFA46 на инфекцию SARS-CoV-2 оценивали в диапазоне доз в экспериментах в режиме последующей обработки по 3 основным вариантам: изолят USA-WA1/2020 (MOI 0,05), изолят hCoV-19/USA/MD-HP20874/2021 (вариант Delta, MOI 0,05) и изолят hCoV-19/USA/MD-HP20874/2021 (вариант Omicron, MOI 0,1) (фиг. 11С-11Е). Жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня с помощью анализа СТГ.

[00337] IFA46 эффективно спасал клетки Vero E6 от цитопатического эффекта, индуцированного SARS-CoV-2, дозозависимым образом, при этом 100% спасение клеток Vero E6, инфицированных изолятом USA-WA1/2020, достигалось при самой высокой концентрации (фиг. 11С), EC<sub>50</sub>  $8,395 \times 10^{-4}$  мкМ против штамма Delta (фиг. 11D) и EC<sub>50</sub>  $2,111 \times 10^{-5}$  мкМ против штамма Omicron (фиг. 11Е).

*V.d - Функциональная активность IFA на основе IFN $\gamma$  на репортерных клетках и клетках, инфицированных SARS-CoV-2*

[00338] Также разрабатывали и получали продукты слияния CP870,893 с интерфероном типа II (IFN гамма; IFN $\gamma$ ). Оценка этих IFA на клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L показывает, что они сохраняют CD40 агонистическую активность независимо от того, с С-концевой частью какой цепи связан IFN $\gamma$ : LC (IFA42) или HC (IFA43) (фиг. 12A). Оценка этих IFA на клетках HEK-Blue<sup>TM</sup>-IFN $\gamma$  (фиг. 12B) показала, что они также способны активировать путь IFN $\gamma$ . Активность IFN $\gamma$  несколько различалась между IFA42 (EC<sub>50</sub>: 15 нг/мл) и IFA43 (EC<sub>50</sub>: <0,01 нг/мл). Значения EC<sub>50</sub> приведены в таблице 9B.

[00339] В совокупности эти результаты демонстрируют, что IFA с IFN $\gamma$  сохраняют как IFN, так и CD40 агонистическую активность (т.е. являются бифункциональными).

[00340] Влияние IFA42 и IFA43 на инфицирование SARS-CoV-2 оценивали в диапазоне доз в экспериментах в режиме последующей обработки по 3 основным вариантам: изолят USA-WA1/2020 (MOI 0,05), изолят hCoV-19/USA/PHC658/2021 (вариант Delta, MOI 0,05) и изолят hCoV-19/USA/MD-HP20874/2021 (вариант Omicron, MOI 0,1) (фиг. 12C-12H). Жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня с помощью анализа CTG.

[00341] Результаты показывают, что IFA42 эффективно спасал клетки Vero E6 от цитопатического эффекта, индуцированного SARS-CoV-2, дозозависимым образом с EC<sub>50</sub>  $1,195 \times 10^{-3}$  мкМ против изолята USA-WA1/2020 (фиг. 12C), EC<sub>50</sub>  $0,9971 \times 10^{-3}$  мкМ против варианта Delta (фиг. 12D) и EC<sub>50</sub>  $0,6351 \times 10^{-3}$  мкМ против варианта Omicron (фиг. 12E). IFA43 эффективно спасал клетки Vero E6 от цитопатического эффекта, индуцированного SARS-CoV-2, дозозависимым образом с EC<sub>50</sub>  $1,063 \times 10^{-3}$  мкМ против изолята USA-WA1/2020 (фиг. 12F), EC<sub>50</sub>  $1,812 \times 10^{-4}$  мкМ против варианта Delta (фиг. 12G) и EC<sub>50</sub>  $7,575 \times 10^{-5}$  мкМ против варианта Omicron (фиг. 12H).

*V.e - Функциональная активность IFA на основе IFN $\lambda$  на репортерных клетках и на клетках, инфицированных SARS-CoV-2*

[00342] Также разрабатывали и получали продукты слияния CP870,893 с интерфероном типа III (IFN лямбда; IFN $\lambda$ ). Эти IFA тестировали на клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L, и результаты показали, что они также сохраняют CD40 агонистическую активность, независимо от того, с С-концевой частью какой цепи связан IFN $\lambda$ : LC (IFA44) или HC (IFA45) (фиг. 13A). Оценка этих IFA на клетках HEK-Blue<sup>TM</sup>-IFN $\lambda$  показала, что они также способны активировать IFN $\lambda$ -путь (фиг. 13B). Значения EC<sub>50</sub> приведены в таблице 9B. Эти результаты также демонстрируют, что IFA с IFN $\lambda$  поддерживают как активность IFN, так и CD40 агонистическую активность (т.е. являются бифункциональными).

[00343] Влияние IFA44 и IFA45 на инфицирование SARS-CoV-2 оценивали в диапазоне доз в экспериментах в режиме последующей обработки по 3 основным вариантам: изолят USA-WA1/2020 (MOI 0,05), изолят hCoV-19/USA/PHC658/2021 (вариант Delta, MOI 0,05) и изолят hCoV-19/USA/MD-HP20874/2021 (вариант Omicron,



МОИ 0,1) (фиг. 13С-13Н). Жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня с помощью анализа СТГ.

[00344] IFA44 эффективно спасал клетки Vero E6 от цитопатического эффекта, индуцированного SARS-CoV-2, дозозависимым образом, при этом спасение клеток Vero E6, инфицированных изолятом USA-WA1/2020, достигало более 60% при концентрации  $10^{-1}$  мкМ (фиг. 13С), с  $EC_{50}$   $1,628 \times 10^{-2}$  мкМ против варианта Delta (фиг. 13D) и  $EC_{50}$   $2,132 \times 10^{-2}$  мкМ против варианта Omicron (Фиг. 13Е). IFA45 эффективно спасал клетки Vero E6 от цитопатического эффекта, индуцированного SARS-CoV-2, дозозависимым образом с  $EC_{50}$   $1,458 \times 10^{-2}$  мкМ против изолята USA-WA1/2020 (фиг. 13F),  $EC_{50}$   $6,789 \times 10^{-3}$  мкМ против варианта Delta (фиг. 13G) и  $EC_{50}$   $2,329 \times 10^{-2}$  мкМ против варианта Omicron (фиг. 13Н).

#### ПРИМЕР VI

Получение слитых с интерфероном антител (IFA) на основе анти-CD40 антитела 3G5 и их характеристика на репортерных клетках

##### *VI.a - Разработка IFA*

[00345] Комбинации последовательностей приведенных в качестве примера IFA, созданных с использованием анти-CD40 антитела 3G5 (Celldex) в качестве каркасного антитела, с расположением IFN и природой линкеров приведены в таблице 8 и таблице 10. IFN сливали через линкер с С-концевой частью легкой цепи (LC) или тяжелой цепи (HC), как указано в таблице 8. Нуклеиновые кислоты, кодирующие HC, LC или продукты слияния синтезировали с оптимизированными кодонами для экспрессии в млекопитающих и клонировали в эукариотический вектор экспрессии, такой как pcDNA3.1 (Invitrogen).

##### *VI.b - Производство IFA*

[00346] Производство IFA осуществляли, как описано ранее, и выход продуктов указан в Таблице 10. Для некоторых IFA выход продукта был очень низким, в основном для продуктов слияния  $IFN\beta$  с С-концевой частью LC. Для этих IFA агонистическую активность CD40 и IFN оценивали непосредственно в супернатанте, содержащем IFA, без какой-либо дополнительной очистки. Анализ очищенных IFA с помощью SDS-PAGE в редуцирующих условиях показал наличие двух основных полос, соответствующих HC и LC. При слиянии IFN с HC наблюдали сдвиг молекулярной массы (фиг. 14).

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

[00347] Характеристику IFA 3G5 на репортерных клетках выполняли на клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L (фиг. 15А-В и фиг. 16А) и HEK-Blue<sup>TM</sup>  $IFN-\alpha/\beta$  (фиг. 15С-Д и фиг. 16В), как описано ранее (см. I.c).

##### *VI.c.1. IFA на основе $IFN\beta$*

[00348] На фиг. 15 показаны примеры ответов доз IFA, где  $IFN\beta$  был слит с HC или LC 3G5, на клетках HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L и HEK-Blue<sup>TM</sup>  $IFN-\alpha/\beta$  (фиг. 15). Результаты, обобщенные в таблице 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.

[00349] Примеры CD40 активности показаны на фиг. 15А и фиг. 15В. Продукты слияния IFN $\beta$  с С-концевой частью НС демонстрируют высоко варьируемую анти-CD40 активность, которая во всех случаях ниже, чем у родительского антитела, со значениями EC<sub>50</sub> в диапазоне от 30 нг/мл до 190,5 нг/мл (фиг. 15А и таблица 10). Среднее значение EC<sub>50</sub> для родительского антитела 3G5 составляет 9,3 нг/мл.

[00350] Для продуктов слияния с С-концевой частью LC выход продуктов был очень низким. Активность оценивали в супернатанте, содержащем IFA, после сверхэкспрессии в клетках НЕК. Оценка этих супернатантов на НЕК-Blue™ CD40L (фиг. 15В) демонстрирует, что эти IFA активны в отношении пути CD40. В случае антитела 3G5 агонистическая анти-CD40 активность все еще обнаруживается при 300-кратном разбавлении супернатанта. Однако для детектирования этой активности в супернатантах, содержащих IFA, их требовалось разводить 1/10 (фиг. 15В).

[00351] Активность IFN, проявляемую IFA, тестировали на клетках НЕК-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$ , и результаты суммированы в таблице 10. Примеры показаны на фиг. 15С-Д. У продуктов слияния IFN $\beta$  с С-концевой частью НС IFN активность варьирует в зависимости от последовательности линкера со значениями EC<sub>50</sub> в диапазоне от 0,45 нг/мл до 10,3 нг/мл (фиг. 15С). Для содержащегося в супернатанте IFA с IFN $\beta$ , слитым с С-концевой частью LC, IFN активность все еще обнаруживается даже после 10000-кратного разведения супернатанта (фиг. 15Д).

#### *VI.с.2. IFA на основе IFN $\alpha$*

[00352] На фиг. 16А-В показаны примеры ответов дозы IFA, где IFN $\alpha$  слит с НС 3G5, на клетках НЕК-Blue™ CD40L (фиг. 16А) и НЕК-Blue™ IFN $\alpha/\beta$  (фиг. 16В).

[00353] Результаты показывают, что все IFA демонстрируют функциональную активацию как пути CD40, так и пути IFN $\alpha/\beta$  дозозависимым образом (средние значения EC<sub>50</sub> представлены в Таблице 10).

[00354] Для всех IFA на основе IFN $\alpha$  эффективность влияния на путь CD40 была аналогична эффективности влияния родительского антитела со средними значениями EC<sub>50</sub> в диапазоне от 11,74 нг/мл до 14,2 нг/мл (фиг. 16А и таблица 10). Среднее значение EC<sub>50</sub> для родительского антитела 3G5 составляет 9,3 нг/мл.

[00355] Активность IFN у IFA на основе IFN $\alpha$  тестировали на клетках НЕК-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$ , которая оказалась очень высокой. Средние значения EC<sub>50</sub> для активности IFN у этих IFA варьировали от 0,04 нг/мл до 0,12 нг/мл (фиг. 16В и таблица 10).

#### *VI.с.3. IFA на основе IFN $\gamma$*

[00356] Оценка IFA125 на клетках НЕК-Blue™ CD40L и на клетках НЕК-Blue™ IFN $\gamma$ , как описано ранее (см. I.с), показала, что IFA125 является функциональным и способен активировать как путь CD40, так и путь IFN $\gamma$  (Таблица 10В).

[00357] Эффект IFA125 на инфицирование SARS-CoV-2 оценивали в диапазоне доз в экспериментах в режиме последующей обработки по 3 основным вариантам: изолят USA-WA1/2020 (MOI 0,05), изолят CoV-19/USA/PHC658/2021 (вариант Delta, MOI 0,05) и

изолят hCoV-19/USA/MD-HP20874/2021 (вариант Omicron, MOI 0,1) (фиг. 16C-16E). Жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня с помощью анализа СТГ.

[00358] IFA125 эффективно спасал клетки Vero E6 от цитопатического эффекта, индуцированного SARS-CoV-2, дозозависимым образом со 100% уровнем спасения клеток Vero E6, инфицированных изолятом USA-WA1/2020, при концентрации  $10^{-4}$  мкМ (фиг. 16C) с  $EC_{50}$   $4,283 \times 10^{-6}$  мкМ против варианта Delta (фиг. 16D) и  $EC_{50}$   $7,482 \times 10^{-6}$  мкМ против варианта Omicron (фиг. 16E).

#### *VI.d - Получение и характеристика IFA без области Fc*

[00359] Подходящие конструкции по изобретению также могут представлять собой ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки без области Fc. Разрабатывали конструкцию, кодирующую тяжелую цепь фрагмента Fab 3G5, слитую с меткой TEV-His (SEQ ID NO 65), которую клонировали в экспрессирующую плазмиду pсDNA3.1. Эту конструкцию котрансфицировали в клетки HEK, как описано ранее, при этом LC сливали через различные линкеры с IFN, такие как SEQ ID NO 70 или SEQ ID NO 71. Белки и/или супернатанты оценивали в репортерных клетках и/или оценивали их влияние на инфицированные коронавирусом клетки. Специалисту в данной области техники будет понятно, что конструкции для применения в терапии не будут содержать метку TEV-His. Эти конструкции также являются вариантами осуществления изобретения. Ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки без области Fc будут активны против коронавирусной инфекции.

#### ПРИМЕР VII

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

[00360] Анализ стимуляции WBC *ex vivo* использовали для исследования высвобождения цитокинов после стимуляции IFA, как описано ранее (см. III.a). Пример с IFA109 показан на фиг. 17 и в таблице 13. Результаты показывают, что все IFA индуцируют высвобождение CXCL10. Все IFA не индуцируют высвобождение IL-10, IL-1 $\beta$  и IL-2, однако индуцируют высвобождение только IFN $\gamma$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  на уровне от очень низкого до умеренного, что указывает на благоприятный профиль безопасности в отношении индукции воспалительных цитокинов.

#### ПРИМЕР VIII

##### Влияние IFA на эпителий носовых и бронхиальных дыхательных путей человека, инфицированных SARS-CoV-2

*VIII.a - Экспрессия РНК CD40 и IFNAR и цитометрический анализ в назальных и бронхиальных клетках человека*

[00361] Экспрессию CD40 и IFNAR оценивали с помощью анализа методом ОТ-кПЦР в человеческих первичных назальных и бронхиальных клетках, культивированных на границе раздела воздух-жидкость, в инфицированном и неинфицированном состоянии. Тотальную РНК экстрагировали из человеческих первичных назальных и бронхиальных клеток (неинфицированных или инфицированных) в соответствии с рекомендациями производителя (система выделения тотальной РНК SV96, кат. № Z3505). Вкратце, систему

выделения тотальной РНК SV 96, сочетающую разрушающие и защитные свойства гуанидинтиоцианата (GTC) и  $\beta$ -меркаптоэтанола, использовали для разрушения нуклеопротеиновых комплексов и инактивации рибонуклеаз, присутствующих в клеточных экстрактах.

[00362] Затем клеточный лизат наносили на планшет для связывания тотальной РНК с колонками. Свободную от РНКазы ДНКазу I наносили непосредственно на кремнеземную мембрану для расщепления загрязняющей геномной ДНК. Связанную тотальную РНК дополнительно очищали от примесей солей, белков и клеточных примесей с помощью простых стадий промывки. Наконец, тотальную РНК элюировали с мембраны добавлением воды, не содержащей нуклеазу. После элюирования 500 нг РНК сначала использовали в качестве матрицы для синтеза кДНК в соответствии с инструкциями производителя (кат. № 11754050). Затем, используя карту массива рецепторов TLDA (ThermoFisher Scientific), выполняли количественную оценку для одновременной оценки уровня мРНК специфических рецепторов, включая CD40 (анализ Taqman Hs00374176), IFNAR1 (анализ Taqman Hs01066116) и IFNAR2 (анализ Taqman Hs00174198). В анализ также была включена экспрессия мРНК генов «домашнего хозяйства», включая GAPDH (анализ Taqman Hs99999905), GUSB (анализ Taqman Hs99999908), TBP (анализ Taqman Hs99999910) и RPLP0 (анализ Taqman Hs99999902) для оценки потенциальных изменений мРНК во всех 4 протестированных условиях со значением Ct ниже 25 для каждого рецептора (фиг. 18А).

[00363] Экспрессию CD40 и IFNAR также подтверждали на уровне белка с помощью цитометрического анализа в неинфицированных назальных и бронхиальных клетках, культивированных на границе раздела воздух-жидкость (фиг. 18В). Человеческие первичные назальные и бронхиальные клетки ( $0,2 \times 10^6$  клеток/лунку) ресуспендировали в буфере PBS 1X+2 mM ЭДТА+0,5% BSA + (PEB) в присутствии маркера жизнеспособности Aqua LIVE/DEAD (Invitrogen L34957) в течение 30 минут при 4°C. После центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут при 4°C клетки ресуспендировали в 100 мкл PEB в присутствии анти-CD40-APC антитела (Miltenyi, 130-110-947) или соответствующего контрольного изотипа-APC (Miltenyi 130-113-434), в присутствии анти-IFNAR1-APC антитела (Bio-technie SAS, FAB245A) или соответствующего контрольного изотипа-APC (Bio-technie SAS, IC002A) и в присутствии анти-IFNAR2-APC антитела (Miltenyi, 130-099-558) или соответствующего контрольного изотипа-APC (Miltenyi, 130-113-434). Клетки инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки центрифугировали, промывали, фиксировали в течение 10 мин при 4°C в присутствии 4% PFA. После центрифугирования и промывки клетки ресуспендировали в буфере PEB, анализировали на цитометре MACSQuant16 и с помощью программного обеспечения Flowjo.

*VIII.b - Модель инфицирования SARS-CoV-2 в человеческих первичных клетках на границе интерфейса «воздух-жидкость».*

[00364] MucilAir™ (Epithelix) представляет собой клеточную модель эпителия

дыхательных путей человека *in vitro*, культивируемую на границе раздела воздух-жидкость. Готовый к использованию эпителий хранили в культуральной среде MucilAir™ (кат. № EP05MM) в специальном инкубаторе при 37°C, влажности 95% и 5% CO<sub>2</sub>. В этих системах MucilAir™ обработку можно применять до, во время или после стадии заражения. Для оценки IFA разрабатывали две схемы обработки, названные соответственно последующая обработка и предварительная обработка, которые состояли в следующем.

[00365] Схема последующей обработки (2 или 3 обработки): В день заражения апикальную поверхность эпителия дважды промывали Opti-MEM (кат. номер 31985-062), затем инфицировали изолятом SARS-CoV-2 USA-WA1/2020 при MOI 0,1 в течение 1 часа. После этого клетки дважды промывали Opti-MEM для удаления остаточного вирусного инокулята, и в базальный отсек добавляли свежую культуральную среду MucilAir™, дополненную представляющим интерес агентом обработки. В 96-часовом кинетическом исследовании вторую обработку применяли через 48 часов во время обновления среды. В 168-часовом кинетическом исследовании вторую и третью обработки выполняли через 48 часов и 96 часов во время обновления среды. Апикальный смыв собирали, в зависимости от кинетики, через 48, 96 и 168 часов в Opti-MEM для ОТ-кПЦР SARS-CoV-2 (вирусный нуклеоспин 96, кат. № 740691) и оценки TCID<sub>50</sub>, как описано ниже. В конце (96 часовой или 168 часовой) кинетического исследования эпителий лизировали с помощью набора для лизиса РНК (cat#Z3505) для внутриклеточной количественной оценки SARS-CoV-2 методом ОТ-кПЦР, как описано ниже.

[00366] Схема предварительной обработки: в день заражения свежую культуральную среду MucilAir™, дополненную представляющим интерес агентом обработки, добавляли в базальный отсек за 3 часа до заражения. Затем апикальную поверхность эпителия дважды промывали Opti-MEM (каталогу № 31985-062), и затем инфицировали изолятом SARS-CoV-2 USA-WA1/2020 при 0,1 MOI в течение 1 часа. После этого клетки дважды промывали Opti-MEM для удаления остаточного вирусного инокулята и свежую культуральную среду MucilAir™ без обработки добавляли в базальный отсек на 48 часов. В конце кинетического исследования апикальный смыв собирали в Opti-MEM для ОТ-кПЦР SARS-CoV-2 и оценки TCID<sub>50</sub>, как описано ниже. Затем эпителий лизировали с помощью набора для лизиса РНК (кат. № Z3505) в соответствии с инструкциями производителя для внутриклеточной количественной оценки SARS-CoV-2 методом ОТ-кПЦР, как описано ниже.

[00367] Количественное определение вирусной РНК SARS-CoV-2: Вкратце, для количественного определения вирусной РНК в апикальных смывах, по 100 мкл смыва на каждое условие обработки экстрагировали с помощью набора для экстракции вирус-специфической нуклеиновой кислоты (вирусный нуклеокапсин 96, кат. номер 74061 от Macherey-Nagel), следуя инструкциям производителя. Затем вирусную РНК элюировали в 100 мкл воды, не содержащей нуклеазы, перед количественным определением с помощью ОТ-кПЦР. Для количественного определения методом ОТ-кПЦР 5 мкл вирусной РНК

добавляли к реакционной смеси TaqMan Fast Virus 1-step Master mix (#4444434, Thermo Fisher), SARS-CoV-2 20X Taqman assay (# 4332078, прямой праймер 5'-GACCCCAAAATCAGCGAAAT-3'; обратный праймер 5'-TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG-3; зонд FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-MGB-NFQ) и воде, не содержащей нуклеазу. После первоначального этапа обратной транскрипции в течение 5 минут при 50°C для генерации кДНК этап инактивации фермента выполняли в течение 20 секунд при 95°C. Продукт ПЦР сразу амплифицировали в 40 циклах ПЦР (стадия денатурации в течение 3 секунд при 95°C с последующим отжигом и удлинением в течение 30 секунд при 60°C). Число копий SARS-CoV-2 вычисляли, используя десятикратное серийное разведение внутреннего эталонного стандарта геномной РНК SARS-CoV-2, амплифицированного в тех же условиях.

[00368] Для количественного определения вирусной РНК в ткани MucilAir™ сначала РНК экстрагировали с использованием набора для лизиса РНК (Cat#Z3505), как уже описано выше. Затем тотальную РНК элюировали в 100 мкл воды, не содержащей нуклеазу, для амплификации и количественного анализа методом ОТ-кПЦР, как описано выше.

[00369] Определение титров вируса SARS-CoV-2: Вкратце, для каждого условия обработки объединяли одинаковый объем апикальных смывов из биологических повторов, что представляло собой один образец для каждой группы. Затем готовили серийные десятикратные разведения этих образцов, которые наносили на клетки Vero E6, высеянные в день 1. СРЕ оценивали через 3 дня с помощью анализа CellTiter-Glo и использовали для определения конечной точки инфекции. Для вычисления 50% инфекционных доз культуры клеточной ткани на мл (TCID<sub>50</sub>/мл) апикального смыва использовали пять повторов.

*VIII.c - Эффект IFA25 и IFA27 на инфицирование SARS-CoV-2 в системе первичных клеток человека*

[00370] Оценивали влияние IFA25 и IFA27 на человеческие первичные назальные и бронхиальные клетки, культивированные на границе раздела воздух-жидкость и инфицированные изолятом SARS-CoV-2 USA-WA1/2020 при 0,1 MOI, согласно примеру VIII.b. Во-первых, IFA27, протестированный при 0,1 нМ и 1 нМ, продемонстрировал дозозависимый эффект, приводящий к снижению содержания вирусной РНК в носовых тканях (фиг. 19А) и апикальном смыве назальных клеток (фиг. 19В). Более того, обработка IFA27 в самой высокой дозе устраняла продуцирование инфекционного вируса *de novo*, о чем свидетельствует титр TCID<sub>50</sub> в апикальных смывах (фиг. 19С). Противовирусный эффект также наблюдали в бронхиальных клетках, о чем свидетельствует нагрузка вирусной РНК в ткани (фиг. 20А) и нагрузка вирусной РНК в апикальных смывах (фиг. 20В). Противовирусный препарат прямого действия Ремдесивир показал дозозависимое влияние на нагрузку вирусной РНК и титр инфекционного вируса в гораздо более высоких концентрациях (1,25 мкМ и 5 мкМ), чем IFA27, при тестировании в тех же экспериментах.

[00371] Кроме того, IFA25 проявлял противовирусную активность как на уровне РНК, так и на уровне инфекционного вируса, о чем свидетельствует ингибирование вируса в носовых тканях (фиг. 21) и бронхиальной ткани (фиг. 23). Противовирусный эффект IFA25 достигался при самой низкой испытанной дозе 1 нМ, тогда как лечение Ремдесивиром продемонстрировало влияние диапазона доз и достижение ингибирования при концентрациях, значительно превышающих концентрации IFA25. Кроме того, IFA25 и Ремдесивир тестировали в схеме предварительной обработки, как описано выше. В схеме предварительной обработки IFA25 оставался высокоэффективным в отношении инфекции SARS-CoV-2 в назальных клетках (фиг. 22) и бронхиальных клетках (фиг. 24). Снижение нагрузки вирусной РНК наблюдали во внутриклеточном компартменте (фиг. 22А и 24А) и в апикальных смывах (фиг. 22В и 24В), а также наблюдали снижение титра инфекционного вируса в апикальных смывах назальных клеток (фиг. 22С). В схеме предварительной обработки также наблюдали эффект Ремдесивира на нагрузку вирусной РНК во внутриклеточном компартменте (фиг. 22А и фиг. 24А) и в апикальных смывах (фиг. 22В и фиг. 24В), но этот эффект не достигал уровня, наблюдаемого в схеме последующей обработки. Кроме того, Ремдесивир в схеме предварительной обработки не оказывал никакого влияния на титр инфекционного вируса в апикальных смывах назальных клеток (фиг. 22С).

#### Эквиваленты

[00372] Изобретение может быть выполнено в других конкретных формах без отклонения от сути или существенных характеристик. Поэтому вышеизложенные варианты осуществления следует рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение. Таким образом, объем заявленного изобретения определен прилагаемой формулой изобретения, а не приведенным выше описанием, следовательно, все изменения, которые входят в объем и диапазон эквивалентности формулы изобретения, охвачены настоящим описанием.

#### Признаки

[00373] Исходя из изложенного выше следует понимать, что настоящее изобретение также включает следующие признаки:

1. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, содержащий
  - (I) агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, и
  - (II) интерферон (IFN) или его функциональный фрагмент для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции.
2. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 1, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарности области легкой цепи (CDR), которые на по меньшей мере 90% идентичны последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO 3; и три CDR тяжелой цепи, которые на по меньшей мере 90% идентичны последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID

NO 6;

предпочтительно, агонистическое анти-CD40-антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDR), которые на по меньшей мере 95% идентичны последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO 3; и три CDR тяжелой цепи, которые на по меньшей мере 95% идентичны последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO 6;

более предпочтительно, агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDR), которые на по меньшей мере 98% идентичны последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO 3; и три CDR тяжелой цепи, которые на по меньшей мере 98% идентичны последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO 6;

или еще более предпочтительно, агонистическое анти-CD40-антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDR), которые на по меньшей мере 99% идентичны последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO: 3; и три CDR тяжелой цепи, которые на по меньшей мере 99% идентичны последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO 6.

3. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 1 или п. 2, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие 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. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 2 или п. 3, где каждая CDR определена в соответствии с определением по Кабат, определением по Чотиа, определением по AbM или определением CDR по методу Контакт; предпочтительно, где каждая CDR определена в соответствии с определением CDR по Кабат или определением CDR по Чотиа.

5. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 1, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(I)

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

(b) легкую цепь или ее фрагмент, содержащие CDRL1, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO 52, CDRL2, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ



ID NO 53, и CDRL3, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO 54;

предпочтительно (II)

(a) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO 56, CDRH2, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO 57, и CDRH3 которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO 58; и

(b) легкую цепь или ее фрагмент, содержащие CDRL1, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO 52, CDRL2, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO 53, и CDRL3, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO 54;

более предпочтительно (III)

(a) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, которая на по меньшей мере 98% идентична SEQ ID NO 56, CDRH2, которая на по меньшей мере 98% идентична SEQ ID NO 57, и CDRH3 которая на по меньшей мере 98% идентична SEQ ID NO 58; и

(b) легкую цепь или ее фрагмент, содержащие CDRL1, которая на по меньшей мере 98% идентична SEQ ID NO 52, CDRL2, которая на по меньшей мере 98% идентична SEQ ID NO 53, и CDRL3, которая на по меньшей мере 98% идентична SEQ ID NO 54; или

еще более предпочтительно (IV)

(a) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, которая на по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 56, CDRH2, которая на по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 57, и CDRH3 которая на по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 58; и

(b) легкую цепь или ее фрагмент, содержащие CDRL1, которая на по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 52, CDRL2, которая на по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 53, и CDRL3, которая на по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 54.

6. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 1, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит

(a) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащие 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, содержащие CDRL1, которая идентична SEQ ID NO 52, CDRL2, которая идентична SEQ ID NO 53, и CDRL3, которая идентична SEQ ID NO 54.

7. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из предшествующих пунктов, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи  $V_L$ , содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO 51 или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; и/или переменную область тяжелой цепи  $V_H$ , содержащую последовательность, представленную в SEQ ID

NO 55, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%;

предпочтительно, агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи  $V_L$ , содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 51; и/или переменную область тяжелой цепи  $V_H$ , содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 55;

более предпочтительно, агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи  $V_L$ , содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 51; и/или переменную область тяжелой цепи  $V_H$ , содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 55;

еще более предпочтительно агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи  $V_L$ , содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 51; и/или переменную область тяжелой цепи  $V_H$ , содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 55; или

наиболее предпочтительно агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи  $V_L$ , содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO 51, и переменную область тяжелой цепи  $V_H$ , содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55.

8. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из предшествующих пунктов, где тяжелая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит тяжелую цепь области Fab, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO 12, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

9. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из предшествующих пунктов, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3 или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 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 на по меньшей мере 90%;

предпочтительно, агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит

последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 3; и/или тяжелую цепь (HC), которая содержит последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, представленной в группе последовательностей, состоящей из SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 49 и SEQ ID NO 48;

более предпочтительно, агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 3; и/или тяжелую цепь (HC), которая содержит последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична последовательности, представленной в группе последовательностей, состоящей из SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 49 и SEQ ID NO 48;

еще более предпочтительно, агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 3; и/или тяжелую цепь (HC), которая содержит последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична последовательности, представленной в группе последовательностей, состоящей из SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 49 и SEQ ID NO 48; или

наиболее предпочтительно, агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3; и 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.

10. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 9, где HC содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 6, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

11. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 9, где HC содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 9, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

12. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п.9, где HC содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 49, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

13. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п.9, где HC содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 48, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

14. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из предшествующих пунктов, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой человеческий интерферон.

15. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из предшествующих пунктов, где IFN или его функциональный фрагмент выбирают из группы, состоящей из IFN типа I, IFN типа II и IFN типа III или их функциональных фрагментов.

16. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из предшествующих пунктов, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN типа I или его функциональный фрагмент.

17. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 16, где IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\omega$  или IFN $\epsilon$ , или их функциональные фрагменты.

18. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 16, где IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$  или IFN $\beta$ , или их функциональные фрагменты.

19. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 16, где IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\omega$  или его функциональный фрагмент.

20. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 16, где IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\epsilon$  или его функциональный фрагмент.

21. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 1-14, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IFN $\lambda$ , IFN $\omega$  или IFN $\epsilon$ , или их функциональные фрагменты.

22. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 21, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$  или IFN $\beta$ , или их функциональные фрагменты.

23. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 22, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$  или его функциональный фрагмент.

24. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 23, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$ 2a или его функциональный фрагмент.

25. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 24, где IFN $\alpha$ 2a содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 17, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

26. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 22, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\beta$  или его

функциональный фрагмент.

27. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 26, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

28. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 26, где IFN $\beta$  или его функциональный фрагмент содержит одну или две аминокислотные замены относительно SEQ ID NO 14, выбранные из C17S и N80Q.

29. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 28, где IFN $\beta$  или его функциональный фрагмент содержит аминокислотную замену C17S относительно SEQ ID NO 14.

30. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 29, где IFN $\beta$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO 15.

31. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 28, где IFN $\beta$  или его функциональный фрагмент содержит аминокислотные замены C17S и N80Q относительно SEQ ID NO 14.

32. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 31, где IFN $\beta$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO 16.

33. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п.21, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\gamma$  или IFN $\lambda$ , или их функциональные фрагменты.

34. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 33, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\gamma$  или его функциональный фрагмент.

35. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 34, где IFN $\gamma$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 19, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

36. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 33, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\lambda$  или его функциональный фрагмент.

37. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 36, где IFN $\lambda$  или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\lambda$ 2 или его функциональный фрагмент.

38. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 37, где IFN $\lambda$ 2 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 18, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере, 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

39. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из предшествующих пунктов, где IFN или его функциональный фрагмент нековалентно связан с агонистическим анти-CD40 антителом или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом.

40. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 39, где IFN или его функциональный фрагмент нековалентно связан с агонистическим анти-CD40 антителом или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом посредством взаимодействий ионных, Ван-дер-Ваальсовых и/или водородных связей.

41. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 1-38, где IFN или его функциональный фрагмент ковалентно связан с агонистическим анти-CD40 антителом или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом.

42. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п.41, где IFN или его функциональный фрагмент слит с агонистическим анти-CD40 антителом или его агонистическим антигенсвязывающим фрагментом.

43. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 42, где IFN или его функциональный фрагмент слит с легкой цепью агонистического антигенсвязывающего антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента.

44. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 43, где IFN или его функциональный фрагмент слит с N-концом легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента.

45. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 43, где IFN или его функциональный фрагмент слит с C-концом легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента.

46. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 42, где IFN или его функциональный фрагмент слит с тяжелой цепью агонистического антигенсвязывающего анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента.

47. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 46, где IFN или его функциональный фрагмент слит с N-концом тяжелой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента.

48. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 46, где IFN или его функциональный фрагмент слит с C-концом тяжелой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента.

49. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 42-48, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и IFN или его функциональный фрагмент слиты друг с другом посредством линкера.

50. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 49, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок не содержит никаких аминокислот, кроме тех, которые образуют (I) указанное агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, (II) указанный IFN или его функциональный фрагмент и (III) указанный линкер.

51. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 1-49, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок не содержит никаких аминокислот, кроме тех, которые образуют (I) указанное агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и (II) указанный IFN или его функциональный фрагмент.

52. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 49-50, где линкер представляет собой пептидный линкер.

53. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 52, где линкер содержит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислот.

54. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 53, где линкер содержит по меньшей мере 4 аминокислоты.

55. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 53, где линкер содержит по меньшей мере 11 аминокислот.

56. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 53, где линкер содержит по меньшей мере 12 аминокислот.

57. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 53, где линкер содержит по меньшей мере 13 аминокислот.

58. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 53, где линкер содержит по меньшей мере 15 аминокислот.

59. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 53, где линкер содержит по меньшей мере 20 аминокислот.

60. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 53, где линкер содержит по меньшей мере 21 аминокислоту.

61. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 53, где линкер содержит по меньшей мере 24 аминокислоты.

62. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 52, где линкер содержит до 10, до 20, до 30, до 40, до 50, до 60, до 70, до 80, до 90 или до 100 аминокислот.

63. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 62, где линкер содержит до 80 аминокислот.

64. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 62, где линкер содержит до 40 аминокислот.

65. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 62, где линкер содержит до 24 аминокислот.

66. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 62, где линкер содержит до 21 аминокислоты.

67. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 62, где линкер содержит до 20 аминокислот.

68. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 62, где линкер содержит до 15 аминокислот.

69. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 62, где линкер содержит до 13 аминокислот.

70. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 62, где линкер содержит до 12 аминокислот.

71. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 62, где линкер содержит до 11 аминокислот.

72. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 62, где линкер содержит до 4 аминокислот.

73. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 52-72, где линкер выбирают из группы, включающей кислотные, основные и нейтральные линкеры.

74. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 73, где линкер представляет собой кислотный линкер.

75. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 73 или п. 74, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 22 или SEQ ID NO 23.

76. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 73, где линкер представляет собой основной линкер.

77. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 73, где линкер представляет собой нейтральный линкер.

78. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 73 или п. 77, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25 или SEQ ID NO 26.

79. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 52-78, где линкер выбирают из группы, содержащей жесткие, гибкие и спиралеобразующие линкеры.

80. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 79, где линкер представляет собой жесткий линкер.

81. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 79 или п. 80, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID



NO 20, SEQ ID NO 22 или SEQ ID NO 23.

82. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 79, где линкер представляет собой гибкий линкер.

83. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 79 или п. 82, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25 или SEQ ID NO 26.

84. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 79, где линкер представляет собой спиралеобразующий линкер.

85. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 79 или п. 84, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 22 или SEQ ID NO 23.

86. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 52-74, 76, 77, 79, 80, 82 или 84, где линкер содержит аминокислоты глицин и серин.

87. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 86, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25 или SEQ ID NO 26.

88. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 86, где линкер дополнительно содержит аминокислоту треонин.

89. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 88, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 21.

90. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 52, где линкер содержит последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO 20-26.

91. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 90, где линкер содержит последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25 или SEQ ID NO 26.

92. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 91, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 24.

93. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 91, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 25.

94. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 91, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 26.

95. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 49, 50 или 52-94, где IFN или его функциональный фрагмент слит с C-концом тяжелой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер, приведенный в таблице 3, в частности в таблице 3А или таблице 3В, более конкретно в таблице 3А.

96. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п.95, где тяжелая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического

антигенсвязывающего фрагмента содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 48 или SEQ ID NO 49.

97. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 95 или п. 96, где  $IFN\alpha_2a$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 17.

98. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 95 или п. 96, где  $IFN\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 или SEQ ID NO 16.

99. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 98, где  $IFN\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14.

100. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 98, где  $IFN\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 15.

101. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 98, где  $IFN\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 16.

102. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 95 или п. 96, где  $IFN\gamma$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 19.

103. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 95 или п. 96, где  $IFN\lambda_2$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 18.

104. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 95-103, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок дополнительно содержит легкую цепь агонистического антигенсвязывающего анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента.

105. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 104, где легкая цепь содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3.

106. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 49, 50 или 52-94, где  $IFN$  или его функциональный фрагмент слит с N-концом тяжелой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер, приведенный в таблице 4, в частности в таблице 4A или таблице 4B, более конкретно в таблице 4A.

107. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п.106, где тяжелая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 48 или SEQ ID NO 12.

108. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 106 или п. 107, где IFN $\alpha$ 2a содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 17.

109. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 106 или п. 107, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 или SEQ ID NO 16.

110. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 109, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14.

111. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 109, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 15.

112. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 109, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 16.

113. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 106 или п. 107, где IFN $\gamma$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 19.

114. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 106 или п. 107, где IFN $\lambda$ 2 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 18.

115. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 106-114, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок дополнительно содержит легкую цепь агонистического антигенсвязывающего анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента.

116. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 115, где легкая цепь содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3.

117. Ассоциированный с интерфероном 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 агониста анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер, приведенный в таблице 5, в частности в таблице 5A или таблице 5B, более конкретно в таблице 5A.

118. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 117, где легкая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3.

119. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 117 или п. 118, где IFN $\alpha$ 2a содержит последовательность,

представленную в SEQ ID NO 17.

120. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 117 или п. 118, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 или SEQ ID NO 16.

121. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 120, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14.

122. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 120, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 15.

123. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 120, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 16.

124. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 117 или п. 118, где IFN $\gamma$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 19.

125. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 117 или п. 118, где IFN $\lambda$ 2 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 18.

126. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 117-125, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок дополнительно содержит тяжелую цепь агонистического антигенсвязывающего анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента.

127. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 126, где тяжелая цепь агонистического анти-CD40 антитела содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 49, ID NO 48 или SEQ ID NO 12.

128. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 49, 50 или 52-94, где IFN слит с N-концом легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер, приведенный в таблице 6, в частности в таблице 6А или таблице 6В, более конкретно в таблице 6А.

129. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 128, где легкая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3.

130. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 128 или п. 129, где IFN $\alpha$ 2a содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 17.

131. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 128 или п. 129, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 или SEQ ID NO 16.

132. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 131, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14.

133. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 131, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 15.

134. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 131, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 16.

135. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 128 или п. 129, где IFN $\gamma$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 19.

136. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 128 или п. 129, где IFN $\lambda$ 2 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 18.

137. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 128-136, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок дополнительно содержит тяжелую цепь анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента.

138. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 137, где тяжелая цепь агонистического анти-CD40 антитела содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 48 или SEQ ID NO 12.

139. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 1-138, где ассоциированный с интерфероном 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, SEQ ID NO 47, 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, SEQ ID NO 88 и SEQ ID NO 94.

140. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п.139, где ассоциированный с интерфероном 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. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 139 или п. 140, где ассоциированный с интерфероном

антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие одну из комбинации последовательностей приведенных в таблице 9, в частности в таблице 9А или таблице 9В, более конкретно в таблице 9А.

142. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 141, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO 38 и SEQ ID NO 3.

143. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 141, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO 39 и SEQ ID NO 3.

144. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 141, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO 40 и SEQ ID NO 3.

145. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 141, где ассоциированный с интерфероном антиген-связывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO 41 и SEQ ID NO 9.

146. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 141, где ассоциированный с интерфероном антиген-связывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO 42 и SEQ ID NO 9.

147. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 141, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое антигенсвязывающее анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO 43 и SEQ ID NO 9.

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

149. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для

применения по п. 148, где активность CD40 определяют с помощью анализа активации поверхностных молекул цельной крови или анализа репортерных клеток *in vitro*.

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

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

152. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 151, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок активирует путь CD40 с EC<sub>50</sub> в диапазоне от 10 до 200 нг/мл.

153. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 152, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок активирует путь CD40 с EC<sub>50</sub> в диапазоне от 10 до 50 нг/мл, предпочтительно от 10 до 30 нг/мл.

154. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 148-153, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок активирует путь IFN с EC<sub>50</sub> менее 100, 60, 50, 40, 30, 20, 10 или 1 нг/мл.

155. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 148-154, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок активирует путь IFN с EC<sub>50</sub> менее чем 11 нг/мл, предпочтительно менее чем 6 нг/мл.

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

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

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

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

161. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для

применения по любому из предшествующих пунктов, в частности пп. 148-160, где уровень экспрессии одного или более биомаркеров пути IFN повышается в инфицированной коронавирусом клетке при лечении ассоциированным с интерфероном 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 по сравнению с уровнем экспрессии указанных биомаркеров в указанной инфицированной коронавирусом клетке, которая не подвергалась лечению ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белком.

162. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 161, где биомаркером пути IFN является хемокин.

163. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 162, где биомаркером пути IFN является стимулируемый интерфероном ген ISG20.

164. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 162, где биомаркером пути IFN является хемокин C-X-C, выбранный из группы, состоящей из CXCL9, CXCL10 и CXCL11.

165. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 164, где биомаркером пути IFN является CXCL10.

166. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из предшествующих пунктов, в частности пп. 148-165, где уровень экспрессии одного или более из IL10, IL1 $\beta$  и IL2 существенно не увеличивается в инфицированной коронавирусом клетке по сравнению с уровнем экспрессии указанных интерлейкинов в указанной инфицированной коронавирусом клетке, которая не была обработана ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белком.

167. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из предшествующих пунктов, где системное воздействие ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка сильнее системного воздействия антитела CP870,893, предпочтительно, на по меньшей мере 10%, более предпочтительно на по меньшей мере 15%, наиболее предпочтительно на по меньшей мере 25%.

168. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из предшествующих пунктов, где системное воздействие ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка составляет по меньшей мере 1000 мкг\*ч/мл.

169. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 168, где системное воздействие ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка находится в диапазоне от 1033 мкг\*ч/мл до 1793 мкг\*ч/мл.

170. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из предшествующих пунктов, где период полувыведения ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка составляет по меньшей



мере 100 часов.

171. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п.170, где период полувыведения ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка составляет от 116 до 158 часов.

172. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из предшествующих пунктов, где скорость клиренса ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка составляет менее 0,5 мл/ч/кг.

173. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 172, где клиренс ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка находится в диапазоне от 0,28 до 0,49 мл/ч/кг.

174. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 1-173, где объем распределения  $V_{ss}$  ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка составляет менее 100 мл/кг.

175. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 174, где объем распределения  $V_{ss}$  ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка находится в диапазоне от 50 до 98 мл/кг.

176. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из предшествующих пунктов, где применение включает введение ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка нуждающемуся в этом субъекту посредством генетической доставки последовательностей РНК или ДНК, кодирующих ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, или вектора или векторной системы, кодирующих ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок.

177. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 1-176, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержится в фармацевтической композиции.

178. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 177, где фармацевтическая композиция подходит для перорального, парентерального или местного введения или для введения путем ингаляции.

179. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п.178, где фармацевтическая композиция пригодна для перорального введения.

180. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 178, где фармацевтическая композиция пригодна для местного применения.

181. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 178, где фармацевтическая композиция пригодна для введения путем ингаляции.

182. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для

применения по п. 178, где фармацевтическая композиция пригодна для парентерального введения.

183. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п.182, где фармацевтическая композиция пригодна для внутривенного, внутриартериального, внутривнутрибрюшинного, внутримышечного, подкожного, ректального или вагинального введения.

184. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 183, где фармацевтическая композиция пригодна для инъекции, предпочтительно внутривенной или внутриартериальной инъекции или капельного введения.

185. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 177-184, где фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один буферный агент.

186. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 185, где буферным агентом является ацетат, формиат или цитрат.

187. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 186, где буферным агентом является ацетат.

188. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 186, где буферным агентом является формиат.

189. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 186, где буферным агентом является цитрат.

190. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 177-189, где фармацевтическая композиция содержит поверхностно-активное вещество.

191. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 190, где поверхностно-активное вещество выбирают из списка, содержащего плуроники, ПЭГ, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, тритон, трометамин, лецитин, холестерин и тилоксапал.

192. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п.191, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат.

193. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п.192, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80 или полисорбат 100.

194. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 193, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20.

195. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 193, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

196. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 177-195, где фармацевтическая композиция содержит стабилизирующий агент, где необязательно стабилизирующий агент представляет собой альбумин.

197. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 1-196, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDR), CDRL1, CDRL2 и CDRL3, которые на по меньшей мере 90% идентичны соответствующим последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO 3; и три CDR тяжелой цепи, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, которые на по меньшей мере 90% идентичны соответствующим последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO 6.

198. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 1-197, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDR), CDRL1, CDRL2 и CDRL3, которые идентичны соответствующим последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO 3; и три CDR тяжелой цепи, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, которые идентичны соответствующим последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO 6.

199. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 197 или п. 198, где каждую CDR определяют в соответствии с определением по Кабат, определением по Чотиа, определением по AbM или определением CDR по методу Контакт; предпочтительно, где каждую CDR определяют в соответствии с определением CDR по Кабат или определением CDR по Чотиа.

200. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для его применения по любому из пп. 2-199, где в определяющих комплементарность областях переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента отсутствуют аминокислотные замены, вставки или делеции.

201. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для его применения по любому из пп. 2-199, где в каждой из определяющих комплементарность областей переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента независимо отсутствуют или присутствуют одна или две аминокислотные замены, вставки или делеции.

202. Полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующие ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, определенный в любом из предшествующих пунктов, для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции у нуждающегося в этом субъекта, где лечение включает экспрессию в организме указанного субъекта указанного ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка из

полинуклеотида или полинуклеотидов, введенных указанному субъекту.

203. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок или полинуклеотид, или полинуклеотиды для их применения по любому из предшествующих пунктов, где коронавирус выбирают из группы, состоящей из коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 1 (SARS-CoV-1), коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) и коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV).

204. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок или полинуклеотид, или полинуклеотиды для их применения по любому из предшествующих пунктов, где коронавирус представляет собой SARS-CoV-2 или его вариант.

205. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок или полинуклеотид, или полинуклеотиды для их применения по п. 204, где коронавирус представляет собой вариант SARS-CoV-2, как указано в отчетах о происхождении, доступных на <https://outbreak.info/situation-reports> или [https://cov-lineages.org/global\\_report.html](https://cov-lineages.org/global_report.html).

206. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок или полинуклеотид, или полинуклеотиды для их применения по п. 204 или п. 205, где вариант SARS-CoV-2 выбирают из группы, состоящей из A.23.1, B.1.1.7, B.1.351, B.1.427, B.1.429, B.1.525, B.1.526, B.1.526.1, B.1.526.2, B.1.617, B.1.617.1, B.1.617.2, B.1.617.3, P.1 или P.2.

### **Объекты**

[00374] Исходя из изложенного выше следует понимать, что настоящее изобретение также относится к следующим объектам изобретения:

1. Агонист суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF) или его функциональный фрагмент для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции, где агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент вводят в комбинации с интерфероном (IFN) или его функциональным фрагментом.

2. Интерферон (IFN) или его функциональный фрагмент для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции, где IFN или его функциональный фрагмент вводят в комбинации с агонистом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF) или его функциональным фрагментом.

3. Комбинация агониста суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF) или его функционального фрагмента с интерфероном (IFN) или его функциональным фрагментом для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции.

4. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 1-3, где агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент выбирают из группы, состоящей из агониста CD27, агониста CD30, агониста кластера фактора дифференцировки 40 (CD40), агониста HVEM, агониста OX40, агониста TNFRSF12A и агониста 4-1BB или их функциональных фрагментов.

5. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из предшествующих пунктов, где агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент представляет собой полипептид или его функциональный фрагмент или антитело или его функциональный фрагмент.

6. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 1-5, где агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент выбирают из CD70, CD30L (TNFSF8), CD40L, LIGHT, OX40L, TWEAK и 4-1BBL или их функциональных фрагментов; предпочтительно, где агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент выбирают из CD40L, LIGHT и TWEAK или их функциональных фрагментов.

7. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 1-5, где агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент представляет собой агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент.

8. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 7, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDR) CDRL1, CDRL2 и CDRL3, которые на по меньшей мере 90% идентичны соответствующим последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO 3; и три CDR тяжелой цепи, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, которые на по меньшей мере 90% идентичны соответствующим последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO 6;

где предпочтительно агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области (CDR) легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, которые на по меньшей мере 95% идентичны соответствующим последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO: 3; и три CDR тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, которые на по меньшей мере 95% идентичны соответствующим последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO 6;

где более предпочтительно агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области (CDR) легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, которые на по меньшей мере 98% идентичны соответствующим последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO 3; и три CDR тяжелой цепи, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, которые на по меньшей мере 98% идентичны соответствующим последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO 6;

или где еще более предпочтительно агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие

комплементарность области (CDR) легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, которые на по меньшей мере 99% идентичны соответствующим последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO 3; и три CDR тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, которые на по меньшей мере 99% идентичны соответствующим последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO 6.

9. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 8, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области (CDR) легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, которые идентичны соответствующим последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO 3; и три CDR тяжелой цепи, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, которые идентичны соответствующим последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO 6.

10. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 8 или п. 9, где каждый CDR определяют в соответствии с определением по Кабат, определением по Чотиа, определением по AbM или определением CDR по методу Контакт; предпочтительно, где каждый CDR определяют в соответствии с определением CDR по Кабат или определением CDR по Чотиа.

11. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 7, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит

(I)

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

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

предпочтительно (II)

(a) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO 56, CDRH2, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO 57, и CDRH3 которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO 58; и

(b) легкую цепь или ее фрагмент, содержащие CDRL1, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO 52, CDRL2, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO 53, и CDRL3, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO 54;

более предпочтительно (III)

(а) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, которая на по меньшей мере 98% идентична SEQ ID NO 56, CDRH2, которая на по меньшей мере 98% идентична SEQ ID NO 57, и CDRH3 которая на по меньшей мере 98% идентична SEQ ID NO 58; и

(б) легкую цепь или ее фрагмент, содержащие CDRL1, которая на по меньшей мере 98% идентична SEQ ID NO 52, CDRL2, которая на по меньшей мере 98% идентична SEQ ID NO 53, и CDRL3, которая на по меньшей мере 98% идентична SEQ ID NO 54; или еще более предпочтительно (IV)

(а) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, которая на по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 56, CDRH2, которая на по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 57, и CDRH3 которая на по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 58; и

(б) легкую цепь или ее фрагмент, содержащие CDRL1, которая на по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 52, CDRL2, которая на по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 53, и CDRL3, которая на по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO 54.

12. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 11, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит

а. тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, идентичную SEQ ID NO 56, CDRH2, идентичную SEQ ID NO 57, и CDRH3, идентичную SEQ ID NO 58; и

б. легкую цепь или ее фрагмент, содержащие CDRL1, идентичную SEQ ID NO 52, CDRL2, идентичную SEQ ID NO 53, и CDRL3, идентичную SEQ ID NO 54.

13. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 7-12, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO 51, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; и/или переменную область тяжелой цепи VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO 55, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

где предпочтительно агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи VL, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 51; и/или переменную область тяжелой цепи VH, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 55;

где более предпочтительно агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой

цепи VL, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 51; и/или переменную область тяжелой цепи VH, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 55;

где еще более предпочтительно агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи VL, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 51; и/или переменную область тяжелой цепи VH, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 55; или

где наиболее предпочтительно агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO 51, и переменную область тяжелой цепи VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO 55.

14. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 7-13, где тяжелая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит тяжелую цепь области Fab, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO 12, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

15. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 7-14, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 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 на по меньшей мере 90%.

где предпочтительно агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 3; и/или тяжелую цепь (HC), которая содержит последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, приведенной в группе последовательностей, состоящей из SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 49 и SEQ ID NO 48;

где более предпочтительно агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична



последовательности, представленной в SEQ ID NO 3; и/или тяжелую цепь (HC), которая содержит последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична последовательности, приведенной в группе последовательностей, состоящей из SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 49 и SEQ ID NO 48;

где еще более предпочтительно агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO 3; и/или тяжелую цепь (HC), которая содержит последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична последовательности, приведенной в группе последовательностей, состоящей из SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 49 и SEQ ID NO 48; или

где наиболее предпочтительно агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3; и 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.

16. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 15, где HC содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 6, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

17. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 15, где HC содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO 9, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

18. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 15, где HC содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO 49, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

19. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 15, где HC содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 48, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

20. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 13-19, где в определяющих комплементарность областях переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического

антигенсвязывающего фрагмента не присутствуют аминокислотные замены, вставки или делеции.

21. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 8-19, где в каждой из определяющих комплементарность областей переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента независимо отсутствуют или присутствуют одна или две аминокислотные замены, вставки или делеции.

22. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из предшествующих пунктов, где указанный IFN или его функциональный фрагмент представляет собой человеческий интерферон.

23. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из предшествующих пунктов, где IFN или его функциональный фрагмент выбирают из группы, состоящей из IFN типа I, IFN типа II и IFN типа III или их функциональных фрагментов.

24. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из предшествующих пунктов, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN типа I или его функциональный фрагмент.

25. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 24, где IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\omega$  или IFN $\epsilon$ , или их функциональные фрагменты.

26. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 24, где IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$  или IFN $\beta$ , или их функциональные фрагменты.

27. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 24, где IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\omega$  или его функциональный фрагмент.

28. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 24, где IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\epsilon$  или его функциональный фрагмент.

29. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 1-23, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IFN $\lambda$ ,

IFN $\omega$  или IFN $\epsilon$ , или их функциональные фрагменты.

30. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 29, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$  или IFN $\beta$  или их функциональные фрагменты.

31. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 30, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$  или его функциональный фрагмент.

32. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 31, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$ 2a или его функциональный фрагмент.

33. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 32, где IFN $\alpha$ 2a содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 17, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

34. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 30, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\beta$  или его функциональный фрагмент.

35. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 34, где IFN $\beta$  содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO 14, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

36. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 34, где IFN $\beta$  или его функциональный фрагмент содержит одну или две аминокислотные замены относительно SEQ ID NO 14, выбранные из C17S и N80Q.

37. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 36, где IFN $\beta$  или его функциональный фрагмент содержит аминокислотную замену C17S относительно SEQ ID NO 14.

38. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 37, где IFN $\beta$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO 15.

39. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 36, где IFN $\beta$  или его функциональный фрагмент содержит аминокислотные замены C17S и N80Q относительно SEQ ID NO 14.

40. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 39, где IFN $\beta$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO 16.

41. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 29, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\gamma$  или IFN $\lambda$ , или их функциональные фрагменты.

42. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 41, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\gamma$  или его функциональный фрагмент.

43. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 42, где IFN $\gamma$  содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO 19, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

44. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 41, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\lambda$  или его функциональный фрагмент.

45. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 44, где IFN $\lambda$  или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\lambda$ 2 или его функциональный фрагмент.

46. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 45, где IFN $\lambda$ 2 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 18, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% или еще более предпочтительно 99%.

47. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 1-46, где IFN или его функциональный фрагмент нековалентно связан с агонистом TNFRSF или его функциональным фрагментом.

48. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 47, где IFN или его функциональный фрагмент нековалентно связан с агонистом TNFRSF или его функциональным фрагментом посредством взаимодействий ионных, Ван-дер-Ваальсовых и/или водородных связей.

49. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 1-46, где IFN или его функциональный фрагмент ковалентно связан с агонистом TNFRSF или его функциональным фрагментом.

50. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его

функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 1-46 или п. 49, где IFN или его функциональный фрагмент слит с агонистом TNFRSF или его функциональным фрагментом, где предпочтительно IFN или его функциональный фрагмент и агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент слиты друг с другом посредством линкера.

51. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по пп. 50, где IFN или его функциональный фрагмент слит с агонистом TNFRSF или его функциональным фрагментом, выбранным из CD70, CD30L (TNFSF8), CD40L, LIGHT, OX40L, TWEAK и 4-1BBL или их функциональных фрагментов; где предпочтительно IFN или его функциональный фрагмент слит с агонистом TNFRSF или его функциональным фрагментом, выбранным из CD40L, LIGHT и TWEAK, или их функциональных фрагментов.

52. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 50, где агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент и IFN или его функциональный фрагмент представлены в виде ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка, где агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, более предпочтительно агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие

а. тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область (CDR) CDRH1, идентичную SEQ ID NO 56, CDRH2, идентичную SEQ ID NO 57, и CDRH3, идентичную SEQ ID NO 58; и

б. легкую цепь или ее фрагмент, содержащие CDRL1, идентичную SEQ ID NO 52, CDRL2, идентичную SEQ ID NO 53, и CDRL3, идентичную SEQ ID NO 54;

и где IFN или его функциональный фрагмент слит с указанным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

53. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 52, где IFN или его функциональный фрагмент слит с легкой цепью антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

54. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 53, где IFN или его функциональный фрагмент слит с N-концом легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

55. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 53, где IFN или его функциональный фрагмент слит с C-концом легкой цепи антитела или его

антигенсвязывающего фрагмента.

56. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или комбинация для их применения по п. 52, где IFN или его функциональный фрагмент слит с тяжелой цепью антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

57. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 56, где IFN или его функциональный фрагмент слит с N-концом тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

58. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 56, где IFN или его функциональный фрагмент слит с C-концом тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

59. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 50-58, где линкер представляет собой пептидный линкер.

60. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 59, где линкер содержит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21 или по меньшей мере 24 аминокислоты.

61. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 59, где линкер содержит до 4, до 10, до 11, до 12, до 13, до 15, до 20, до 21, до 24, до 30, до 40, до 50, до 60, до 70, до 80, до 90 или до 100 аминокислот.

62. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 59-61, где линкер выбирают из группы, содержащей кислотные, основные и нейтральные линкеры.

63. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 62, где линкер представляет собой кислотный линкер.

64. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 62 или п. 63, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 22 или SEQ ID NO 23.

65. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 62, где линкер представляет собой основной линкер.

66. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 62, где линкер представляет собой нейтральный линкер.

67. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 62 или п. 66, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25 или SEQ ID NO 26.

68. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 59-67, где линкер выбирают из группы, содержащей жесткие, гибкие и спиралеобразующие линкеры.

69. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 68, где линкер представляет собой жесткий линкер.

70. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 68 или п. 69, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 22 или SEQ ID NO 23.

71. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 68, где линкер представляет собой гибкий линкер.

72. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 68 или п. 71, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25 или SEQ ID NO 26.

73. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 68, где линкер представляет собой спиралеобразующий линкер.

74. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 68 или п. 73, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 22 или SEQ ID NO 23.

75. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 59-63, 65, 66, 68, 69, 71 или 73, где линкер содержит аминокислоты глицин и серин.

76. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 75, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25 или SEQ ID NO 26.

77. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его

функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 75, где линкер дополнительно содержит аминокислоту треонин.

78. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 77, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 21.

79. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 59, где линкер содержит последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO 20-26.

80. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 79, где линкер содержит последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25 или SEQ ID NO 26.

81. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 80, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 24.

82. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 80, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 25.

83. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 80, где линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 26.

84. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 59-83, где IFN или его функциональный фрагмент слит с С-концом тяжелой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер, приведенный в таблице 3, в частности таблице 3А или таблице 3В, более конкретно таблице 3А.

85. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 84, где тяжелая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 48 или SEQ ID NO 49.

86. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 84 или п. 85, где IFN $\alpha$ 2a содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 17.

87. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 84 или п. 85, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 или SEQ ID NO 16.



88. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 87, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14.

89. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 87, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 15.

90. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по пункту 87, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 16.

91. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 84 или п. 85, где IFN $\gamma$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 19.

92. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 84 или п. 85, где IFN $\lambda$ 2 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 18.

93. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 84-92, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, предпочтительно, где легкая цепь содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3.

94. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 59-83, где IFN или его функциональный фрагмент слит с N-концом тяжелой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер, приведенный в таблице 4, в частности в таблице 4A или таблице 4B, более конкретно таблице 4A.

95. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 94, где тяжелая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 48 или SEQ ID NO 12.

96. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 94 или п. 95, где IFN $\alpha$ 2a содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 17.

97. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 94 или п. 95, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 или SEQ ID NO 16.

98. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 97, где IFN $\beta$

содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14.

99. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 97, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 15.

100. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 97, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 16.

101. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 94 или п. 95, где IFN $\gamma$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 19.

102. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 94 или п. 95, где IFN $\lambda$ 2 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 18.

103. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 94-102, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, где предпочтительно легкая цепь содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3.

104. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 59-83, где IFN или его функциональный фрагмент слит с C-концом легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер, приведенный в таблице 5, в частности таблице 5A или таблице 5B, более конкретно таблице 5A.

105. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 104, где легкая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3.

106. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 104 или п. 105, где IFN $\alpha$ 2a содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 17.

107. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 104 или п. 105, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 или SEQ ID NO 15 или SEQ ID NO 16.

108. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 107, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14.

109. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, или комбинация для их применения по п. 107, где IFN $\beta$

содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 15.

110. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 107, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 16.

111. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 104 или п. 105, где IFN $\gamma$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 19.

112. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 104 или п. 105, где IFN $\lambda$ 2 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 18.

113. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 104-112, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, где, предпочтительно, тяжелая цепь содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 48 или SEQ ID NO 12.

114. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 59-83, где IFN или его функциональный фрагмент слит с N-концом легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента через линкер, приведенный в таблице 6, в частности в таблице 6A или таблице 6B, более конкретно в таблице 6A.

115. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 114, где легкая цепь агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3.

116. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 114 или п. 115, где IFN $\alpha$ 2a содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 17.

117. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 114 или п. 115, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 или SEQ ID NO 16.

118. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 117, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14.

119. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 117, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 15.

120. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его

функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 117, где IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 16.

121. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 114 или п. 115, где IFN $\gamma$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 19.

122. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 114 или п. 115, где IFN $\lambda$ 2 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 18.

123. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 114-122, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, где предпочтительно тяжелая цепь содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 48 или SEQ ID NO 12.

124. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по любому из пп. 52-123, где ассоциированный с интерфероном 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, SEQ ID NO 47, 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, SEQ ID NO 88 и SEQ ID NO 94.

125. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент или IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 124, где ассоциированный с интерфероном 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.

126. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент или IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 124 или п. 125, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном анти-CD40 агонистическое антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие одну из комбинаций последовательностей, приведенных в таблице 9, в частности в таблице 9A или таблице 9B, более конкретно таблице 9A.

127. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент или IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 126, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности,

представленные в SEQ ID NO 38 и SEQ ID NO 3.

128. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент или IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 126, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO 39 и SEQ ID NO 3.

129. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент или IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 126, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO 40 и SEQ ID NO 3.

130. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент или IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 126, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO 41 и SEQ ID NO 9.

131. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент или IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 126, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO 42 и SEQ ID NO 9.

132. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент или IFN или его функциональный фрагмент или их комбинация для применения по п. 126, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO 43 и SEQ ID NO 9.

133. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, содержащий  
(I) агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, и

(II) интерферон (IFN) или его функциональный фрагмент

для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции.

134. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 133, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит

(а) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащие определяющую

комплементарность область (CDR) CDRH1, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO 56, CDRH2, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO 57, и CDRH3 которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO 58; и

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

135. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 133, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит

(a) тяжелую цепь или ее фрагмент, содержащие 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, содержащие CDRL1, идентичную SEQ ID NO 52, CDRL2, идентичную SEQ ID NO 53, и CDRL3, идентичную SEQ ID NO 54.

136. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 133-135, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO 51, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; и/или переменную область тяжелой цепи VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO 55, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

137. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 133-136, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3 или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 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 12, SEQ ID NO 49 и SEQ ID NO 48 или последовательность, идентичную им на по меньшей мере 90%.

138. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 133-137, где IFN или его функциональный фрагмент выбирают из группы, состоящей из IFN типа I, IFN типа II и IFN типа III или их функциональных фрагментов.

139. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 138, где IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$  или IFN $\beta$ , или их функциональный фрагмент.

140. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 133-139, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$ 2a или его функциональный фрагмент, и где IFN $\alpha$ 2a предпочтительно содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 17, или

последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

141. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 133-139, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\beta$  или его функциональный фрагмент, и где предпочтительно IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

142. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 133-141, где IFN или его функциональный фрагмент слит с легкой цепью агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, предпочтительно с С-концом.

143. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 133-141, где IFN или его функциональный фрагмент слит с тяжелой цепью агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, предпочтительно с С-концом.

144. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 133-143, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и IFN или его функциональный фрагмент слиты друг с другом через линкер, и где предпочтительно линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25 или SEQ ID NO 26.

145. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 133-144, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие одну из комбинаций последовательностей, приведенных в таблице 9, в частности в таблице 9А или таблице 9В, более конкретно таблице 9А.

146. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 133-145, где применение включает введение ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка нуждающемуся в этом субъекту путем генетической доставки последовательностей РНК или ДНК, кодирующих ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, или вектора или векторной системы, кодирующих ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок.

147. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения

(а) по любому из пп. 133-145, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержится в фармацевтической композиции; или

(б) по п. 146, где последовательности РНК или ДНК, кодирующие указанный ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, или вектор или векторная

система, кодирующие указанный ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, содержатся в фармацевтической композиции.

148. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, содержащий слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO 38 и SEQ ID NO 3, для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции.

149. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, содержащий слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO 39 и SEQ ID NO 3, для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции.

150. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, содержащий слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO 40 и SEQ ID NO 3, для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции.

151. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, содержащий слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO 41 и SEQ ID NO 9, для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции.

152. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, содержащий слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO 42 и SEQ ID NO 9, для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции.

153. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, содержащий слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO 43 и SEQ ID NO 9, для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции.

154. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, их комбинация для применения по любому из пп. 1-132 или ассоциированные с интерфероном антигенсвязывающие белки для их применения по любому из пп. 133-153, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок активирует как путь CD40, так и путь IFN.

155. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 154, где активность CD40



определяют с помощью анализа активации поверхностных молекул цельной крови или анализа репортерных клеток *in vitro*.

156. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 155, где активность CD40 определяют с помощью анализа репортерных клеток *in vitro*, необязательно с использованием клеток HEK-Blue<sup>TM</sup> CD40L.

157. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по любому из пп. 154-156, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок активирует путь CD40 с EC<sub>50</sub> менее 400, 300, 200, 150, 100, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 или 15 нг/мл.

158. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 157, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок активирует путь CD40 с EC<sub>50</sub> в диапазоне от 10 до 200 нг/мл.

159. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 158, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок активирует путь CD40 с EC<sub>50</sub> в диапазоне от 10 до 50 нг/мл, предпочтительно от 10 до 30 нг/мл.

160. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по любому из пп. 154-159, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок активирует путь IFN с EC<sub>50</sub> менее 100, 60, 50, 40, 30, 20, 10 или 1 нг/мл.

161. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по любому из пп. 154-160, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок активирует путь IFN с EC<sub>50</sub> менее 11 нг/мл, предпочтительно менее 6 нг/мл.

162. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по любому из пп. 154-161, где путь IFN представляет собой путь IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\gamma$ , IFN $\omega$  или IFN $\lambda$ .

163. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 162, где активность IFN $\beta$  определяют с помощью анализа репортерных клеток *in vitro*, необязательно с

использованием клеток HEK-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$ .

164. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 162, где активность IFN $\alpha$  определяют с помощью анализа репортерных клеток *in vitro*, необязательно с использованием клеток HEK-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$ .

165. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 162, где активность IFN $\gamma$  определяют с помощью анализа репортерных клеток *in vitro*, необязательно с использованием клеток HEK-Blue™ Dual IFN- $\gamma$ .

166. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 162, где активность IFN $\lambda$  определяют с помощью анализа репортерных клеток *in vitro*, необязательно с использованием клеток HEK-Blue™ IFN $\lambda$ .

167. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по любому из пп. 1-166, где в инфицированной коронавирусом клетке уровень экспрессии одного или более биомаркеров пути IFN увеличивается при обработке ассоциированным с интерфероном 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 по сравнению с уровнем экспрессии указанных биомаркеров в указанной клетке, инфицированной коронавирусом, которая не была обработана ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белком.

168. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 167, где биомаркером пути IFN является хемокин.

169. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 168, где биомаркером пути IFN является стимулируемым интерфероном ген ISG20.

170. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 168, где биомаркер пути IFN представляет собой хемокин C-X-C, выбранный из группы состоящий из CXCL9, CXCL10 и CXCL11.

171. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его

функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 170, где биомаркером пути IFN является CXCL10.

172. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по любому из пп. 1-171, где в клетках, инфицированных коронавирусом, уровень экспрессии одного или более из IL10, IL1 $\beta$  и IL2 существенно не увеличивается при обработке ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белком по сравнению с уровнем экспрессии указанных интерлейкинов в указанной инфицированной коронавирусом клетке, которая не была обработана ассоциированным с интерфероном антигенсвязывающим белком.

173. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по любому из пп. 1-172, где системное воздействие ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка увеличивается по сравнению с системным воздействием антитела CP870,893, предпочтительно на по меньшей мере 10%, более предпочтительно по меньшей мере 15%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 25%.

174. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по любому из пп. 52-173, где системное воздействие ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка составляет по меньшей мере 1000 мкг\*ч/мл.

175. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 174, где системное воздействие ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка находится в диапазоне от 1033 мкг\*ч/мл до 1793 мкг\*ч/мл.

176. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по любому из пп. 52-175, где период полувыведения ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка составляет не менее 100 ч.

177. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 176, где период полувыведения ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка находится в диапазоне от 116 до 158 ч.

178. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном

антигенсвязывающий белок для их применения по любому из пп. 52-177, где скорость клиренса ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка ниже 0,5 мл/ч/кг.

179. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 178, где клиренс ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка находится в диапазоне от 0,28 до 0,49 мл/ч/кг.

180. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по любому из пп. 1-179, где объем распределения  $V_{ss}$  ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка ниже 100 мл/кг.

181. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 180, где объем распределения  $V_{ss}$  ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка находится в диапазоне от 50 до 98 мл/кг.

182. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по любому из предшествующих пунктов, где применение включает введение указанного агониста TNFRSF или его функционального фрагмента, указанного IFN или его функционального фрагмента, указанной комбинации или указанного ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка нуждающемуся в этом субъекту посредством

а. генетической доставки последовательностей РНК или ДНК, кодирующих указанный агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, указанный IFN или его функциональный фрагмент, указанную комбинацию или указанный ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок; или

б. вектора или векторной системы, кодирующей указанный агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, указанный IFN или его функциональный фрагмент, указанную комбинацию или указанный ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок.

183. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 182, где указанный ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок экспрессируется в организме указанного субъекта из полинуклеотида или полинуклеотидов, введенных указанному субъекту.

184. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном

антигенсвязывающий белок для их применения по любому из пп. 1-183, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержится в фармацевтической композиции.

185. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или комбинация для их применения по любому из пп. 1-184, где агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент и IFN или его функциональный фрагмент содержатся в одной фармацевтической композиции или в разных фармацевтических композициях.

186. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 184 или п. 185, где фармацевтическая композиция пригодна для перорального, парентерального, или местного применения, или введение путем ингаляции.

187. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 186, где фармацевтическая композиция пригодна для перорального введения.

188. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 186, где фармацевтическая композиция пригодна для местного применения.

189. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 186, где фармацевтическая композиция пригодна для введения путем ингаляции.

190. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 186, где фармацевтическая композиция пригодна для парентерального введения.

191. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 184 или п. 185, где фармацевтическая композиция пригодна для внутривенного, внутриартериального, внутрибрюшинного, внутримышечного, подкожного, ректального или вагинального введения.

192. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 184 или п. 185, где фармацевтическая композиция пригодна для инъекции, предпочтительно для внутривенной или внутриартериальной инъекции или путем капельного введения.

193. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по любому из пп. 184-192, где фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один буферный агент.

194. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 193, где буферным агентом является ацетат, формиат или цитрат.

195. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 194, где буферным агентом является ацетат.

196. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 194, где буферным агентом является формиат.

197. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 194, где буферным агентом является цитрат.

198. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по любому из пп. 184-197, где фармацевтическая композиция содержит поверхностно-активное вещество.

199. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 198, где поверхностно-активное вещество выбирают из списка, содержащего плюроники, ПЭГ, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, тритон, трометамин, лецитин, холестерин и тилоксапал.

200. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 199, где поверхностно-активным веществом является полисорбат.

201. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 200, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80 или полисорбат 100.

202. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном

антигенсвязывающий белок для их применения по п. 201, где поверхностно-активным веществом является полисорбат 20.

203. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по п. 201, где поверхностно-активным веществом является полисорбат 80.

204. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для их применения по любому из пп. 184-203, где фармацевтическая композиция содержит стабилизирующий агент, где необязательно стабилизирующим агентом является альбумин.

205. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для его применения по любому из пп. 133-204, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDR), CDRL1, CDRL2 и CDRL3, которые на по меньшей мере 90% идентичны соответствующим последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO 3; и три CDR тяжелой цепи, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, которые на по меньшей мере 90% идентичны соответствующим последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO 6.

206. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для его применения по любому из пп. 133-205, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области легкой цепи (CDR), CDRL1, CDRL2 и CDRL3, которые идентичны соответствующим последовательностям CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в SEQ ID NO 3; и три CDR тяжелой цепи, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, которые идентичны соответствующим последовательностям CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в SEQ ID NO 6.

207. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для его применения по п. 205 или п. 206, где каждый CDR определяют в соответствии с определением по Кабат, определением по Чотиа, определением по AbM или определением CDR по методу Контакт; где предпочтительно каждый CDR определяют в соответствии с определением CDR по Кабат или определением CDR по Чотиа.

208. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для его применения по любому из пп. 133-207, где в определяющих комплементарность областях переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента отсутствуют аминокислотные замены, вставки или делеции.

209. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для его применения по любому из пп. 133-207, где в каждой из определяющих комплементарность областей переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего

фрагмента независимо отсутствует или присутствует одна или две аминокислотные замены, вставки или делеции.

210. Полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующие агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент или ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, определенные по любому из предшествующих пунктов, для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции у нуждающегося в этом субъекта, где лечение включает экспрессию в организме указанного субъекта указанного агониста TNFRSF или его функционального фрагмента и указанного IFN или его функционального фрагмента, или экспрессию у указанного субъекта указанного ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка из введенного указанному субъекту полинуклеотида или полинуклеотидов.

211. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация, ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок или полинуклеотид или полинуклеотиды для их применения по любому из предшествующих пунктов, где коронавирус выбирают из группы, состоящей из коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 1 (SARS-CoV-1), коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) и коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV).

212. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация, ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок или полинуклеотид или полинуклеотиды для их применения по любому из предшествующих пунктов, где коронавирус представляет собой SARS-CoV-2 или его вариант.

213. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация, ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок или полинуклеотид или полинуклеотиды для их применения по п. 212, где коронавирус представляет собой вариант SARS-CoV-2, как указано в отчетах о происхождении, доступных на <https://outbreak.info/situation-reports> или [https://cov-lineages.org/global\\_report.html](https://cov-lineages.org/global_report.html).

214. Агонист TNFRSF или его функциональный фрагмент, IFN или его функциональный фрагмент, комбинация, ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок или полинуклеотид или полинуклеотиды для их применения по п. 212 или п. 213, где вариант SARS-CoV-2 выбирают из группы, состоящей из A.23.1, B.1.1.7, B.1.351, B.1.427, B.1.429, B.1.525, B.1.526, B.1.526.1, B.1.526.2, B.1.617, B.1.617.1, B.1.617.2, B.1.617.3, P.1 и P.2.

[00375] Специалисту в данной области техники будет понятно, что настоящее изобретение также относится к агонисту TNFRSF или его функциональному фрагменту, IFN или его функциональному фрагменту, их комбинации, ассоциированному с интерфероном антигенсвязывающему белку или полинуклеотиду или полинуклеотидам



для их применения согласно любому из признаков или объектов, идентифицированных в настоящем описании, где агонист TNFRSF содержит SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 61 или SEQ ID NO 63, приведенных в таблице 8, и/или где ассоциированный с интерфероном связывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело, содержащее одну из комбинаций последовательностей, приведенных в таблице 10, или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент.

[00376] Кроме того, специалисту в данной области техники будет понятно, что настоящее изобретение также относится к способу лечения или профилактики коронавирусной инфекции у субъекта, в частности коронавирусной инфекции, определенной в пп. 211-214, где указанному субъекту вводят терапевтически эффективное количество агониста TNFRSF или его функционального фрагмента, IFN или его функционального фрагмента, их комбинации, ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка или полинуклеотида или полинуклеотидов, согласно любому из аспектов, вариантов осуществления, признаков или объектов, указанных в настоящем описании или в предыдущем абзаце.

[00377] Следует понимать, что в соответствии со всеми аспектами, вариантами осуществления, признаками и объектами, описанными и заявленными в настоящем описании, субъектом, подлежащим лечению, предпочтительно является млекопитающее, и наиболее предпочтительно человек.

[00378] Наконец, следует понимать, что все аспекты, варианты осуществления, признаки и объекты, представленные в настоящем описании, могут стать объектом изобретения дополнительных пунктов формулы изобретения (в дополнение к представленной ниже формуле изобретения).

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Комбинация агониста суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF) или его функционального фрагмента и интерферона (IFN) или его функционального фрагмента для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции.

2. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, содержащий

(I) агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент, и

(II) интерферон (IFN) или его функциональный фрагмент

для применения при лечении или профилактике коронавирусной инфекции.

3. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п.2, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит

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

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

4. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п. 2 или п. 3, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит

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

(b) легкая цепь или ее фрагмент, содержащие CDRL1, идентичную SEQ ID NO 52, CDRL2, идентичную SEQ ID NO 53, и CDRL3, идентичную SEQ ID NO 54.

5. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.2-4, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO 51, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%; и/или переменную область тяжелой цепи VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO 55, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

6. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.2-5, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь (LC), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 3, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 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 на по меньшей мере 90%.

7. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.2-6, где IFN или его функциональный фрагмент выбирают из группы, состоящей из IFN типа I, IFN типа II и IFN типа III или их функциональных фрагментов.

8. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по п.7, где IFN типа I или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$  или IFN $\beta$ , или их функциональные фрагменты.

9. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.2-8, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\alpha$ 2a или его функциональный фрагмент, и где предпочтительно IFN $\alpha$ 2a содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 17, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

10. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.2-8, где IFN или его функциональный фрагмент представляет собой IFN $\beta$  или его функциональный фрагмент, и где предпочтительно IFN $\beta$  содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 14, или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%.

11. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 2-10, где IFN или его функциональный фрагмент слит с легкой цепью агонистического анти-CD40 антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, предпочтительно с С-концом.

12. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 2-10, где IFN или его функциональный фрагмент слит с тяжелой цепью агонистического антигенсвязывающего антитела или его агонистического антигенсвязывающего фрагмента, предпочтительно с С-концом.

13. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 2-12, где агонистическое анти-CD40 антитело или его агонистический антигенсвязывающий фрагмент и IFN или его функциональный фрагмент слиты друг с другом через линкер, и где предпочтительно линкер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25 или SEQ ID NO 26.

14. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп.2-13, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок представляет собой слитое с интерфероном агонистическое анти-CD40 антитело или его слитый с интерфероном агонистический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие одну из комбинаций последовательностей, раскрытых в таблице 9, в частности в таблице 9А или таблице 9В, более конкретно таблице 9А.

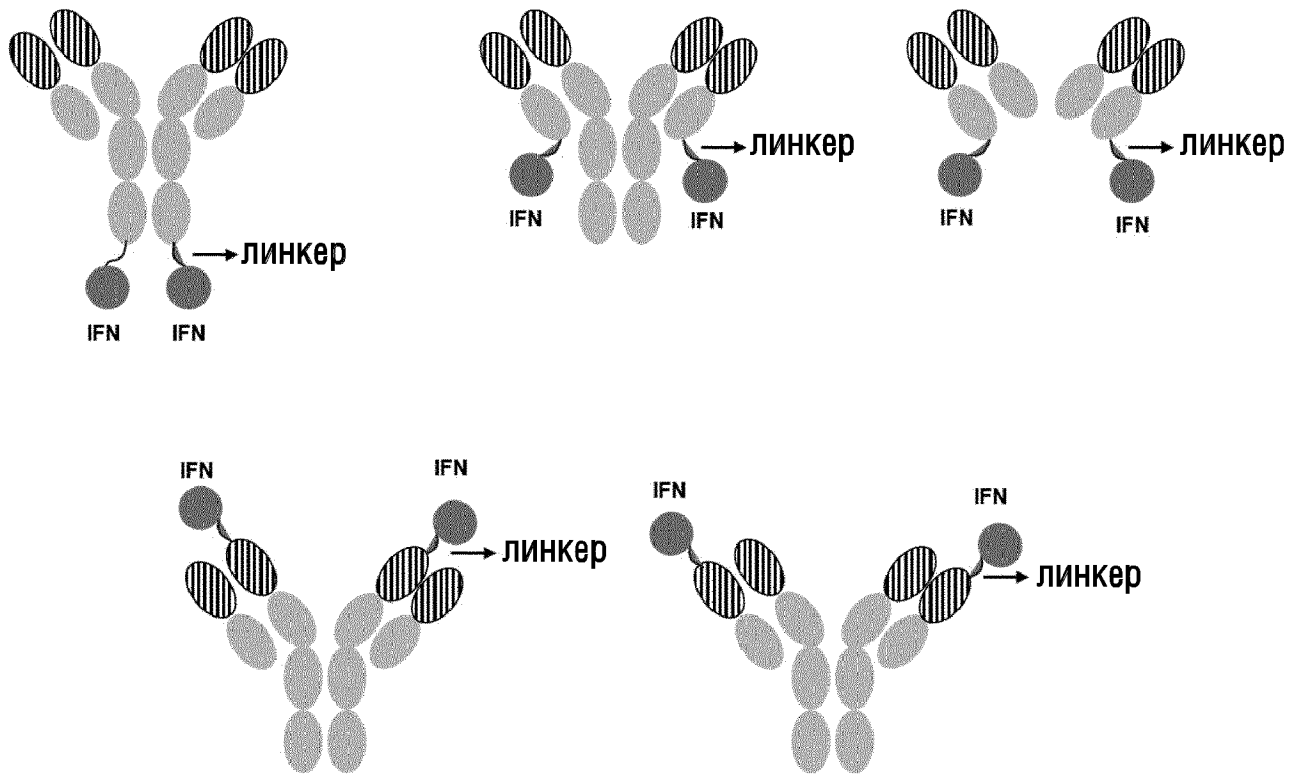
15. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения

по любому из пп.2-14, где применение включает введение ассоциированного с интерфероном антигенсвязывающего белка нуждающемуся в этом субъекту посредством генетической доставки последовательностей РНК или ДНК, кодирующих ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок, или вектора или векторной системы, кодирующих ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок.

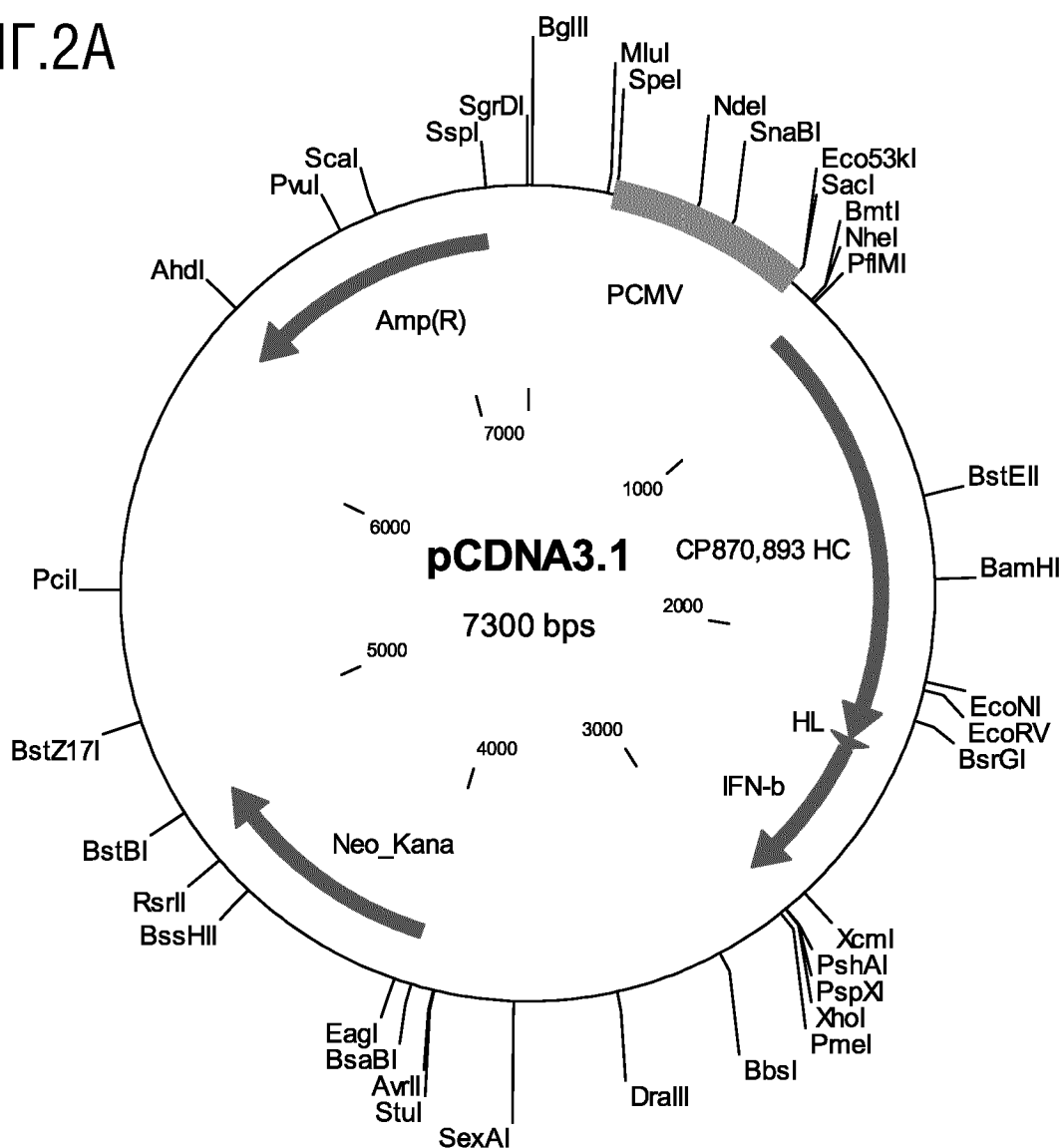
16. Ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок для применения по любому из пп. 2-15, где ассоциированный с интерфероном антигенсвязывающий белок содержится в фармацевтической композиции.

По доверенности

ФИГ.1



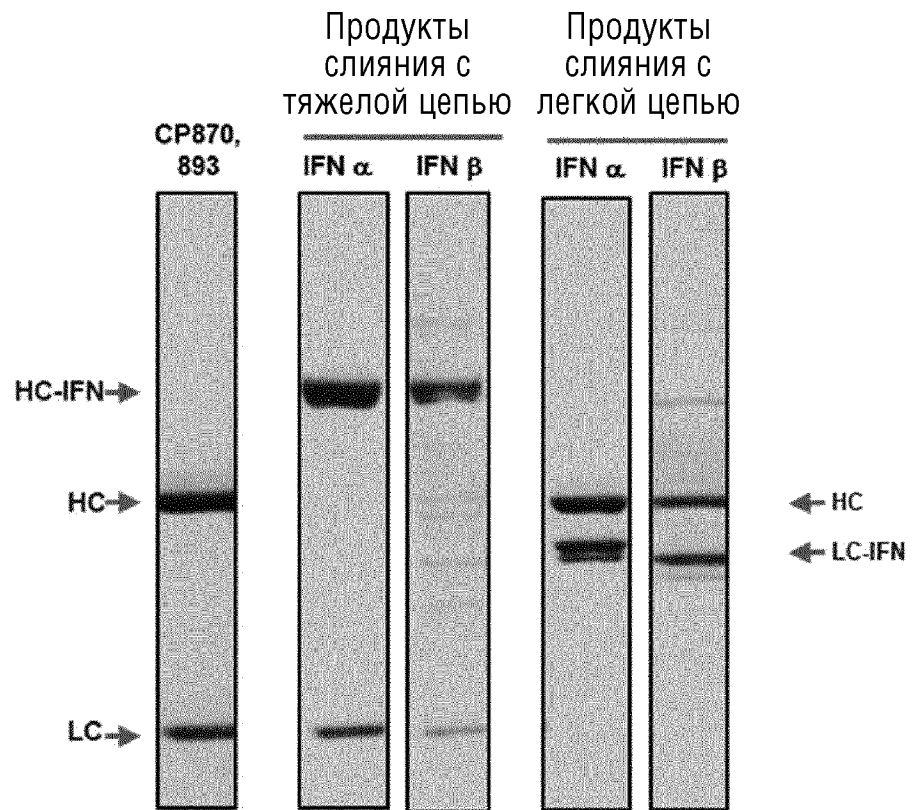
ФИГ.2А



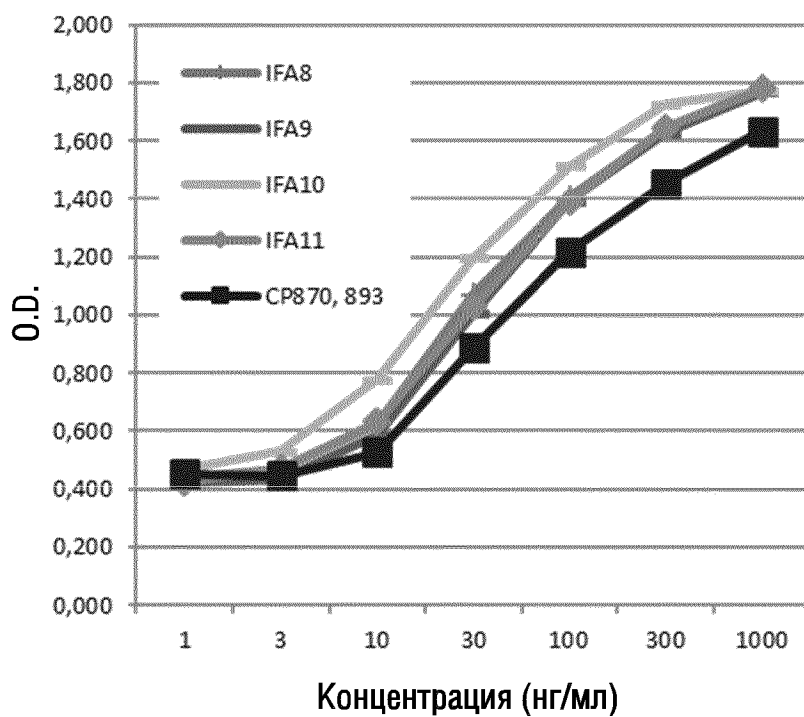
### Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO 32

ATGGGCTGGTCTGCATCATTCTGTTTCTGGTGGCCACAGCCACAGGGCTGCACTCTCAGGTTCAACTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAG  
 TGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGTAAAGCCAGCGGCTACACCTTTACCGGCTACTACATGCACTGGGTCCGACAGG  
 CTCCAGGACAGGGACTTGAGTGGATGGGCTGGATCAATCCTGACAGCGGGCCACCAACTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTG  
 ACCATGACCAGAGACACCAGCATCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAACCGGCTGAGATCCGACGACACCCGCGTACTATTGCGCC  
 AGAGATCAGCCTCTGGGCTACTGCACAAATGGCGTGTGCAGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCAGACTGGTTACAGTGTCTAGC  
 GCCTTACAAAGGGCCCTCCGTTTTCTCTGGCTCCTGTGTCTAGAAGCACCAGCGAGTCTACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAA  
 GGACTACTTCTGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCCGGCGTGCACACATTTCCAGCTGTGCTGCAGAGC  
 AGCGGCCTGACTCTGTCTAGCGTGGTACCCTGACCTAGCAGCAATTCGGCACCCAGACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGC  
 CTAGCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAAACGGAAGTGTGCGTGGAAATGCCCTCCTGTCTGCTCCTCCAGTGGCCGACCTT  
 CCGTGTCTGTTCCCTCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCA  
 CGAGGATCCCGAGGTGCAGTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCA  
 ACAGCACCTTCAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC  
 AAGGGCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGACCAAAGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTTTACACACTGCCTCCAAGC  
 CGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGC  
 AATGGCCAGCTGAGAACAATAAGACCAACCTCCTATGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTCTGTACAGCAAGCTGACAGTG  
 GACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGTTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTG  
 TCTCTGAGCCCTGGCGCTGAAGCCGCTGCTAAAGAAGTGCAGCCAAAGGCCATGAGCTACAACCTGCTGGGCTTTCTGCAGCGGAG  
 CAGCAACTTCCAGTGCCAGAAAAGTGTGTGGCAGCTGAATGGCCGGCTGGAATACTGCTGAAAGGACCGGATGAACTTCGACATC  
 CCCGAGGAAATCAAGCAGCTGCAGCAGTTCAGAAAAGAGGACGCGCTGACCATCTACGAGATGCTGCAGAACATCTTCGCCAT  
 CTCCGGCAGGATAGCAGCAGCACCGGATGGAACGAGACAATCGTGGAAAATCTGCTGGCCAAAGTGTACCACCAGATCAACCAC  
 CTGAAAACCGTGTGGAAGAGAAGCTGGAAAAAGAGGACTTCAACCGGGGCAAGCTGATGAGCAGCCTGCACCTGAAGCGGTAC  
 TACGGCAGAATCCTGCACTACCTCAAGGCCAAAGAGTATAGCCACTGCGCCTGGACCATCGTGCAGCTGGAATCCTGCGGAATT  
 CTACTTCATCAACAGACTGACCGGCTACCTGCGCAACTGA

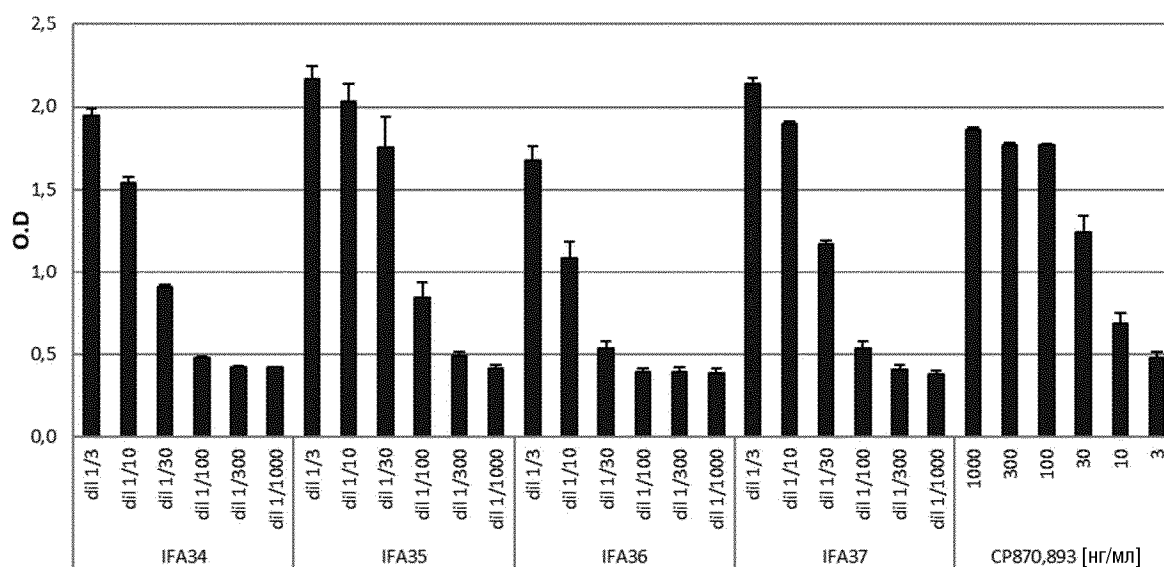
ФИГ.2В



ФИГ.3А

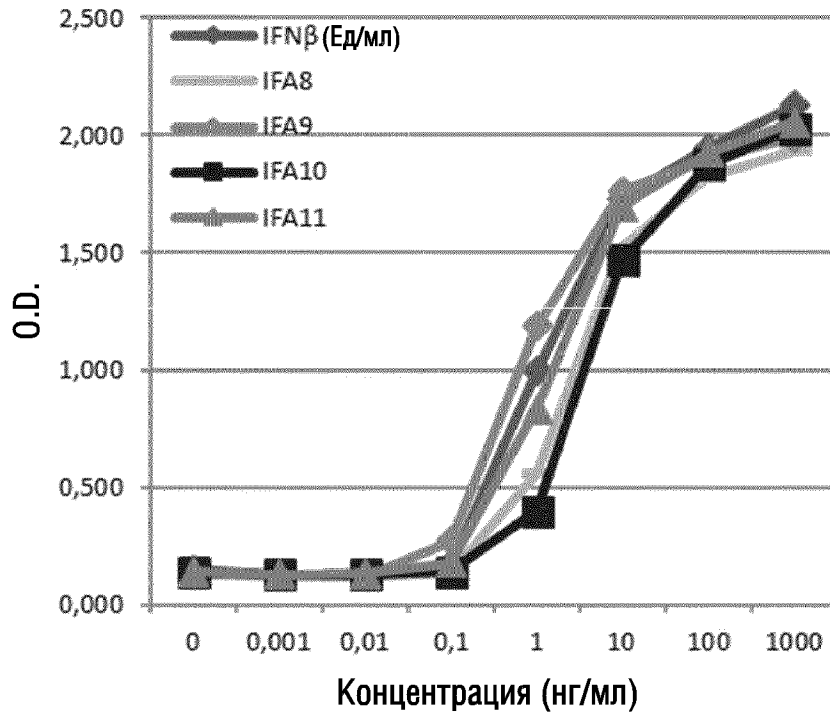


ФИГ.3В

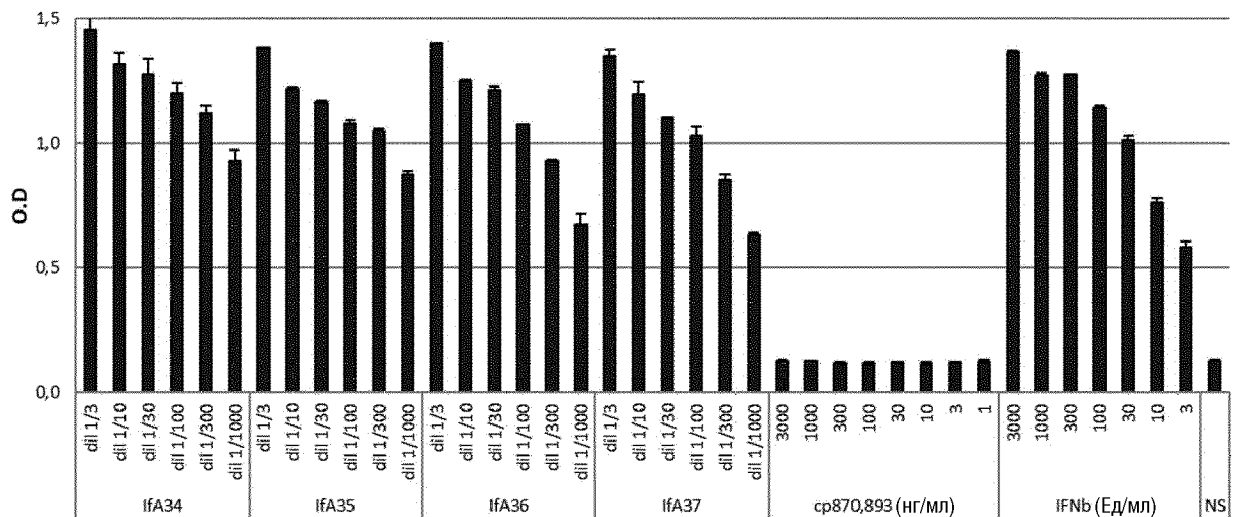




ФИГ.3С

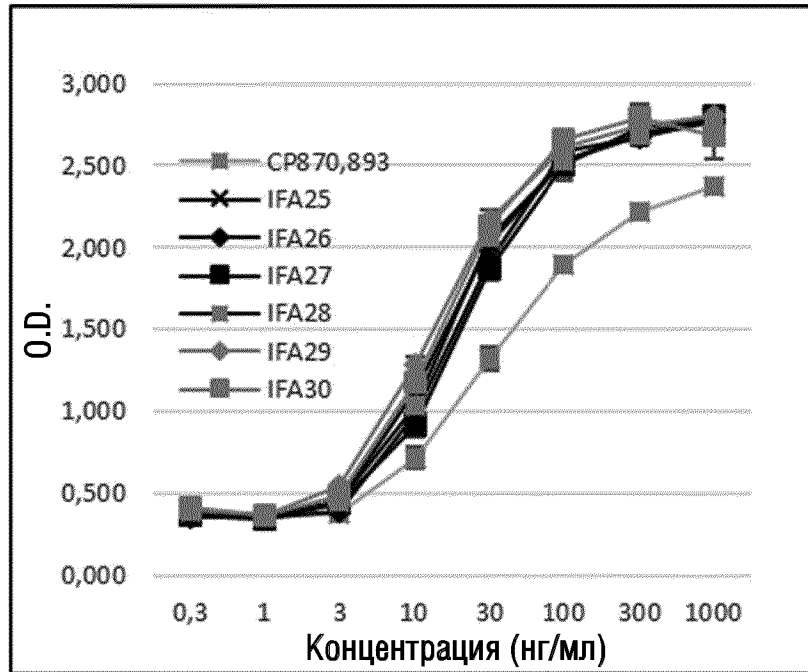


ФИГ.3D

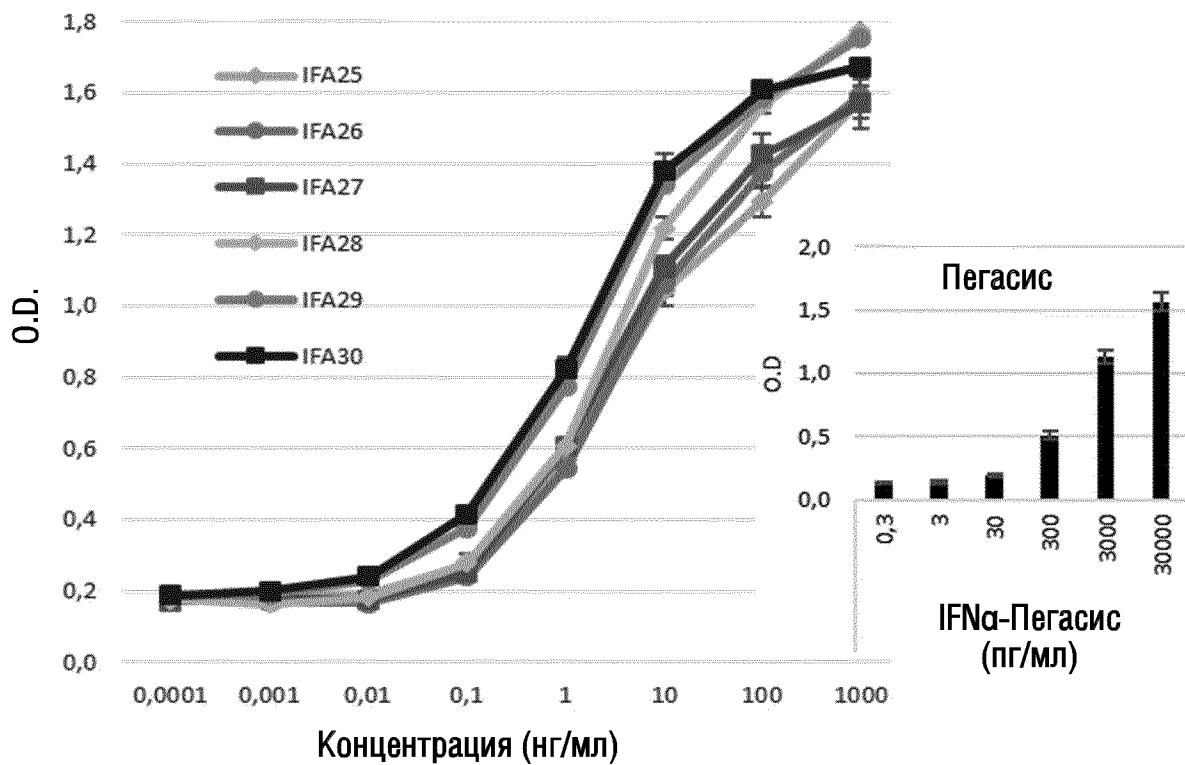


Супернатанты, полученные от трансфицированных клеток НЕК

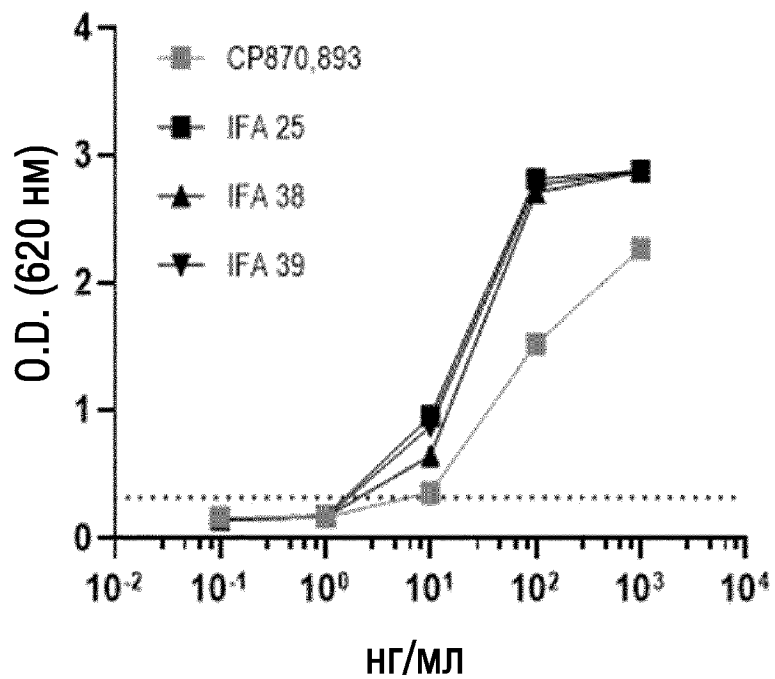
ФИГ.4А



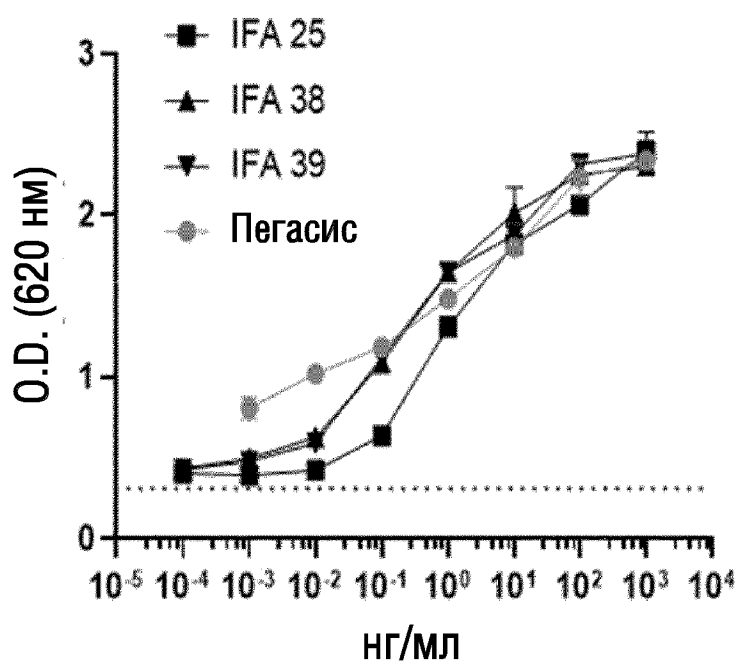
ФИГ.4В



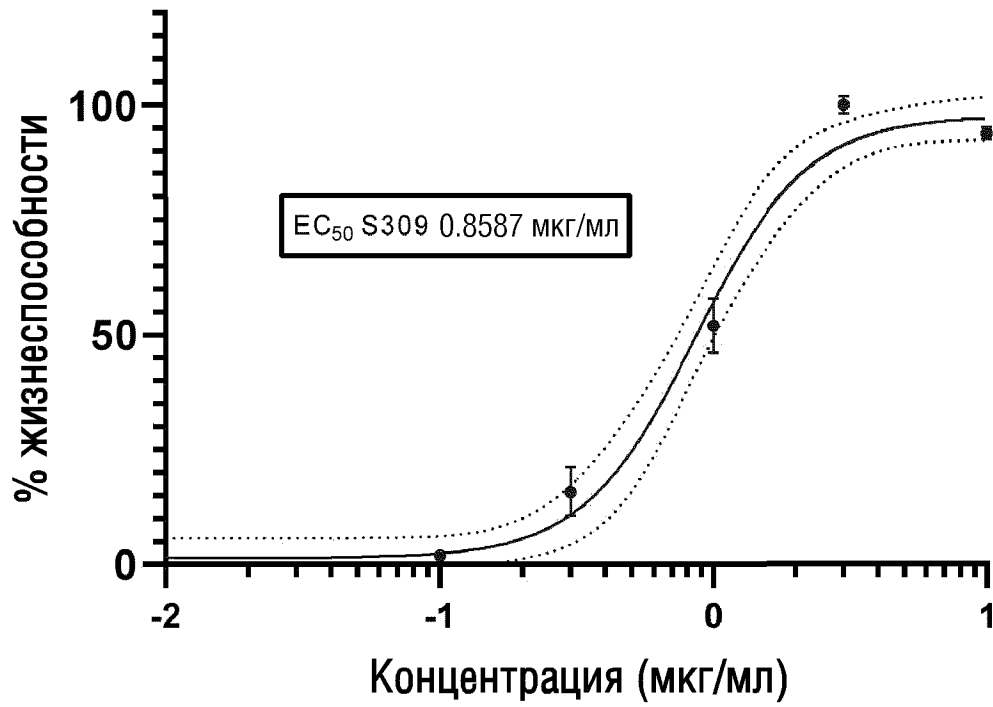
ФИГ.4С



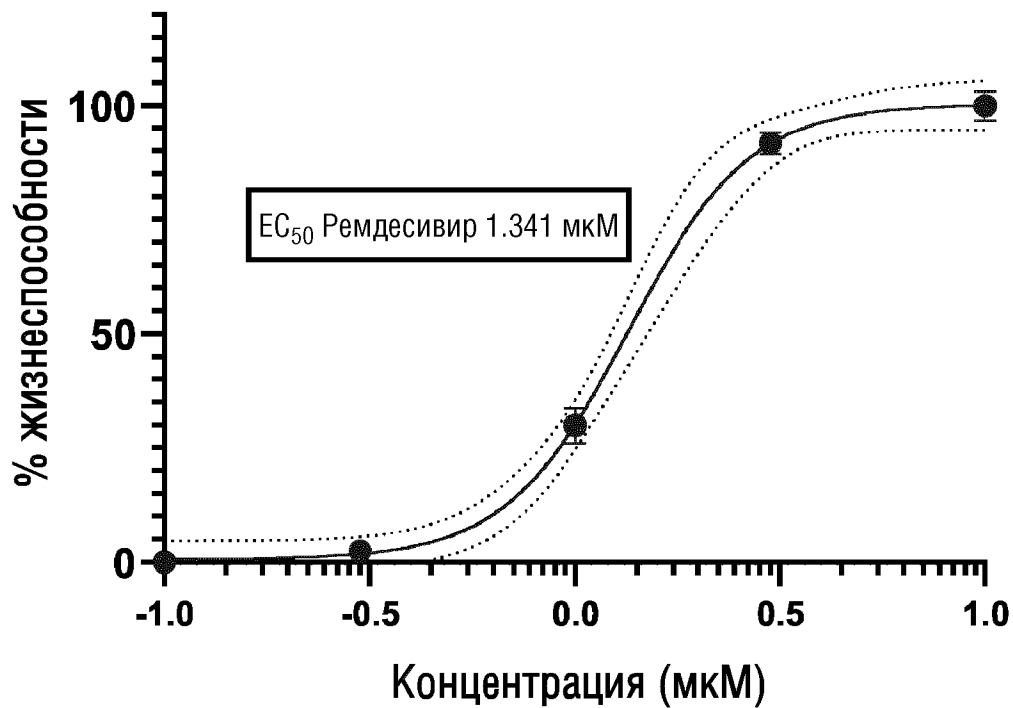
ФИГ.4D



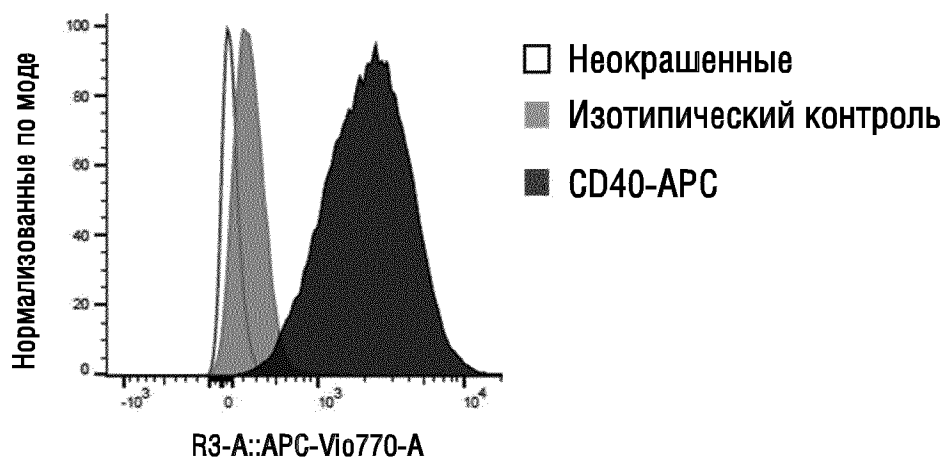
ФИГ.5А



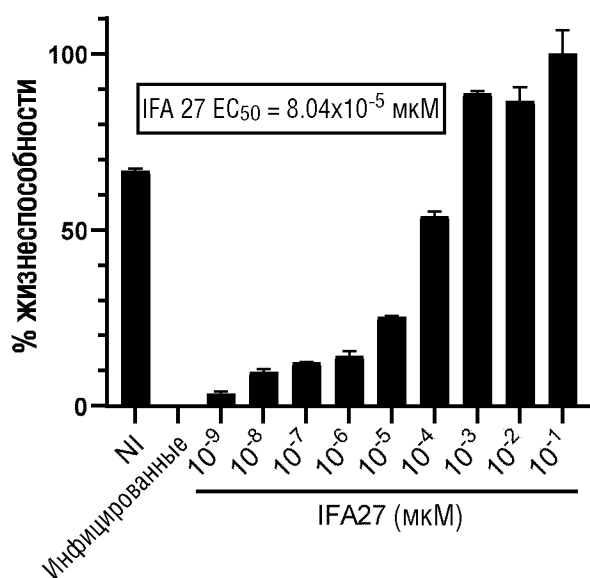
ФИГ.5В



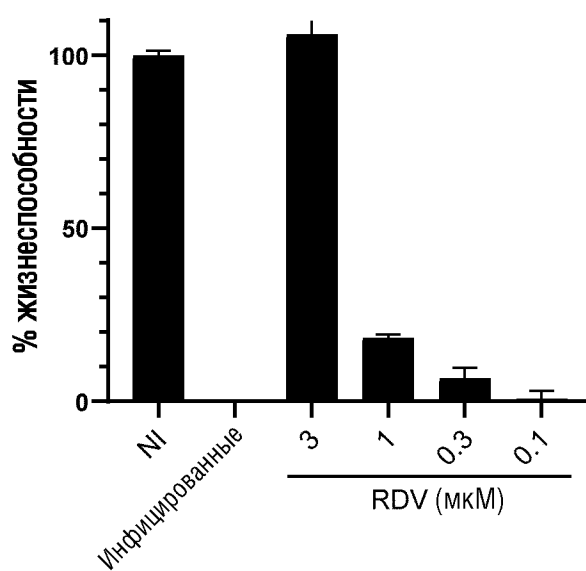
ФИГ.5С



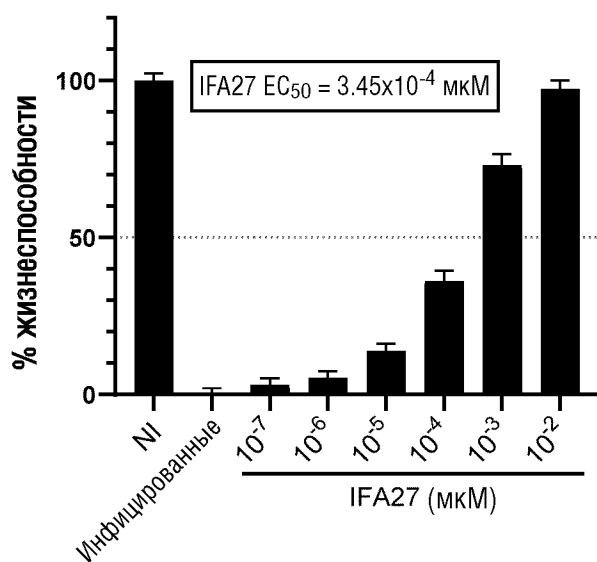
ФИГ.5D



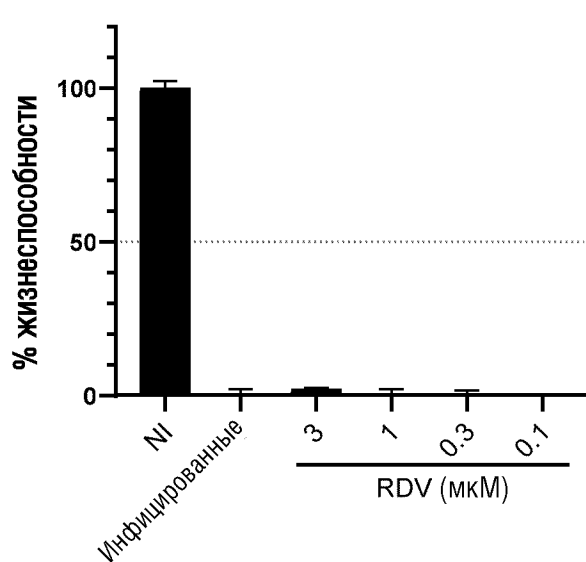
ФИГ.5E



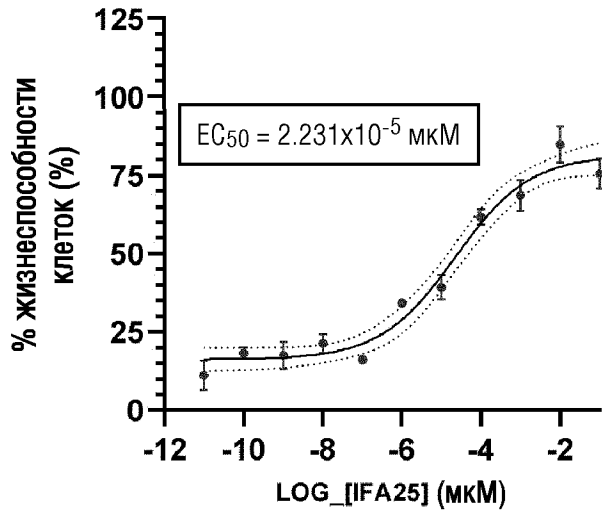
ФИГ.5F



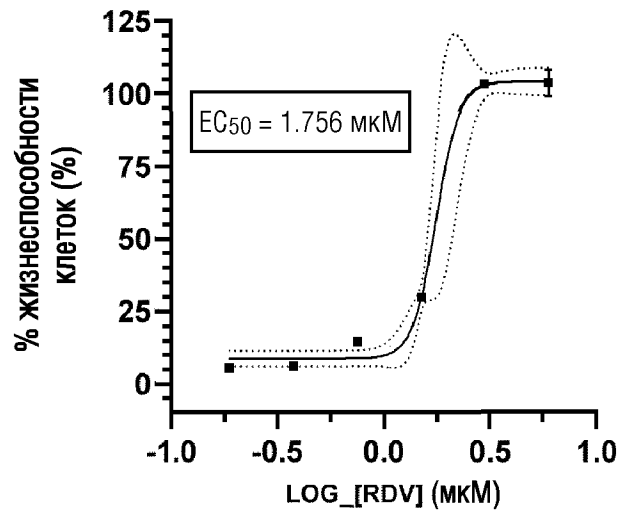
ФИГ.5G



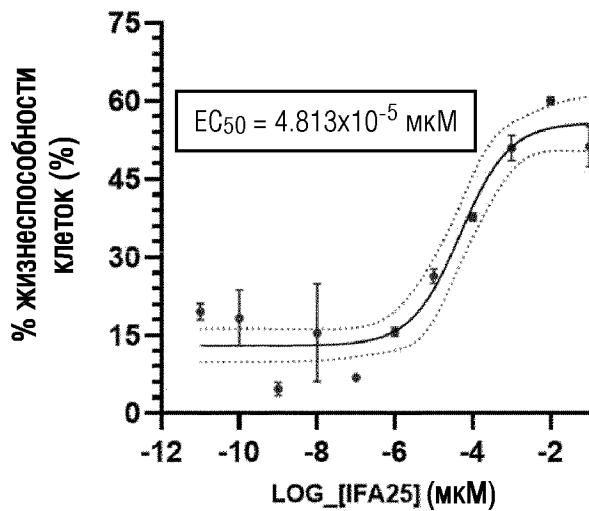
ФИГ.5D.bis



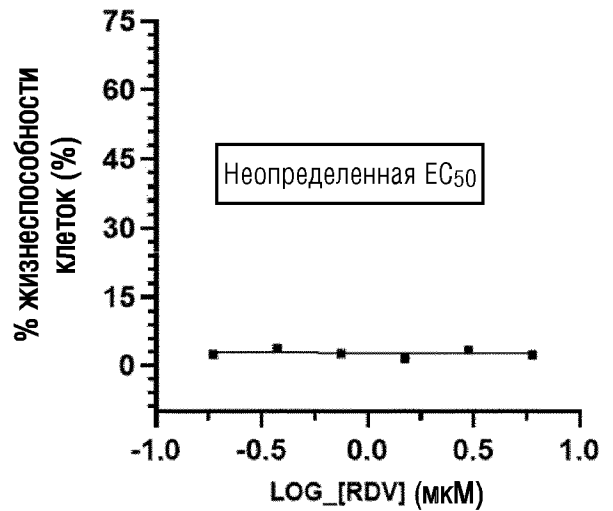
ФИГ.5E.bis



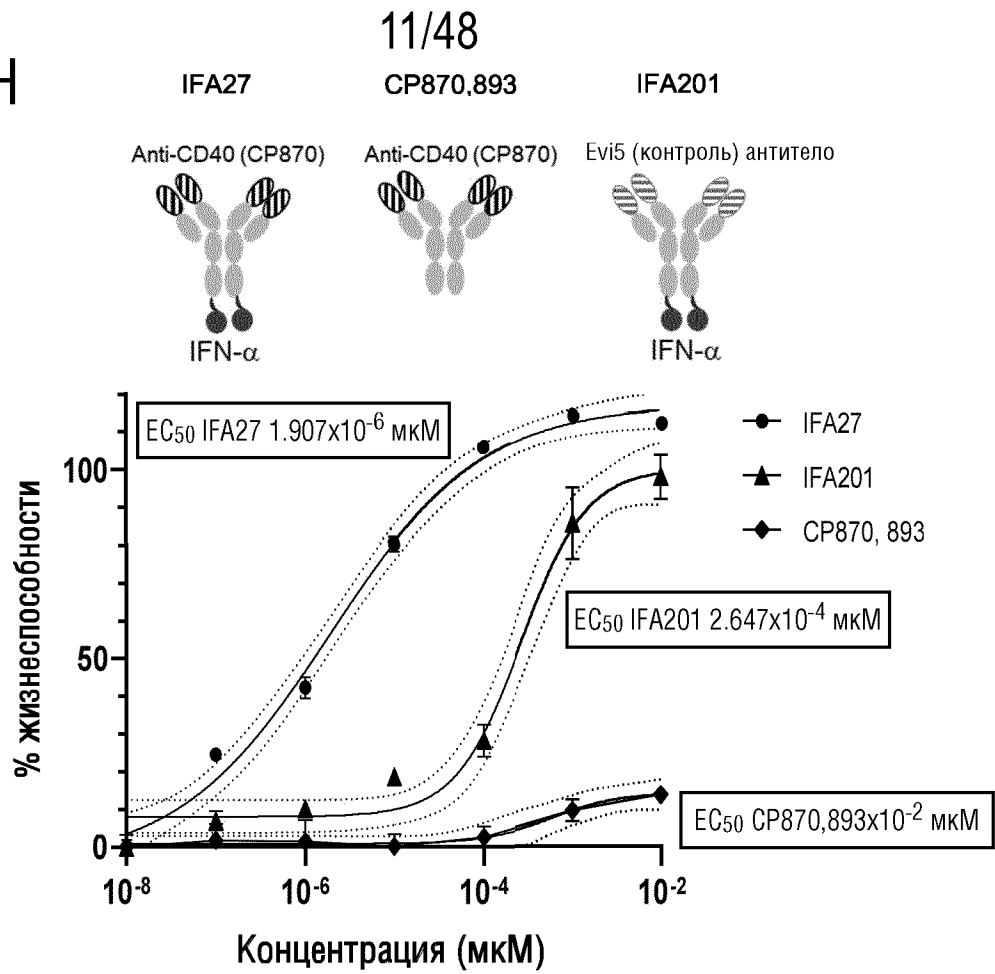
ФИГ.5F.bis



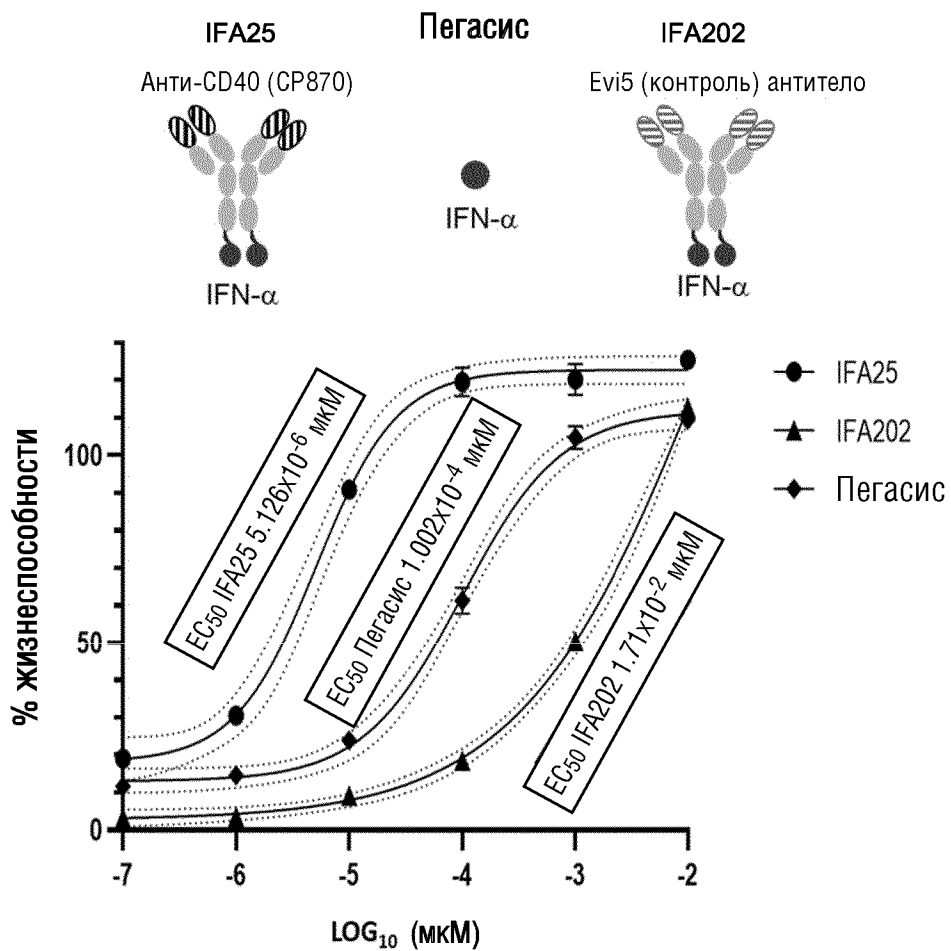
ФИГ.5G.bis



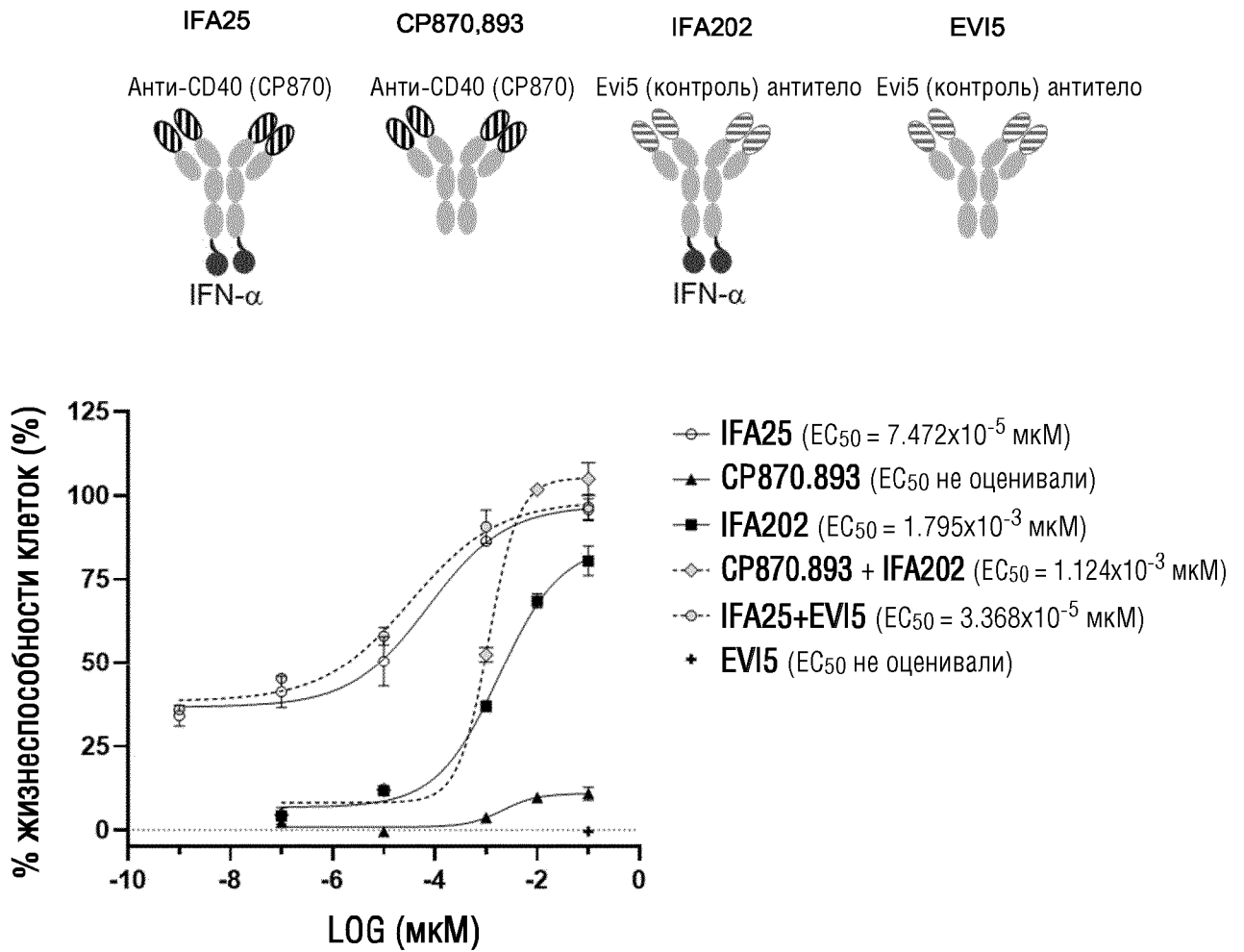
ФИГ.5H



ФИГ.5I



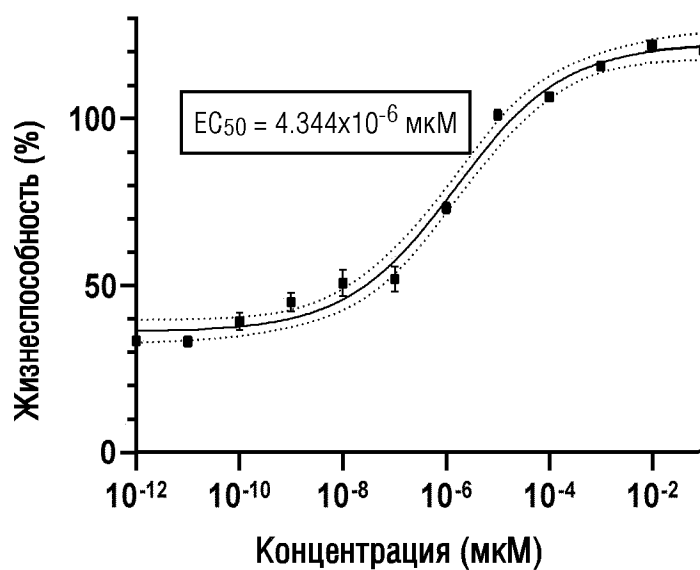
## ФИГ.5I.bis





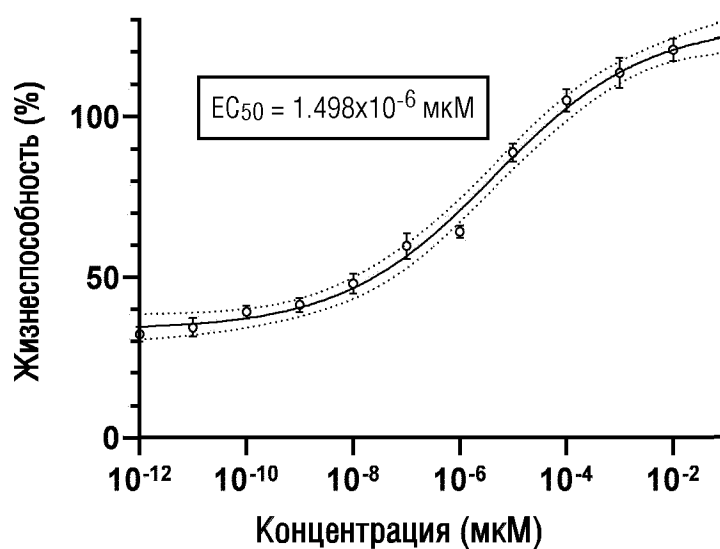
ФИГ.5J

USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 штаммы



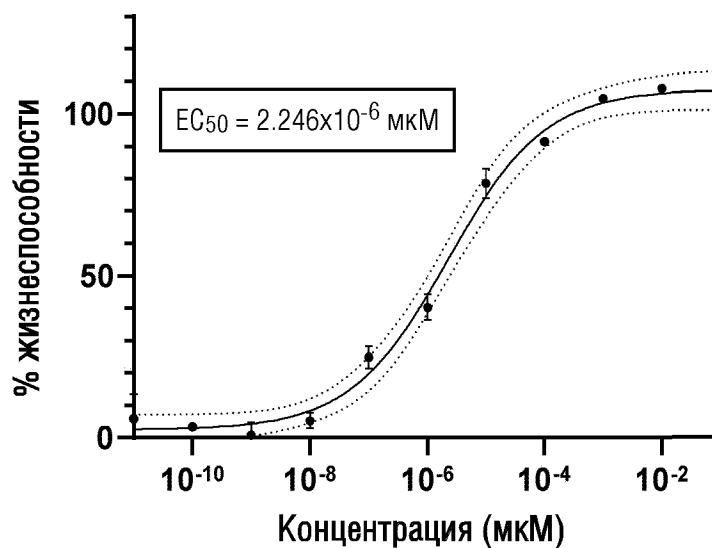
ФИГ.5К

Germany/BavPat1/2020 SARS-CoV-2 штаммы



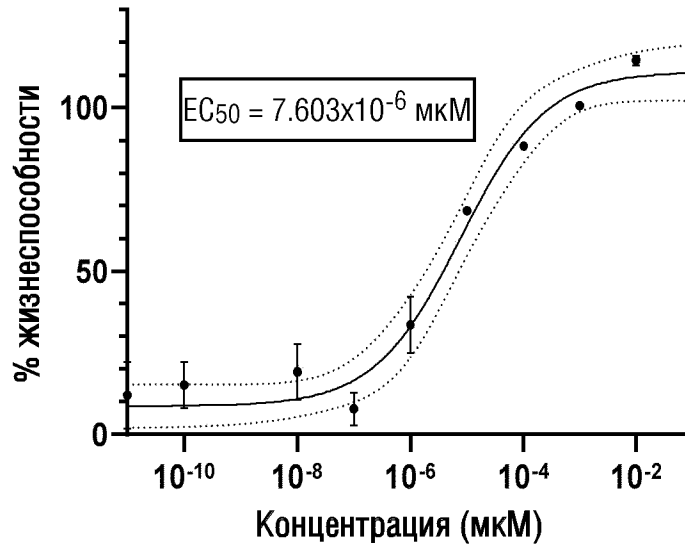
ФИГ.5L

SARS-CoV-2 USA-CA\_CDC\_5574-2020



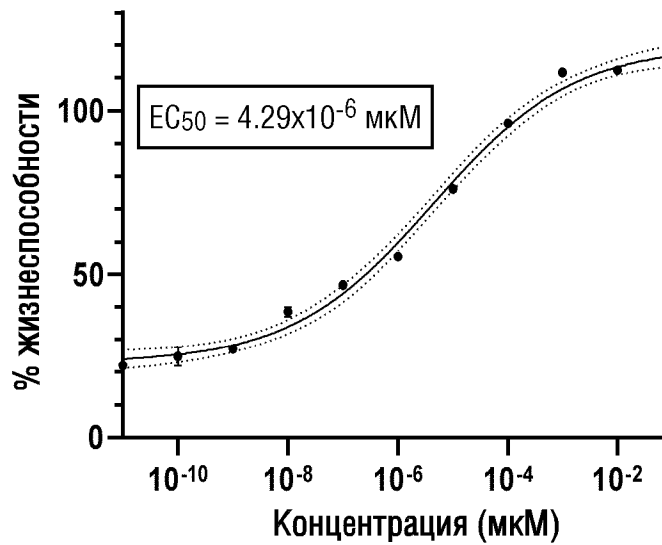
ФИГ.5М

SARS-CoV-2 hCoV-19\_England\_204820464\_2020



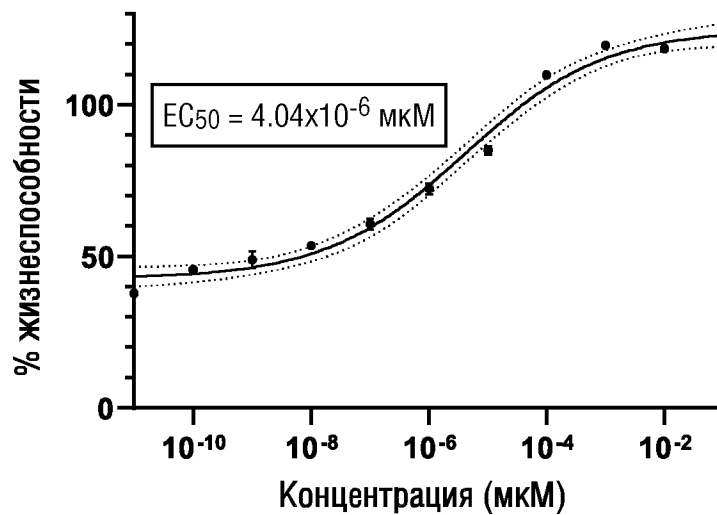
ФИГ.5N

SARS-CoV-2 South Africa/KRISP-EC-K005321/2020



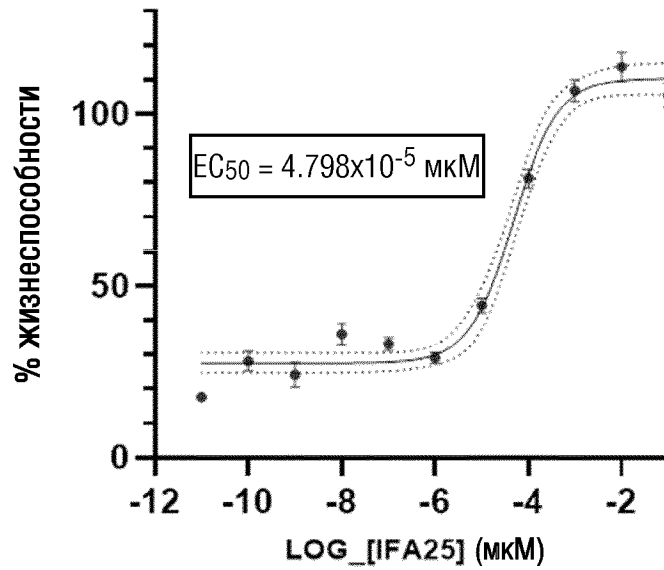
ФИГ.5O

SARS-CoV-2 South Africa/KRISP-EC-K005325/2020



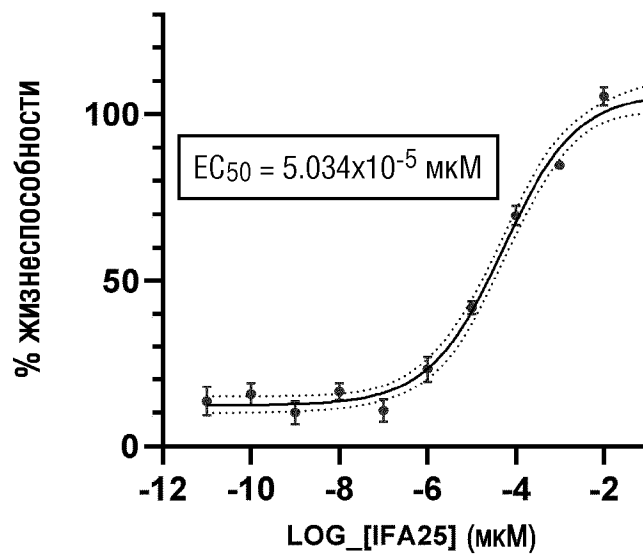
ФИГ.5P

SARS-CoV-2 hCoV-19/Japan/TY7-503/2021



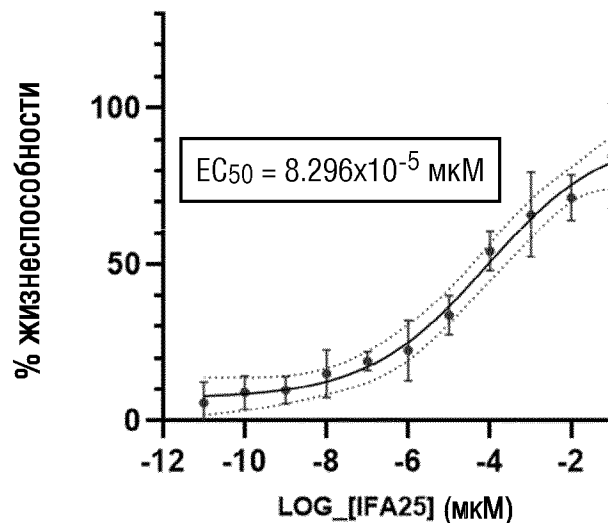
ФИГ.5Q

SARS-CoV-2 hCoV-19/USA/PHC658/2021



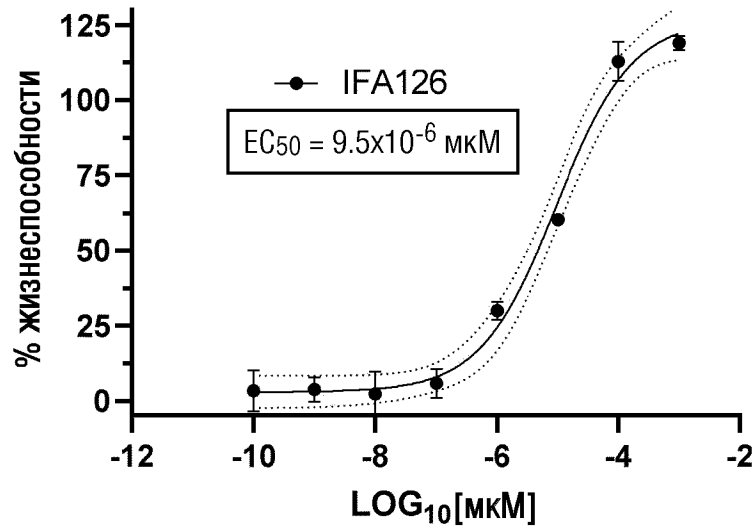
ФИГ.5R

SARS-CoV-2 hCoV-19/USA/MD-HP20874/2021



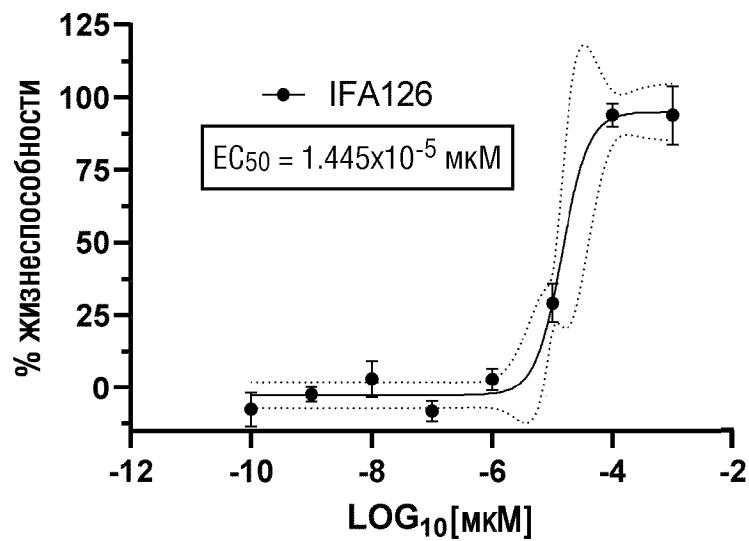
ФИГ.5S

SARS-CoV-2 USA-WA1/2020



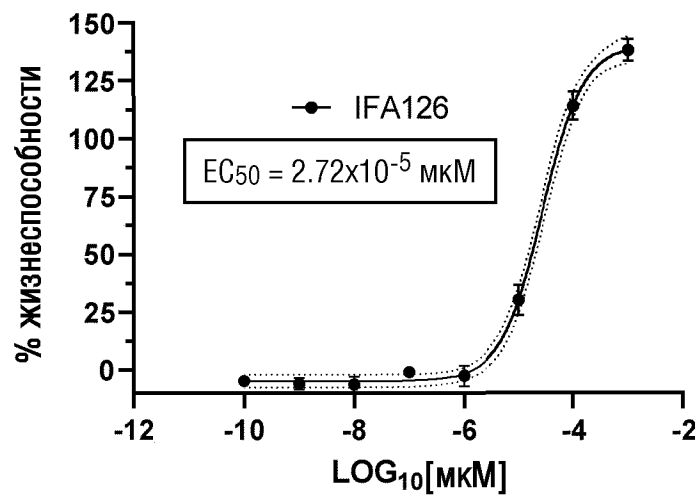
ФИГ.5Т

SARS-CoV-2 hCoV-19/USA/PHC658/2021

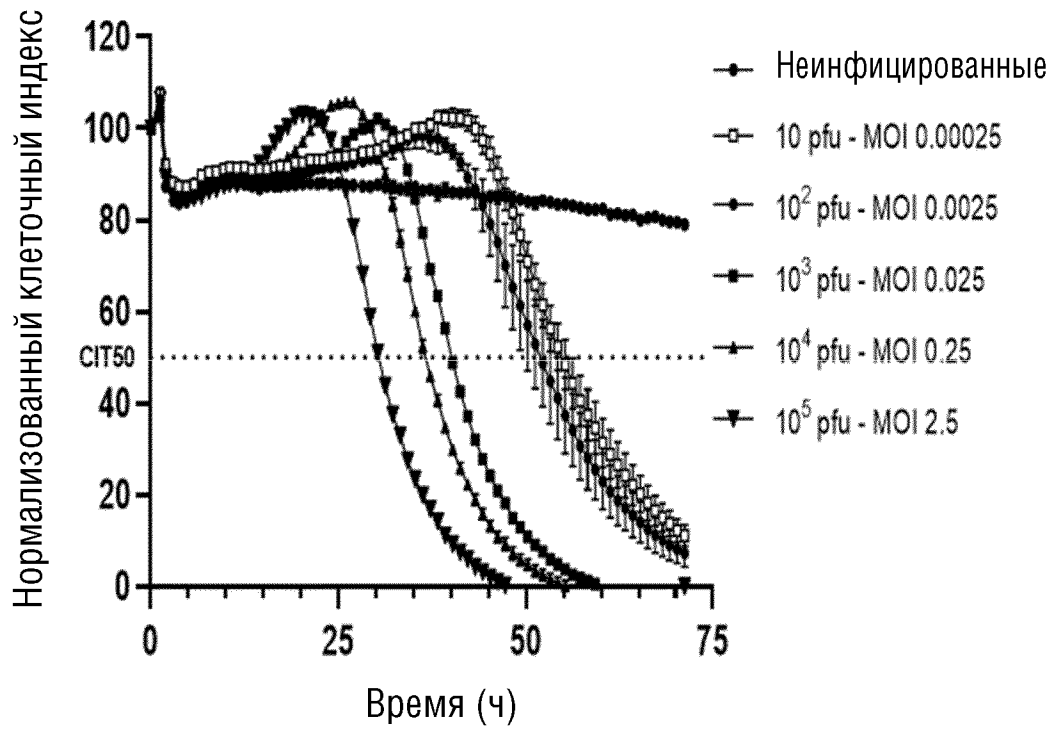


ФИГ.5У

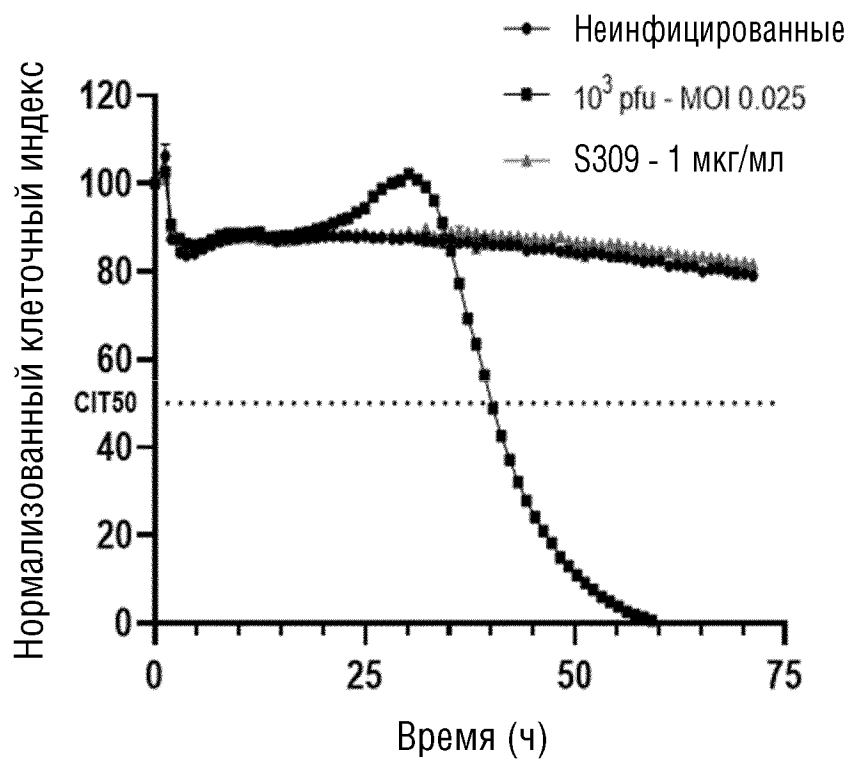
SARS-CoV2 hCoV-19/USA/MD-HP20874/2021



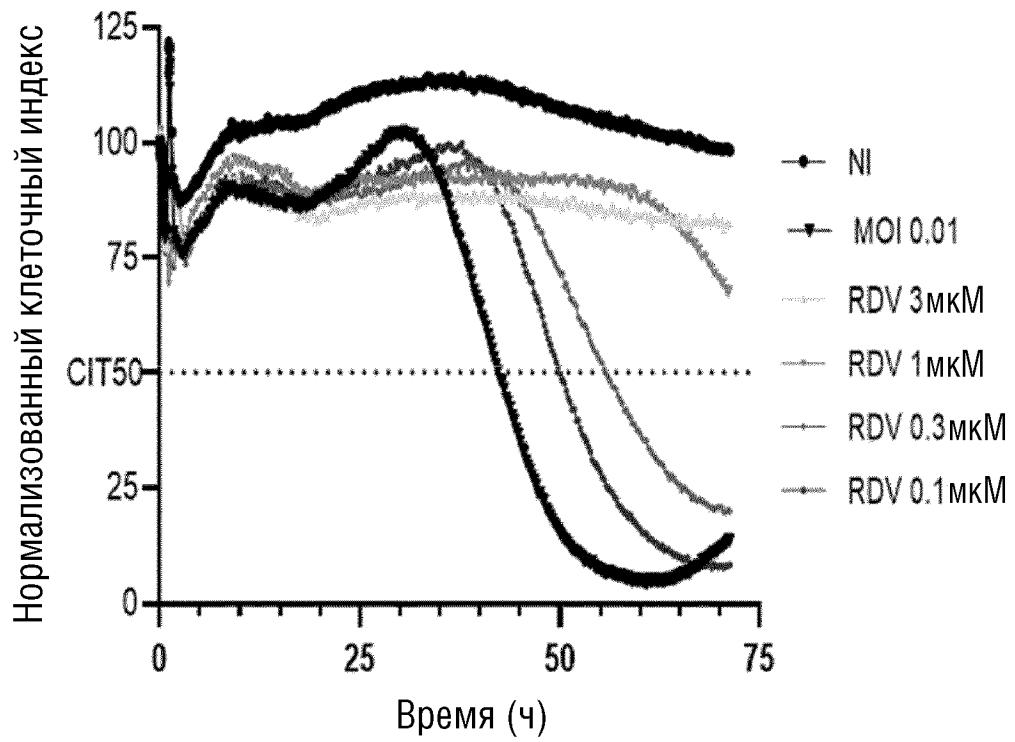
ФИГ.6А



ФИГ.6В

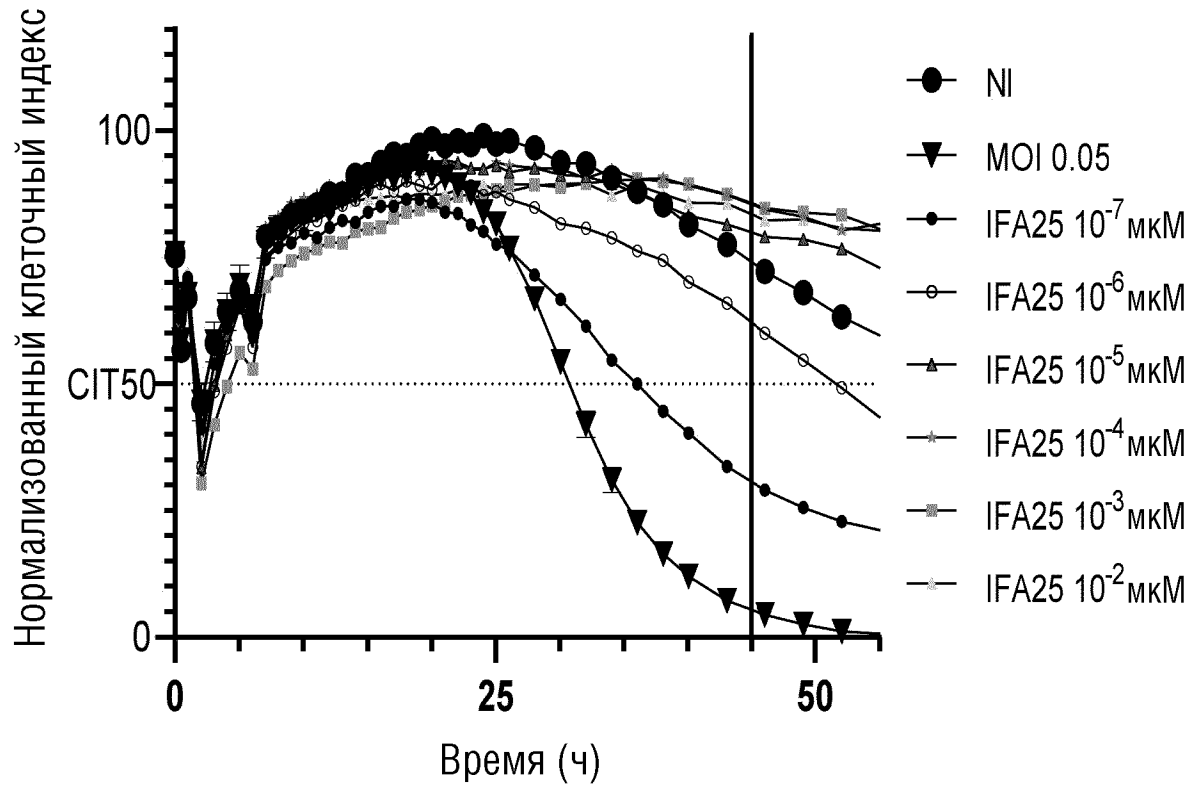


ФИГ.6С

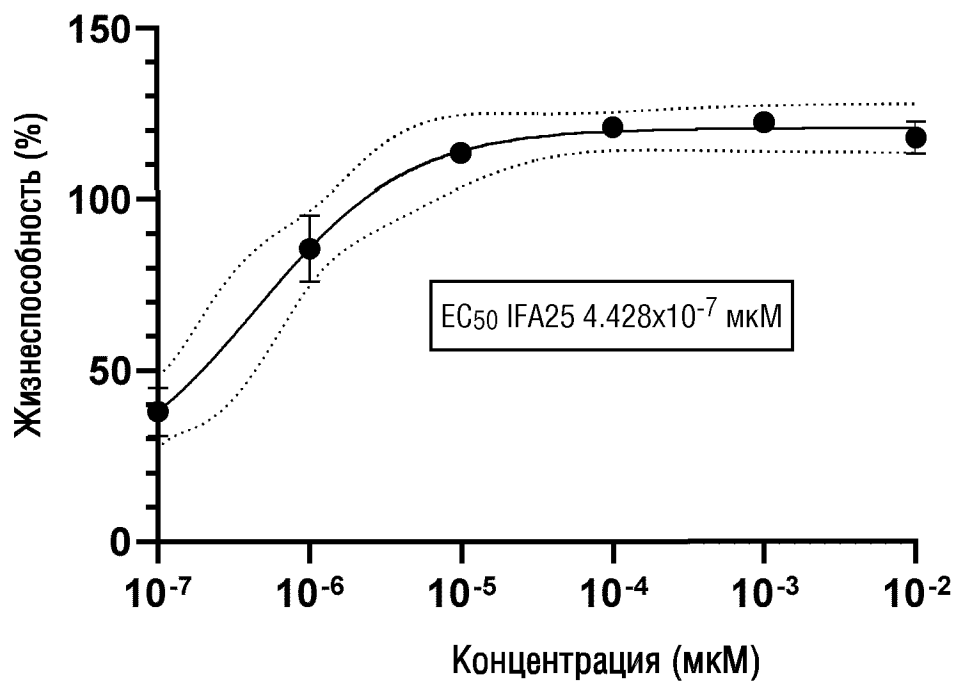


ФИГ.6D

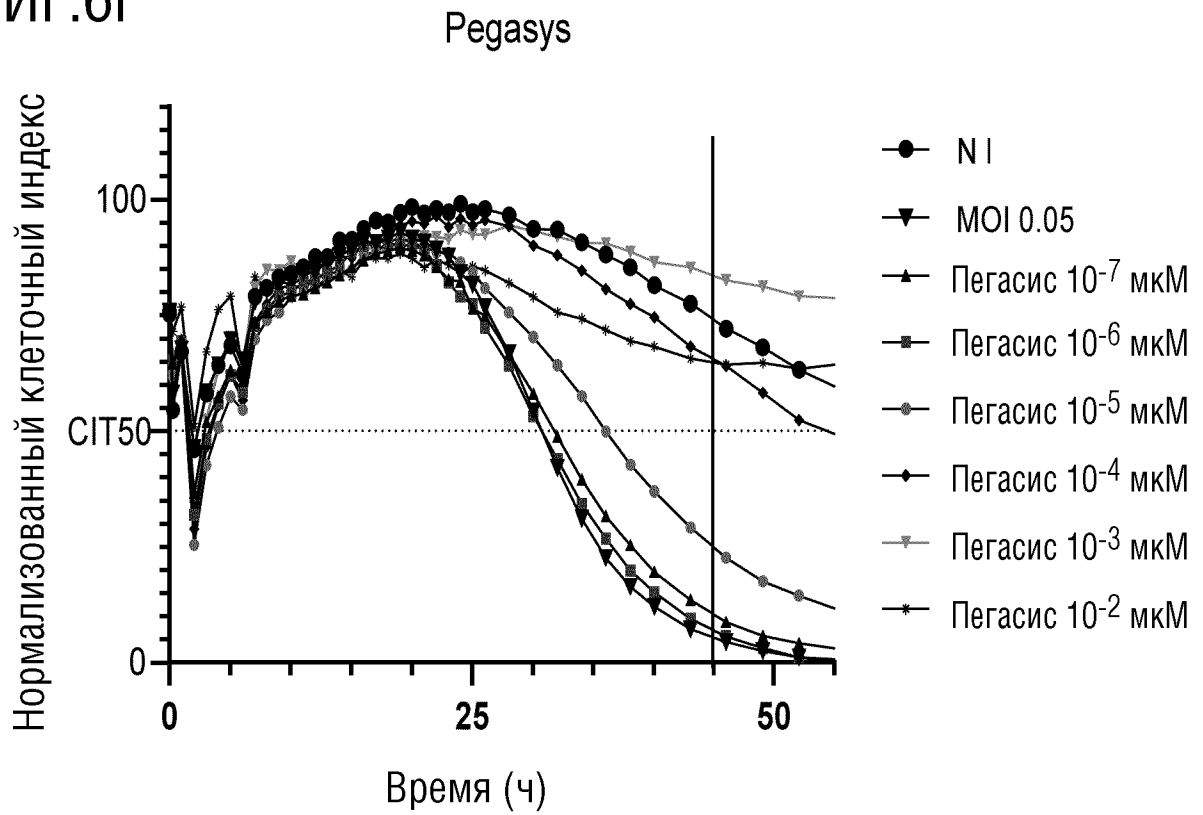
IFA25



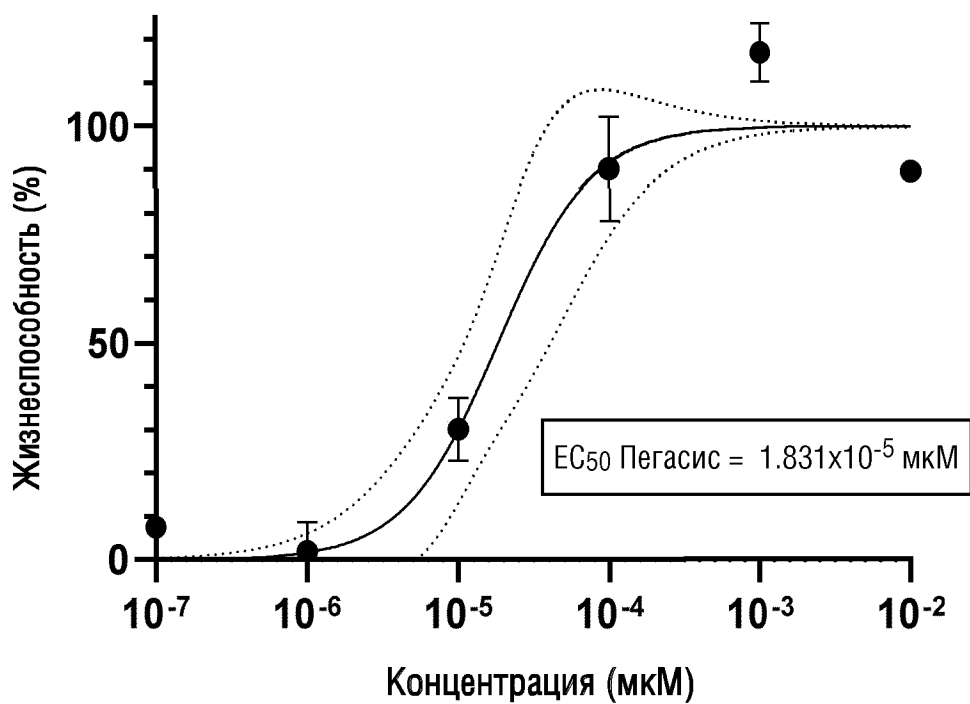
ФИГ.6E



ФИГ.6F



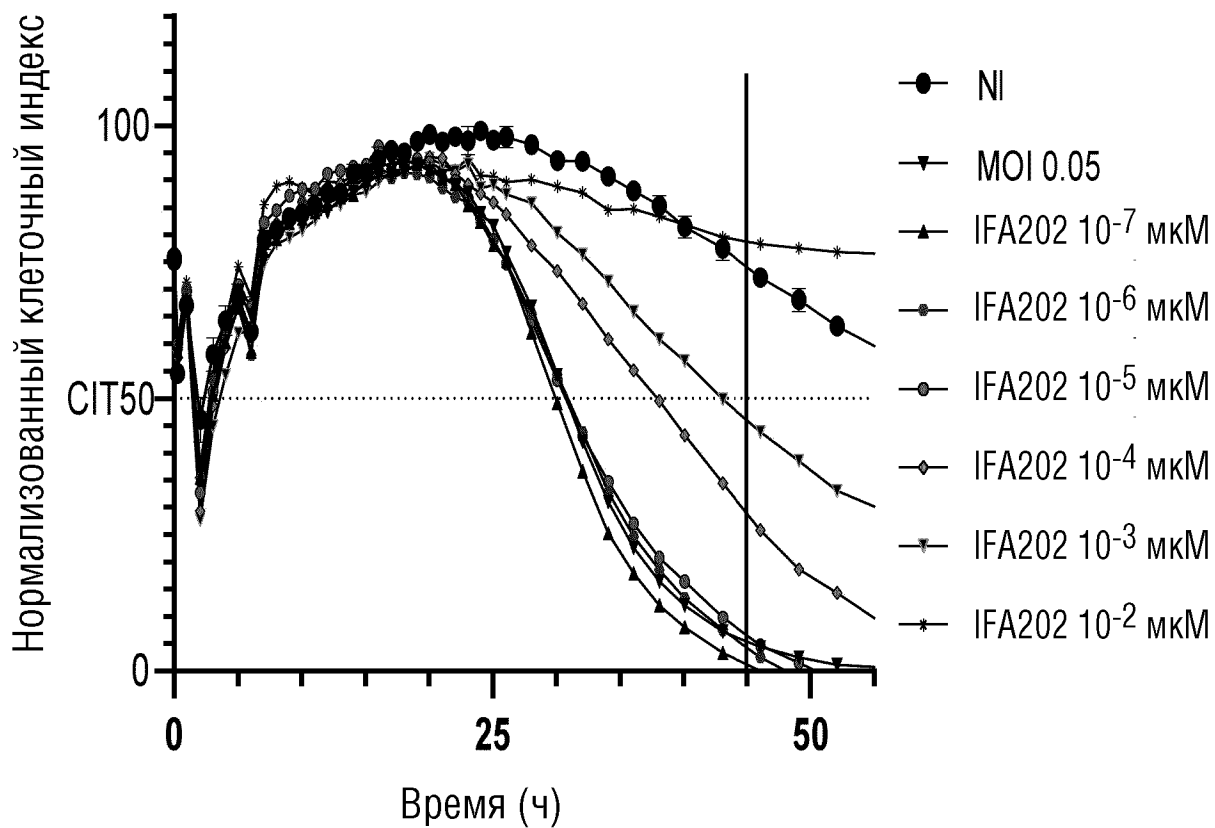
ФИГ.6G



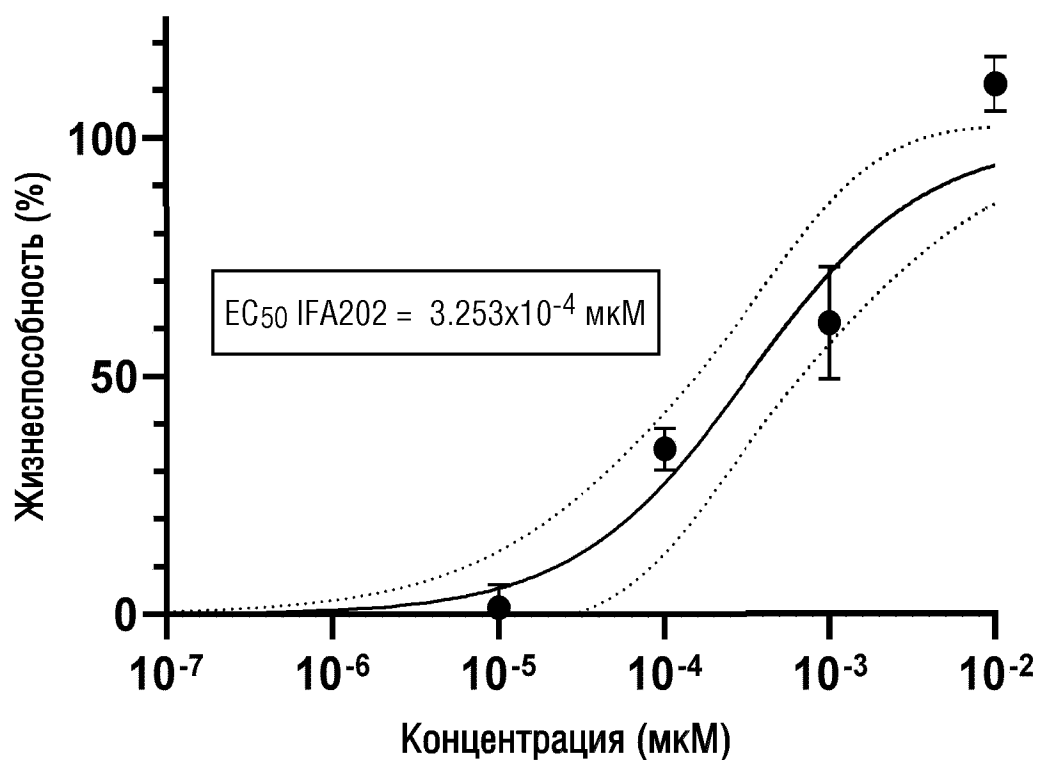


ФИГ.6H

IFA202



ФИГ.6I



ФИГ.7

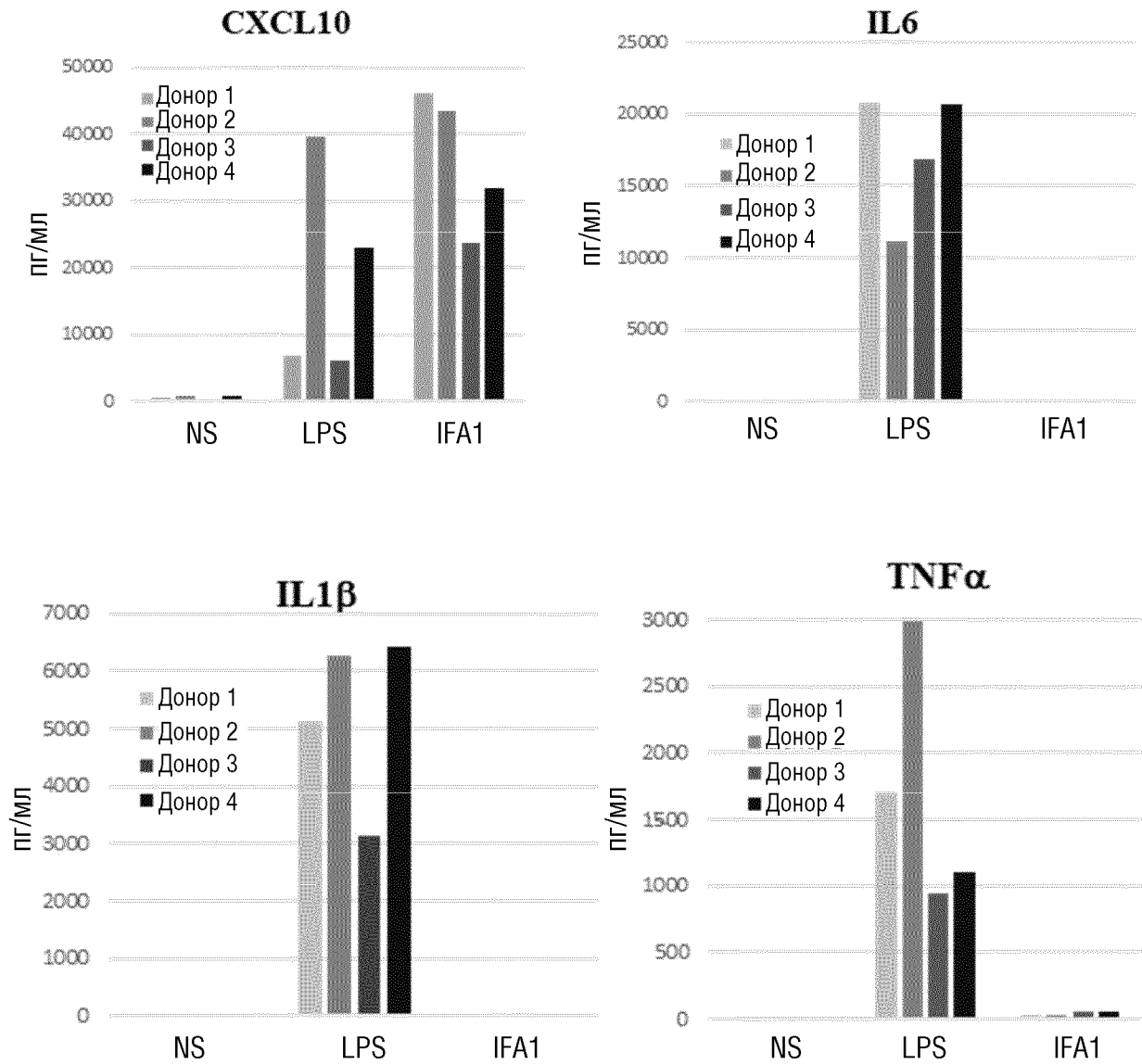
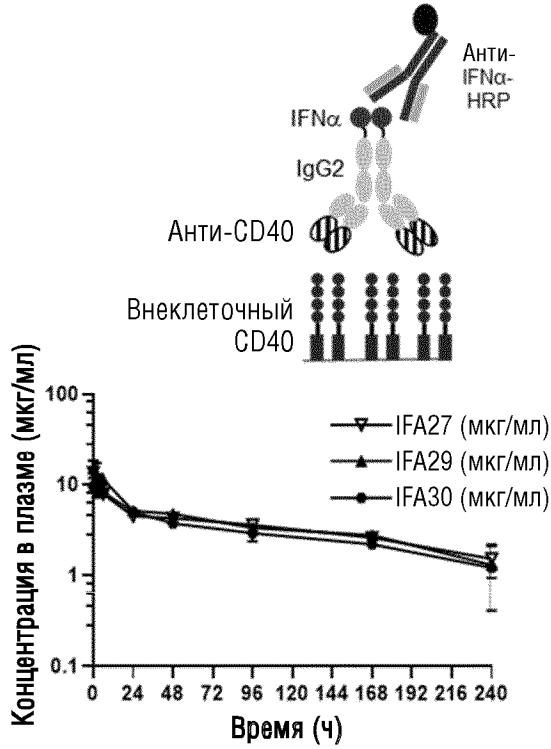


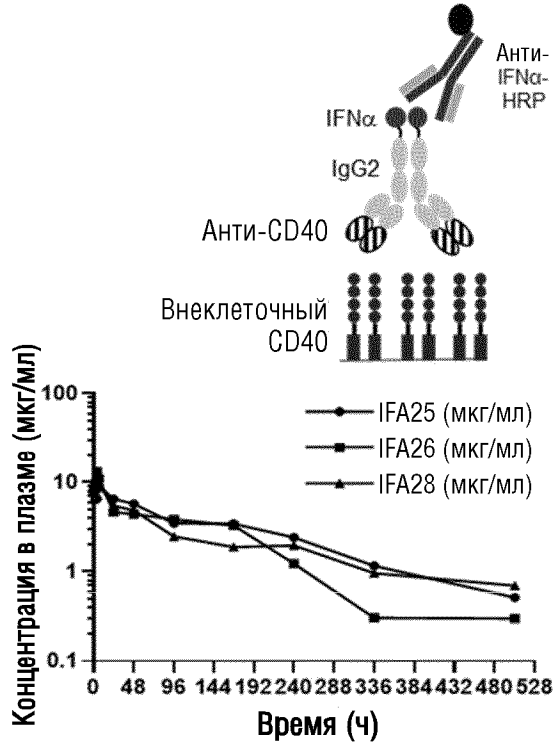
Таблица 11а: IFN-β- основанные IFA		IFN-γ	IL10	IL12p40	IL1β	IL2	IL6	IP10	TFNα
NT	Донор 1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	457,0	nd
	Донор 2	nd	nd	101,4	nd	nd	nd	672,7	4,6
	Донор 3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	302,3	nd
	Донор 4	nd	nd	104,0	nd	nd	nd	648,2	nd
LPS	Донор 1	2023,0	148,0	7757,1	5116,0	nd	20709,6	6646,7	1706,3
	Донор 2	4675,6	57,2	6265,6	6263,7	20,7	11070,1	39539,4	2987,1
	Донор 3	1537,3	192,9	1750,0	3137,6	nd	16837,7	6141,0	944,9
	Донор 4	2360,7	299,7	1676,5	6423,0	18,6	20654,0	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	34,0
	Донор 4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	31922,5	57,1
IFA2	Донор 1	nd	nd	nd	nd	nd	18,6	43382,3	41,0
	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	38445,0	66,0

Таблица 11б: IFN-α- основанные IFA		IFN-γ	IL10	IL12p40	IL1β	IL2	IL6	IP10	TFNα
NT	Донор 5	12,6	0,6	91,6	0,9	0,9	3,9	270,3	2,1
	Донор 6	5,0	1,1	129,9	19,9	#DIV/0!	423,2	1052,7	16,0
	Донор 7	16,5	2,0	143,7	22,1	2,1	426,9	1025,0	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	2,0	129,8	16,5	4,0	51,8	61963,8	71,4
	Донор 7	271,2	2,9	130,3	9,1	4,4	75,0	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	2,0	98,1	2,1	6,4	29,3	37880,2	32,1
	Донор 6	303,7	3,3	150,8	17,1	3,1	53,0	72944,8	45,7
	Донор 7	180,3	2,0	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	2,0	148,5	16,8	2,1	66,0	83445,0	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	35,0	40958,5	24,6
	Донор 6	264,7	2,0	170,3	13,6	2,4	45,7	62333,3	33,0
	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	2,0	65,6	136893,2	90,5
	Донор 8	301,1	3,0	77,7	5,8	0,6	33,8	69226,3	48,0
IFA30	Донор 5	709,7	1,2	110,6	2,9	5,5	38,0	63040,7	36,5
	Донор 6	122,9	2,0	153,0	14,9	1,7	46,1	67861,2	37,4
	Донор 7	64,6	1,0	114,0	10,0	2,9	75,5	149093,0	32,7
	Донор 8	206,0	1,9	71,1	6,8	1,8	37,9	85986,9	40,5

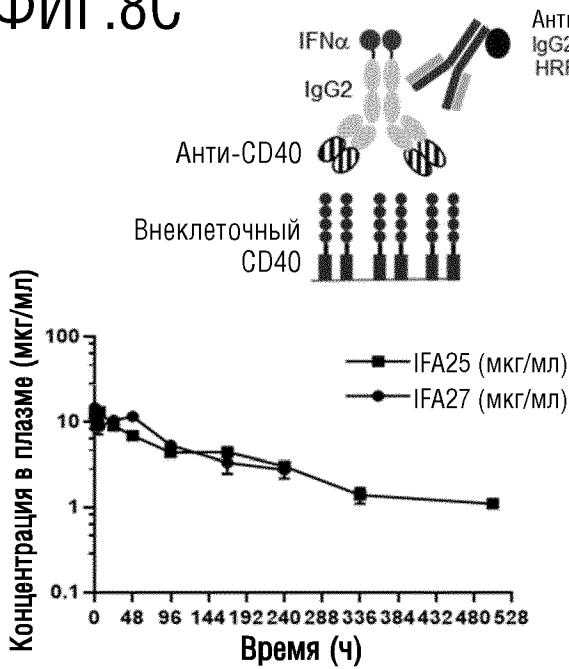
ФИГ.8А



ФИГ.8В



ФИГ.8С



ФИГ.8D

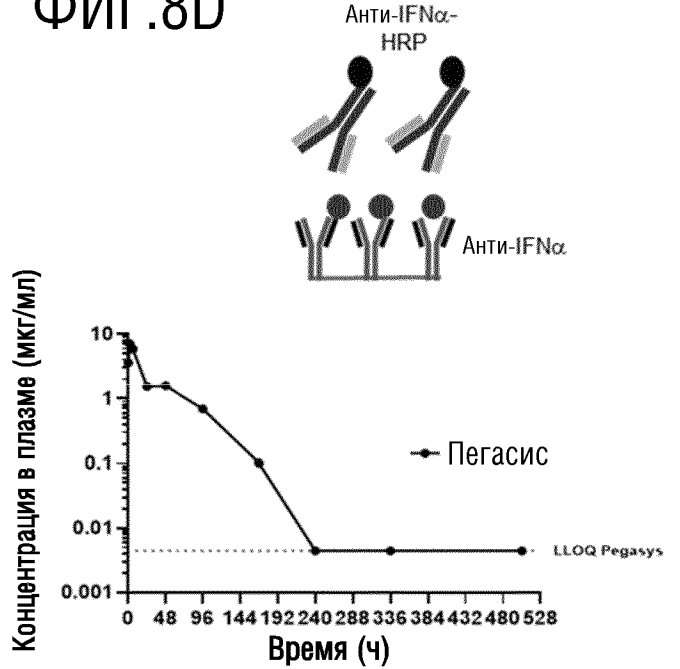


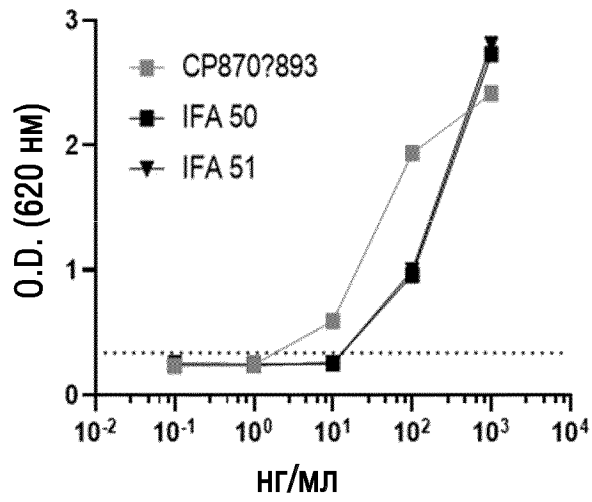
Таблица 12А

Матрикс	Соединение	Доза в периоде полу-выведения	Способ	С <sub>0</sub> (мкг/мл)	AUC (0-last) (мкг.ч/мл)	T <sub>last</sub> (ч)	AUC (0-inf) (мкг.ч/мл)	% экстра-поляции	T <sub>1/2t</sub> (ч)	Cl (мл/ч/кг)	V <sub>D</sub> (мл/кг)
Сыворотка	CP870,893	0.5 мг/кг 168 ч	ELISA-IgG2	7,15	241	168	590	59	264 (длинный)	0,35 (низкая)	296 (низкая)
Сыворотка	IFA27	0.5 мг/кг 240 ч	ELISA-IgG2	14,7	1501	240	2552	41	218 (длинный)	0,20 (низкая)	55 (низкая)
Сыворотка	IFA27	0.5 мг/кг 240 ч	ELISA-IFN	16,9	1318	240	1793	26	125 (длинный)	0,28 (низкая)	50 (низкая)
Сыворотка	IFA29	0.5 мг/кг 240 ч	ELISA-IFN	11,6	804	240	1033	22	116 (длинный)	0,49 (низкая)	78 (низкая)
Сыворотка	IFA30	0.5 мг/кг 240 ч	ELISA-IFN	8,12	741	240	1089	31	158 (длинный)	0,46 (низкая)	98 (низкая)

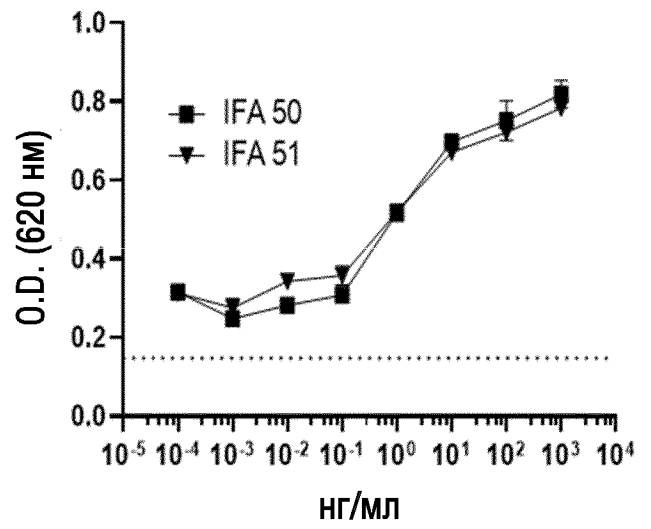
Таблица 12В

Матрикс	Соединение	Доза в периоде полу-выведения	Способ	С <sub>0</sub> (мкг/мл)	AUC (0-last) (мкг.ч/мл)	T <sub>last</sub> (ч)	AUC (0-inf) (мкг.ч/мл)	% экстра-поляции	T <sub>1/2t</sub> (ч)	Cl (мл/ч/кг)	V <sub>D</sub> (мл/кг)
Сыворотка	IFA25	0.5 мг/кг 504 ч	ELISA-IFN	7,45	1328	504	1500	11	154 (длинный)	0,34 (низкая)	73 (низкая)
Сыворотка	IFA26	0.5 мг/кг 504 ч	ELISA-IFN	8,20	988	336	1027	3,8	59 (длинный)	0,49 (низкая)	57 (низкая)
Сыворотка	IFA28	0.5 мг/кг 504 ч	ELISA-IFN	9,38	1048	504	1264	17	213 (длинный)	0,40 (низкая)	105 (низкая)
Сыворотка	Пегасис	0.5 мг/кг 504 ч	ELISA-IFN <sub>a</sub> специфич.	8,3	210	168	215	2	30 (средний)	1,4 (низкая)	62 (низкая)
Сыворотка	CP870,893	0.5 мг/кг 504 ч	ELISA-IgG2	11,9	527	168	797	34	116 (длинный)	0,63 (низкая)	96 (низкая)
Сыворотка	IFA25	0.5 мг/кг 504 ч	ELISA-IgG2	11,8	1292	240	1971	34	155 (длинный)	0,26 (низкая)	56 (низкая)

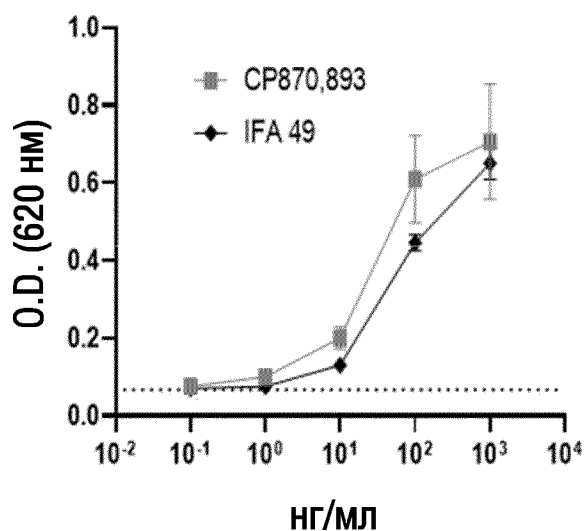
ФИГ.9А



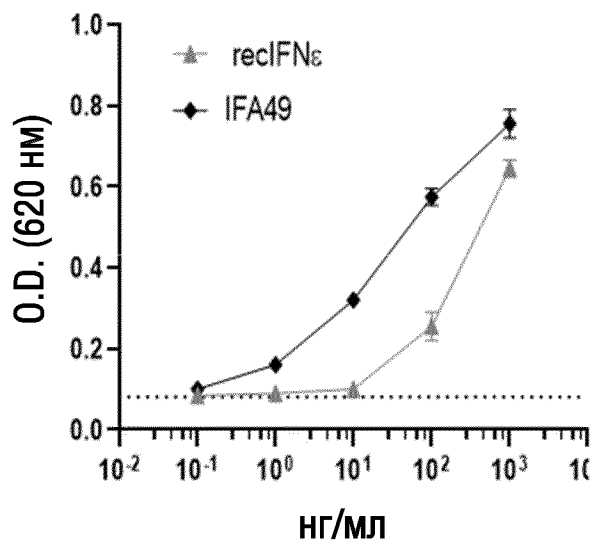
ФИГ.9В



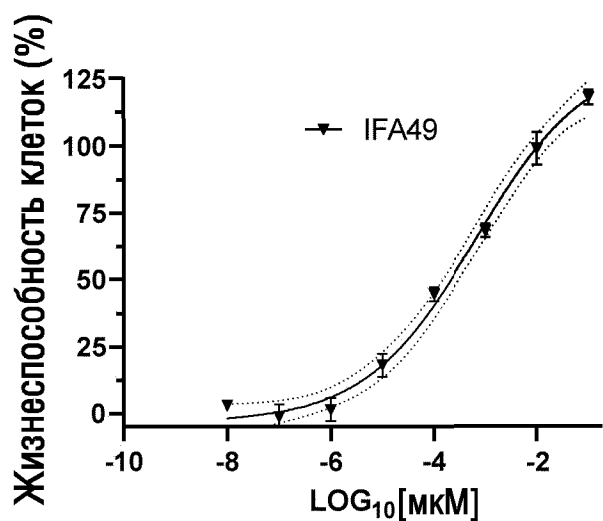
ФИГ.10А



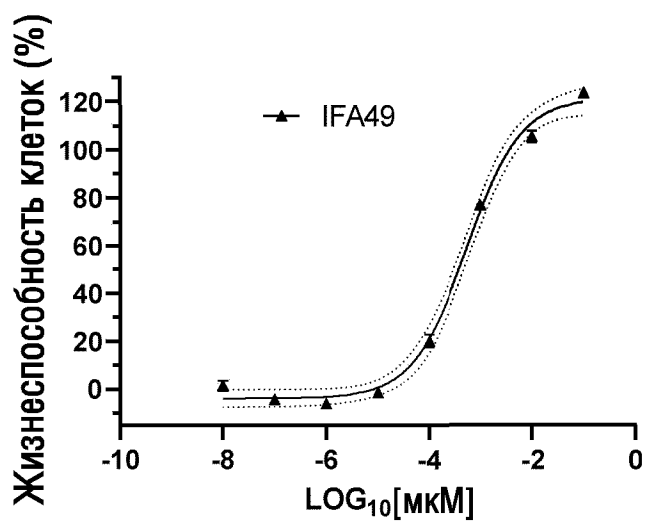
ФИГ.10В



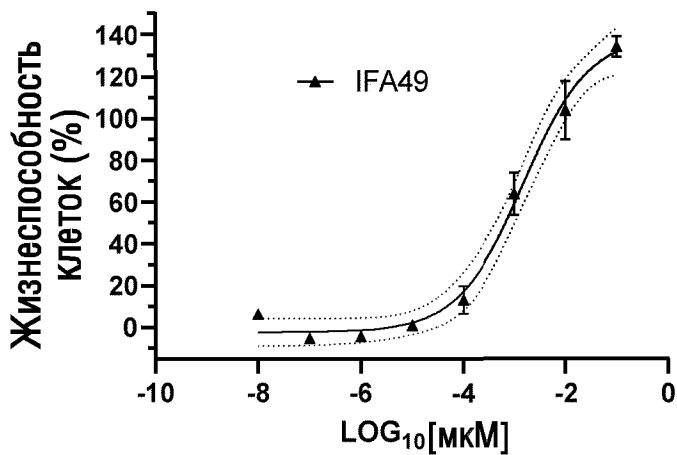
ФИГ.10С



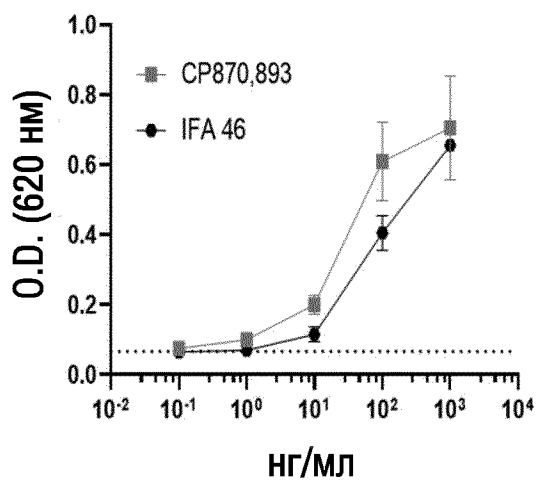
ФИГ.10D



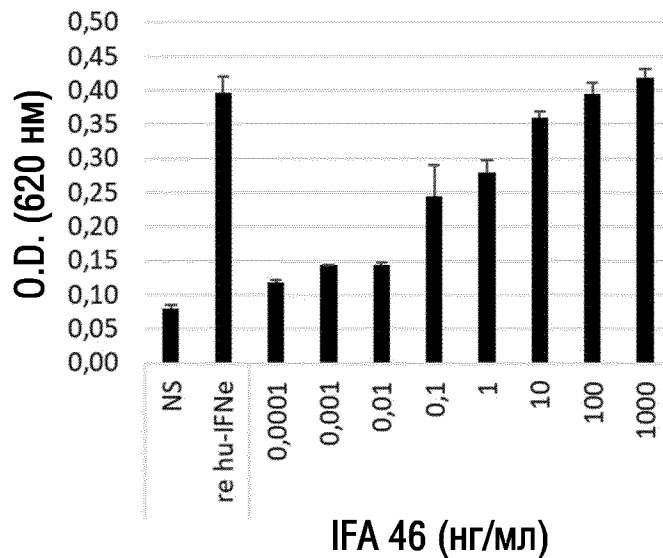
ФИГ.10Е



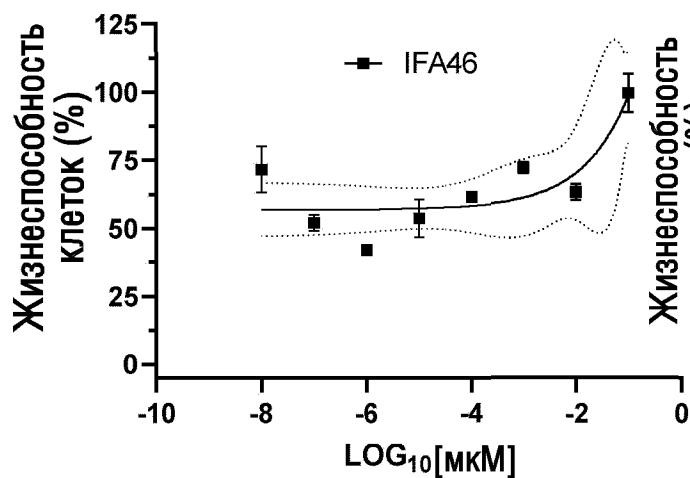
ФИГ.11А



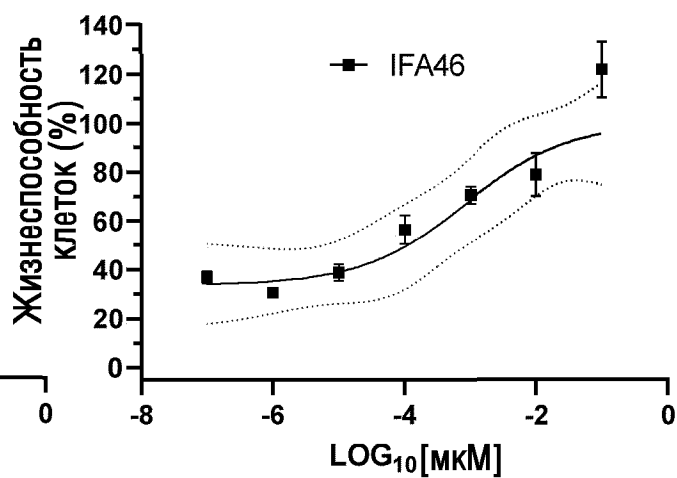
ФИГ.11В



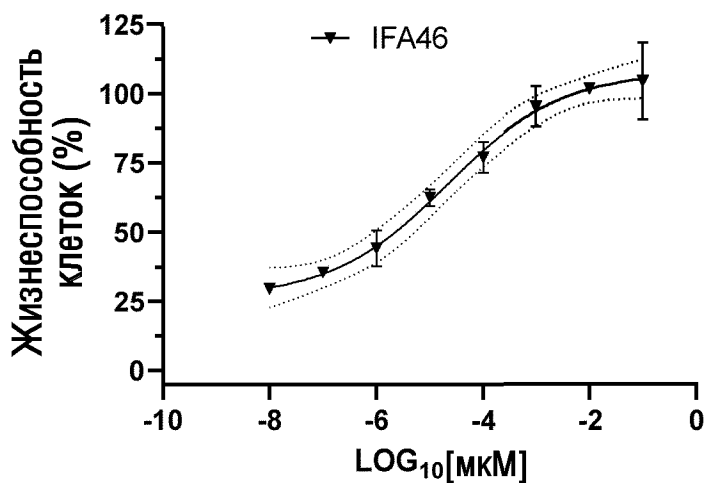
ФИГ.11С



ФИГ.11D

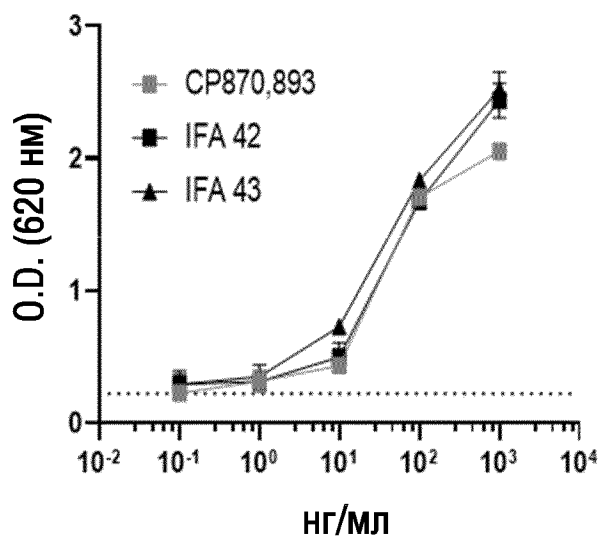


ФИГ.11Е

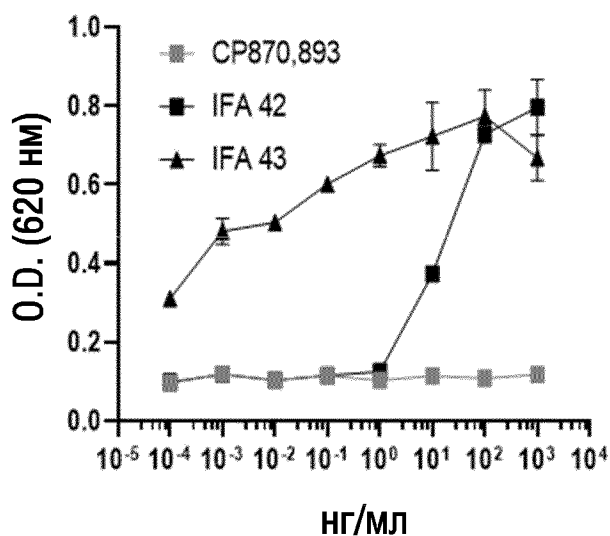




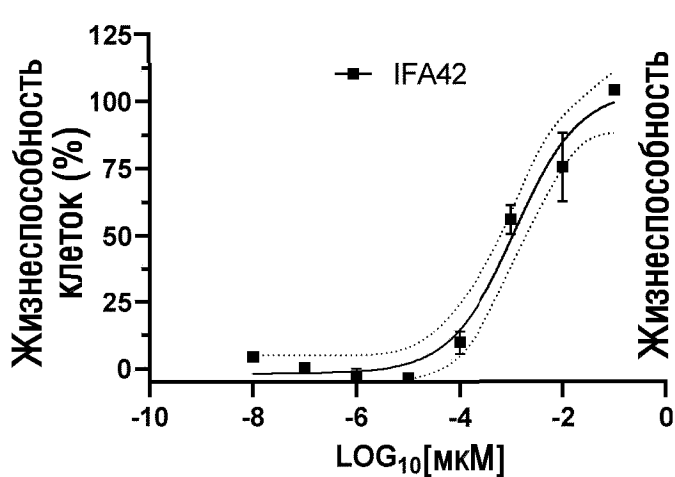
ФИГ.12А



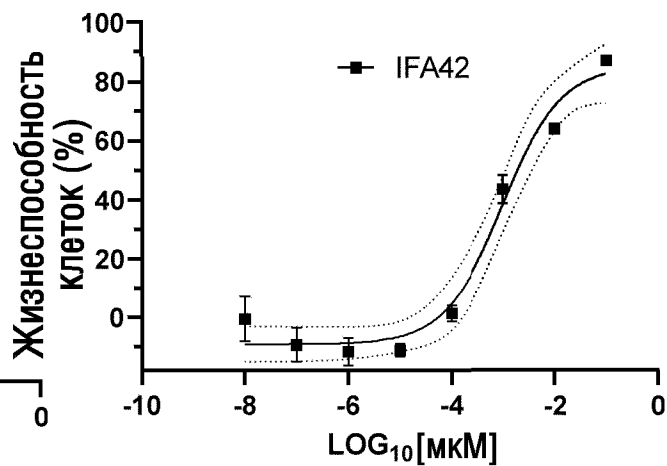
ФИГ.12В



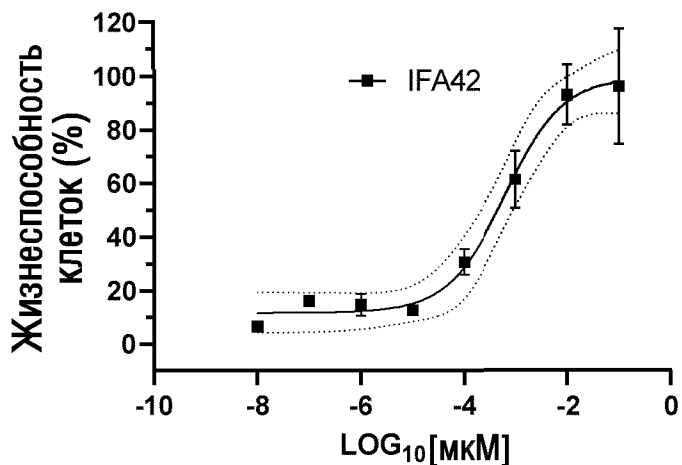
ФИГ.12С



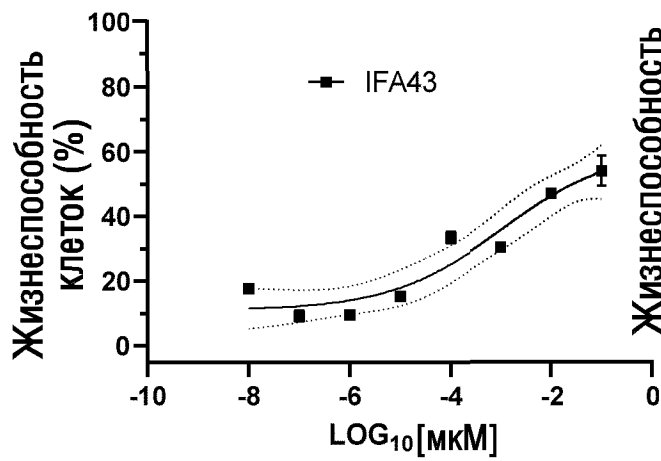
ФИГ.12D



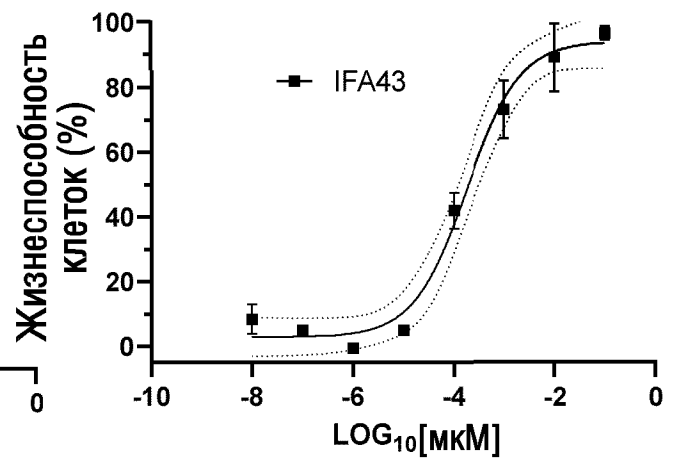
ФИГ.12Е



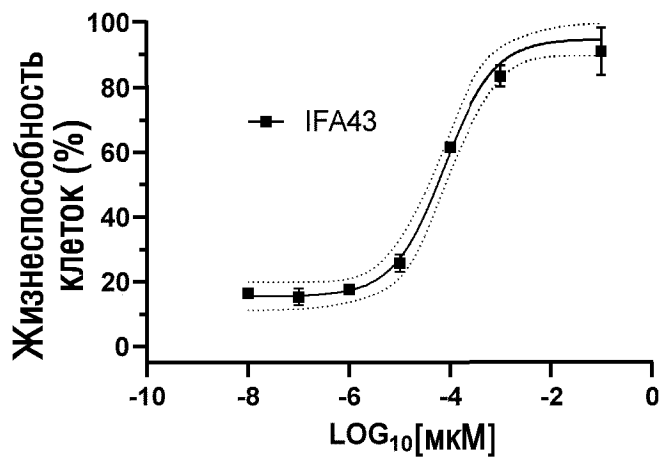
ФИГ.12F



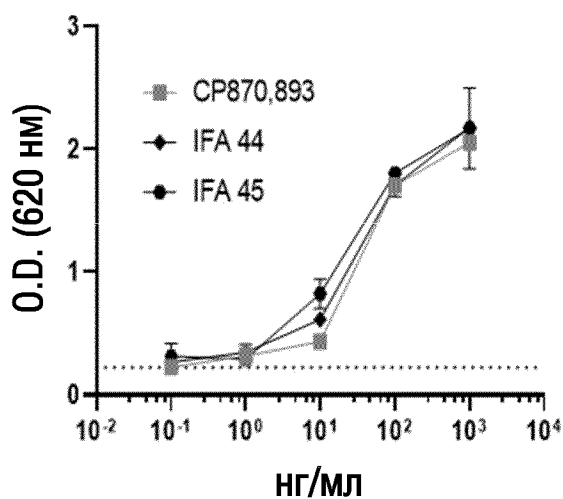
ФИГ.12G



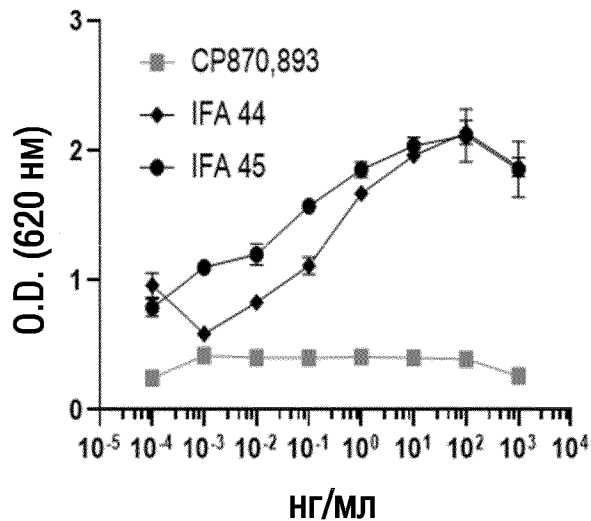
ФИГ.12H



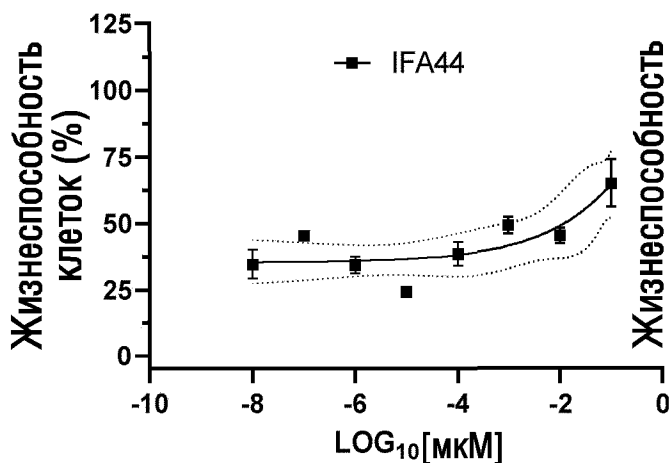
ФИГ.13А



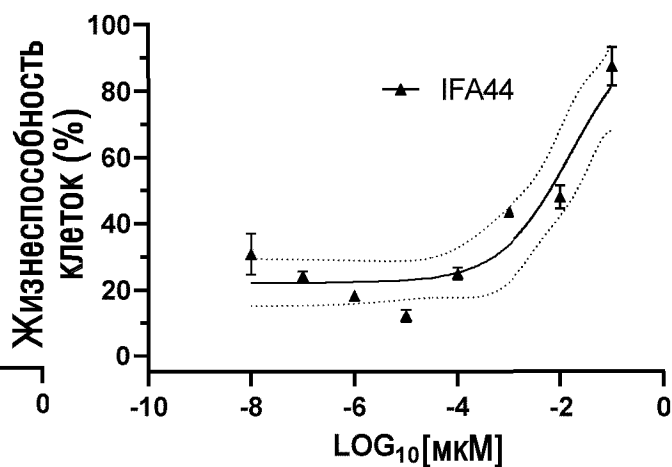
ФИГ.13В



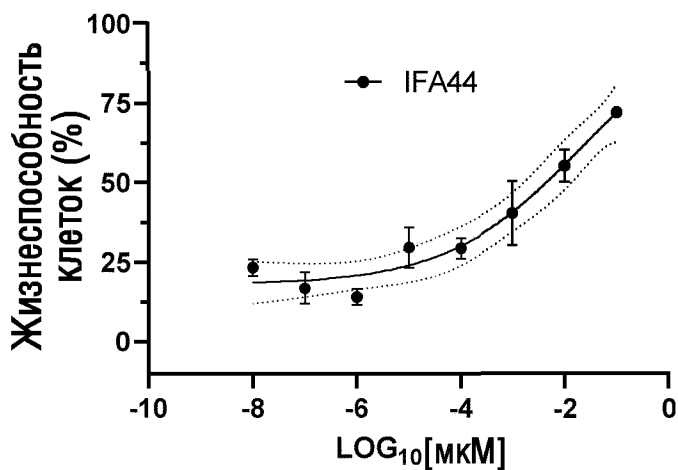
ФИГ.13С



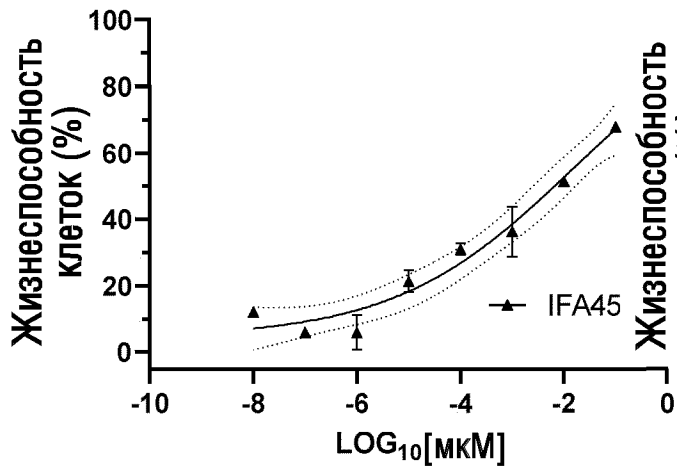
ФИГ.13D



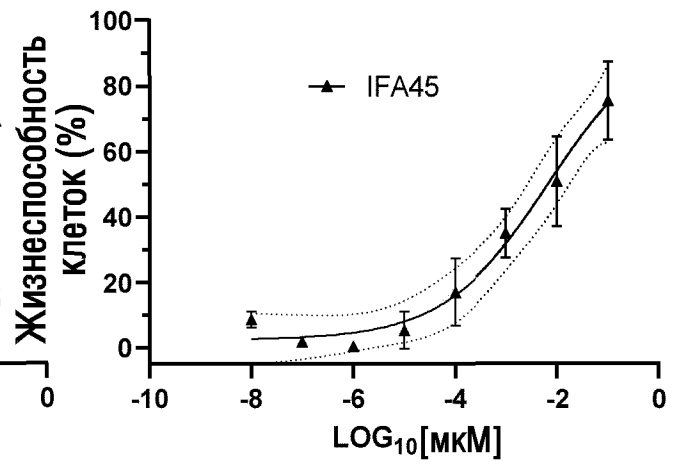
ФИГ.13Е



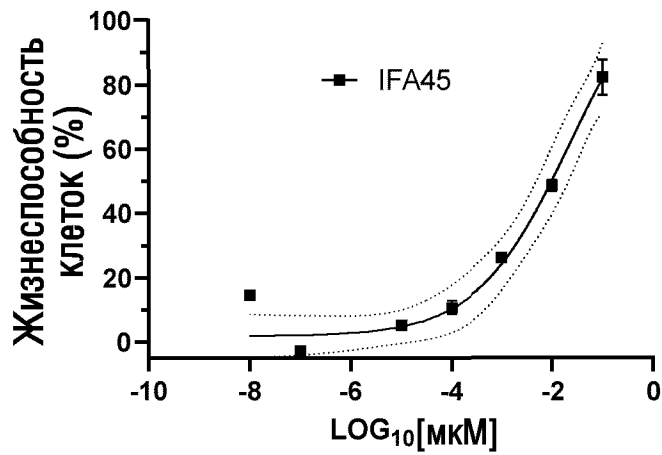
ФИГ.13F



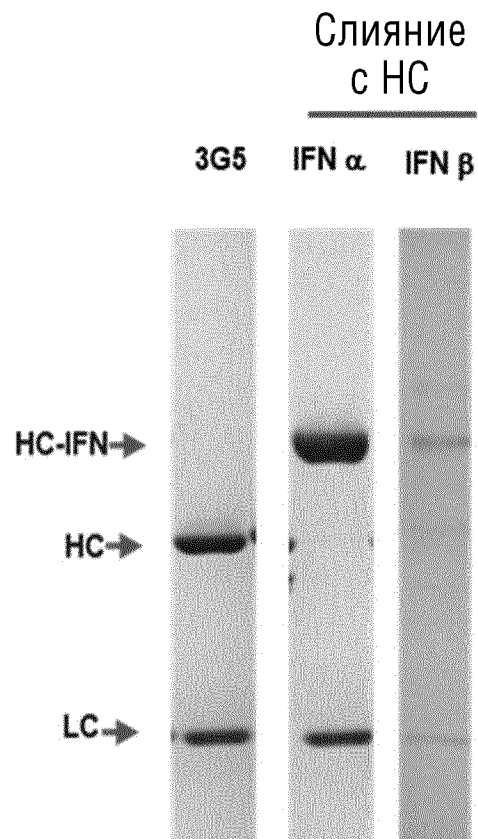
ФИГ.13G



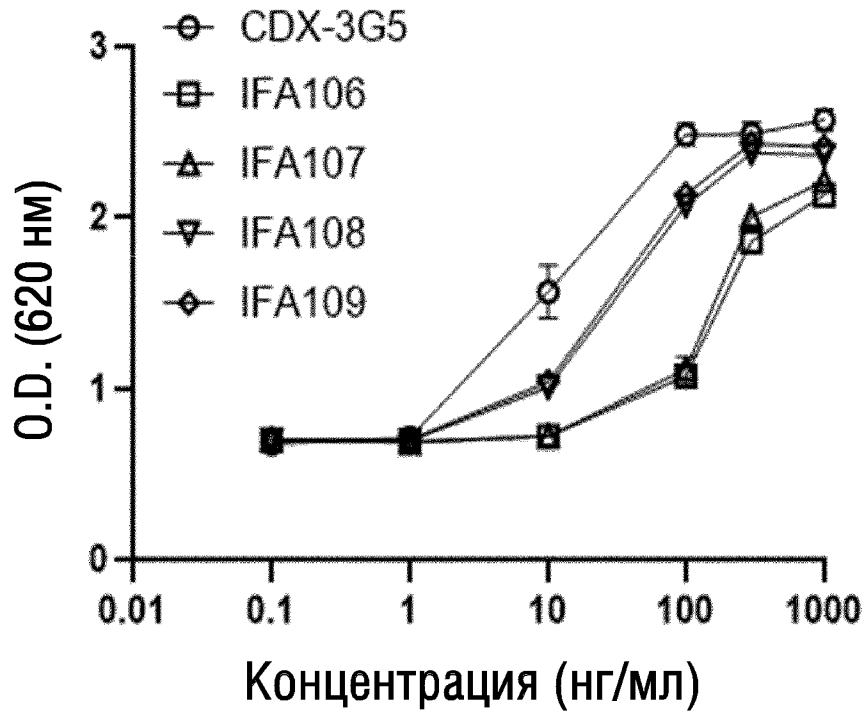
ФИГ.13H



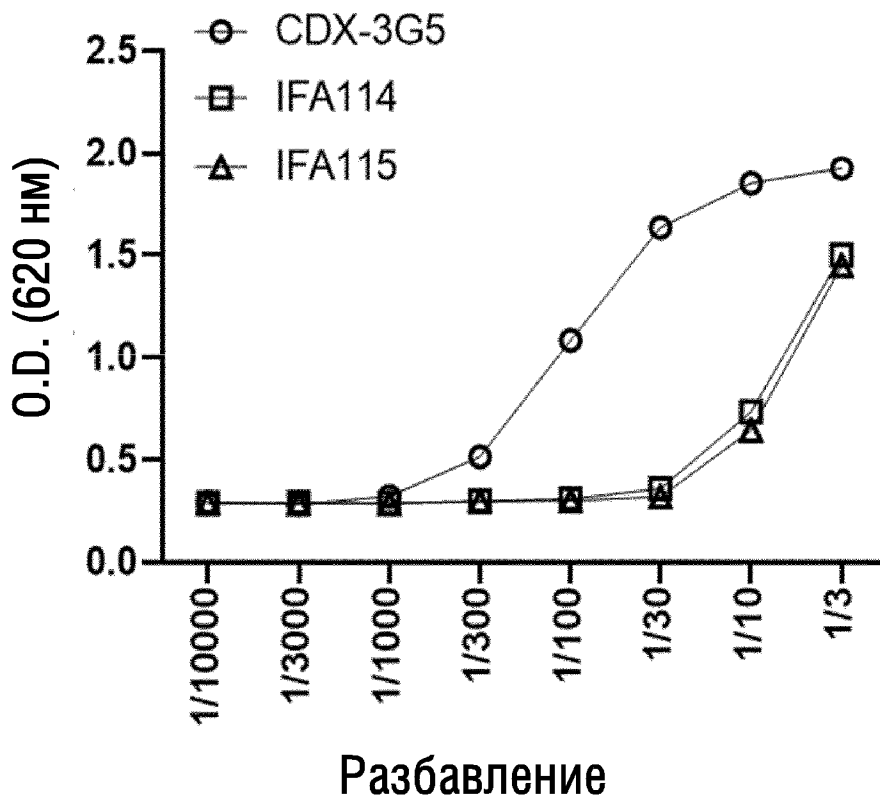
ФИГ.14



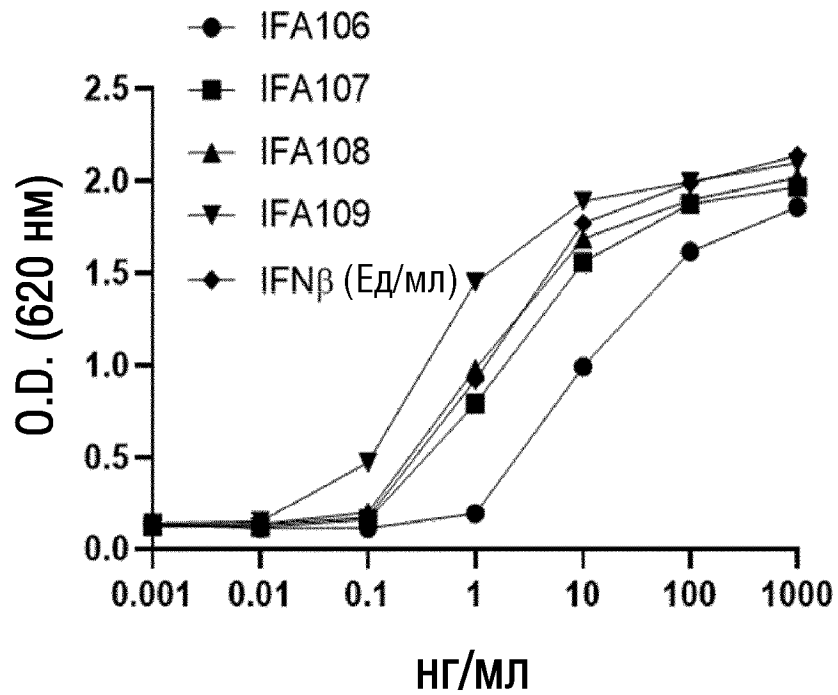
ФИГ.15А



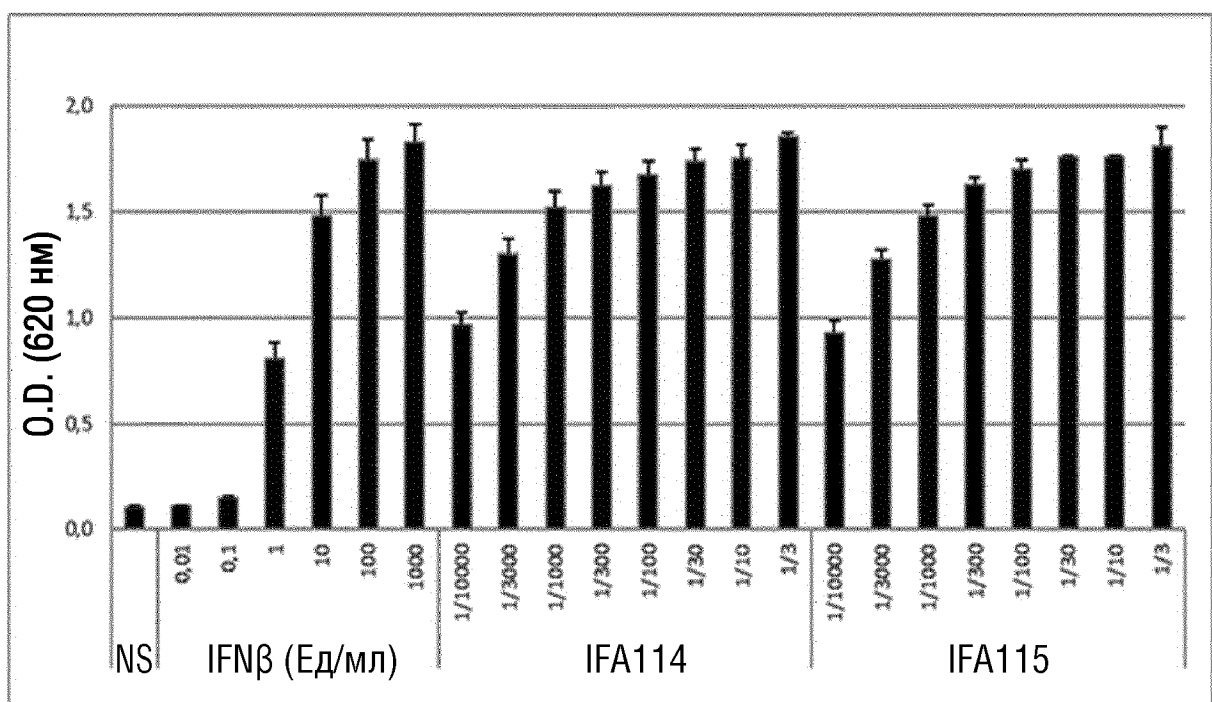
ФИГ.15В



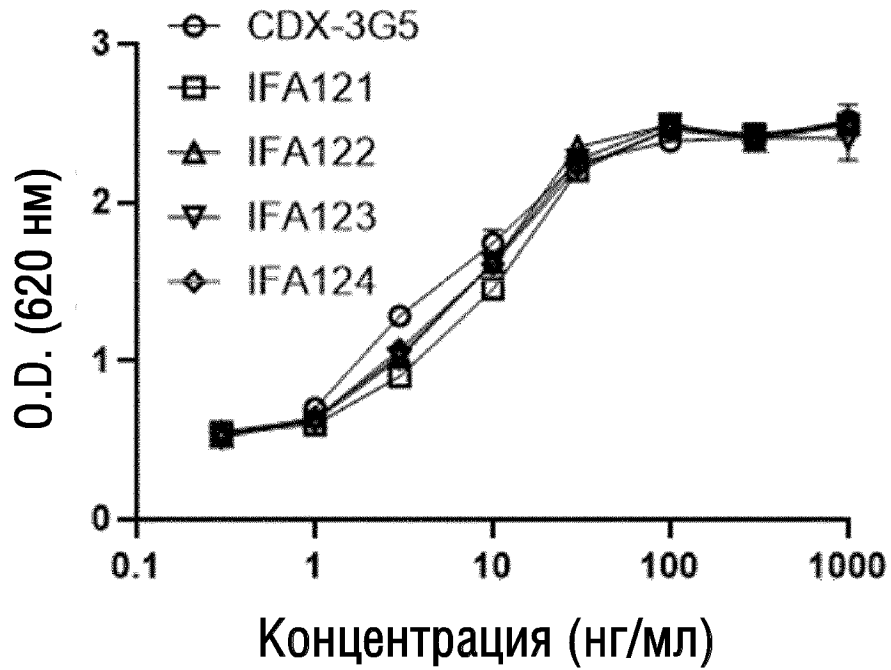
ФИГ.15С



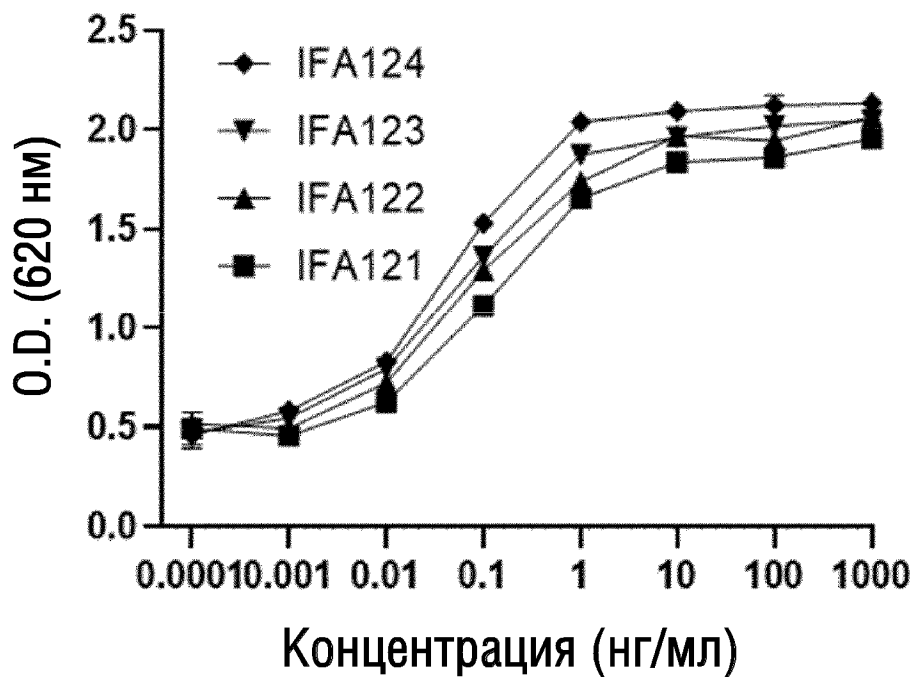
ФИГ.15D



ФИГ.16А

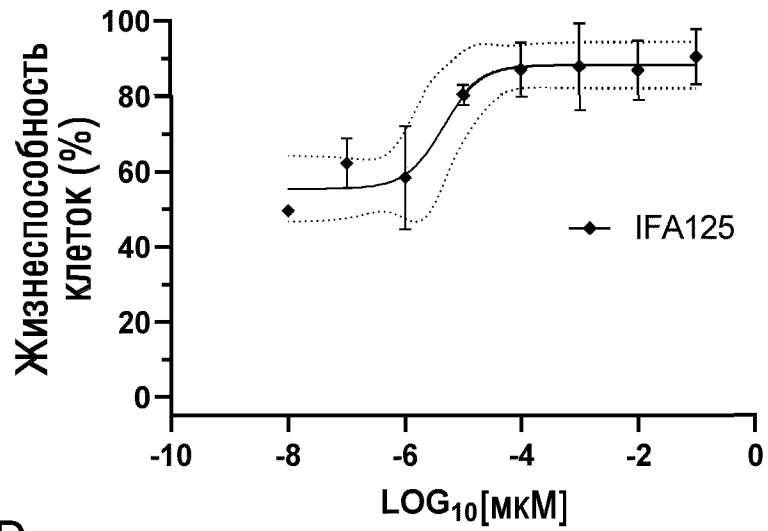


ФИГ.16В

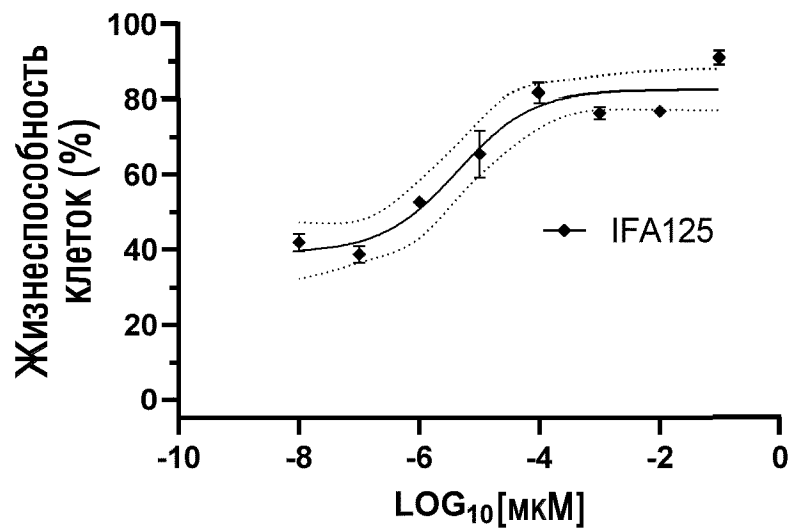




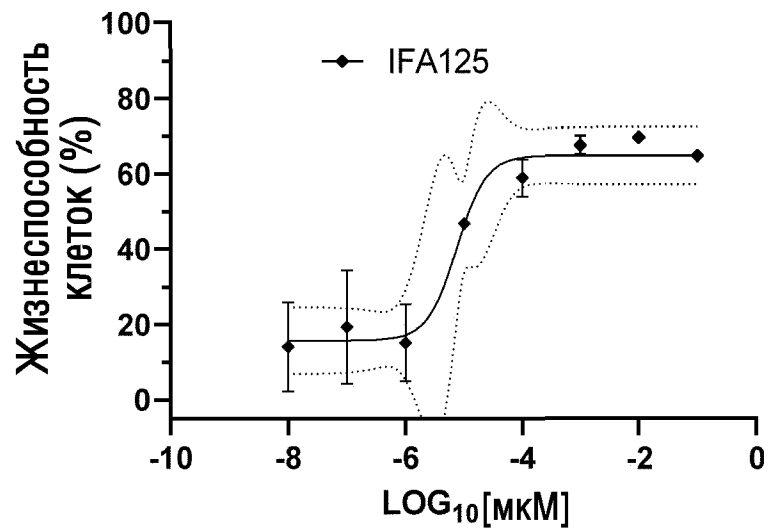
ФИГ.16С



ФИГ.16D



ФИГ.16Е



ФИГ.17

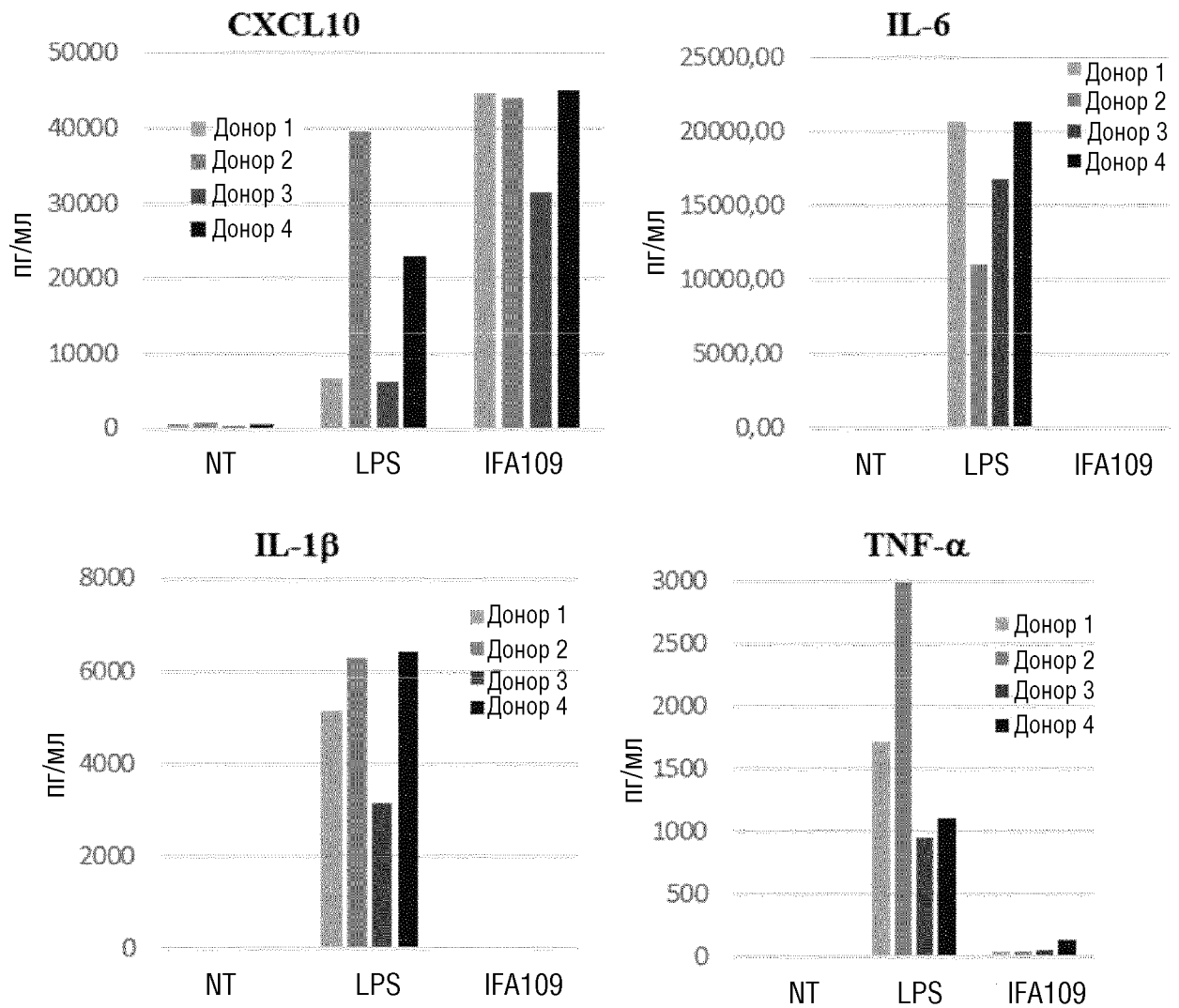


Таблица 13

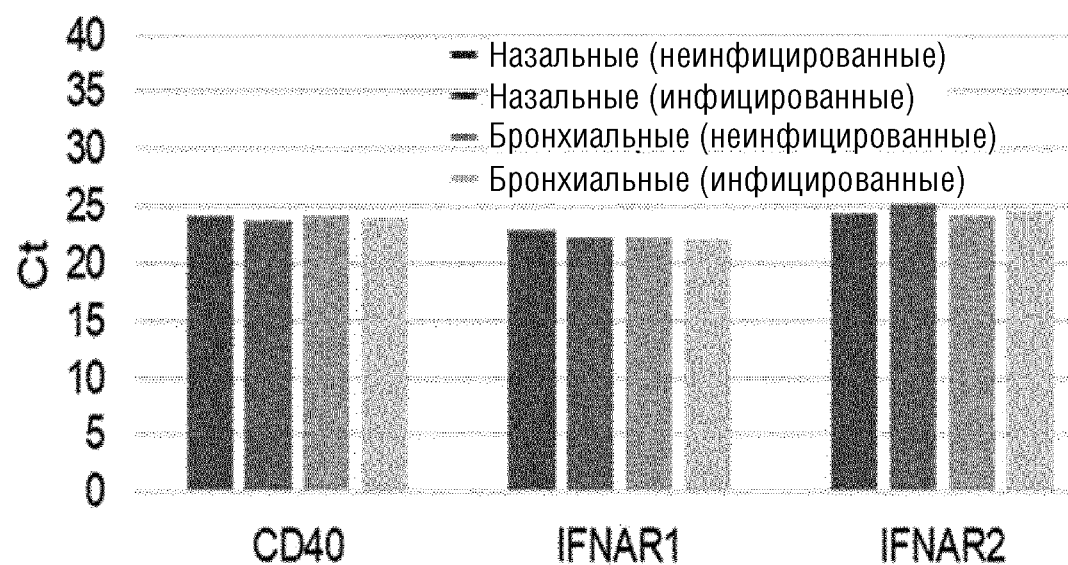
Условие	Донор	IFNg	IL10	IL12p40	IL1b	IL2	IL6	IP10	TFNa
NT	D1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	457,0	nd
	D2	nd	nd	101,4	nd	nd	nd	672,7	4,63
	D3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	302,3	nd
	D4	nd	nd	104,0	nd	nd	nd	648,2	nd
LPS	D1	2023	148	7757	5116	nd	20710	6647	1706
	D2	4676	57	6266	6264	21	11070	39539	2987
	D3	1537	193	1750	3138	nd	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

Таблица 14

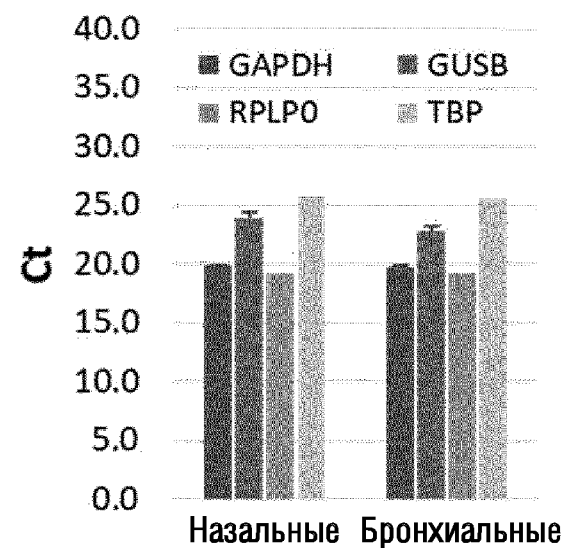
Вирусный материал (исходный материал, изоляты SARS-CoV2)	Линия	LogAbsolute EC50 (мкМ)	
		IFA25	Ремдесивир
USA-WA1/2020	A	-7.614	0.3491
Germany/BavPat1/2020	B	-5.611	-0.1478
USA-CA_CDC_5574-2020	B.1.1.7	-8.13	-0.008185
hCoV19_England_204820464_2020	B.1.1.7	-6.578	-0.01094
South Africa/KRISP-ECK005321/2020	B.1.351	-5.415	-0.4221
South Africa/KRISP-ECK005325/2020	B.1.351	-7.559	0.2079
hCoV-19/Japan/TY7-503/2021	P1	-4.634	-0.2945
hCoV-19/USA/PHC658/2021	B.1.617.2	-4.792	-0.2505
hCoV-19/USA/MD-HP20874/2021	B.1.1.529	-4.046	-0.1076

ФИГ.18А

### Экспрессия целевых генов

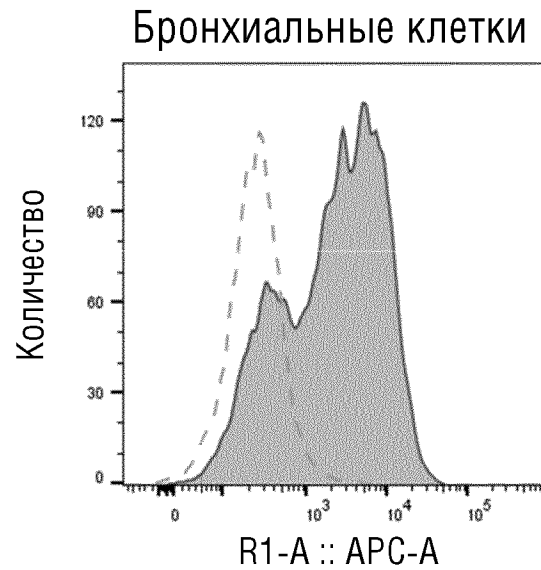
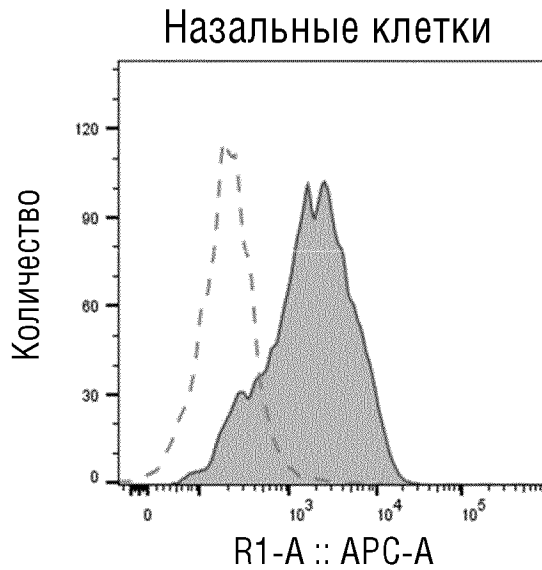


### Гены «домашнего хозяйства»

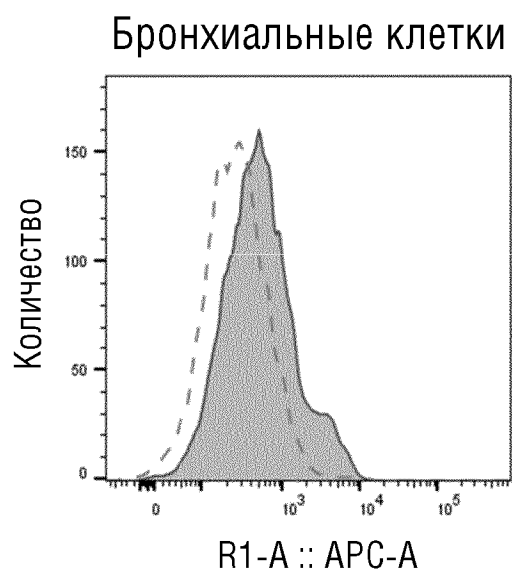
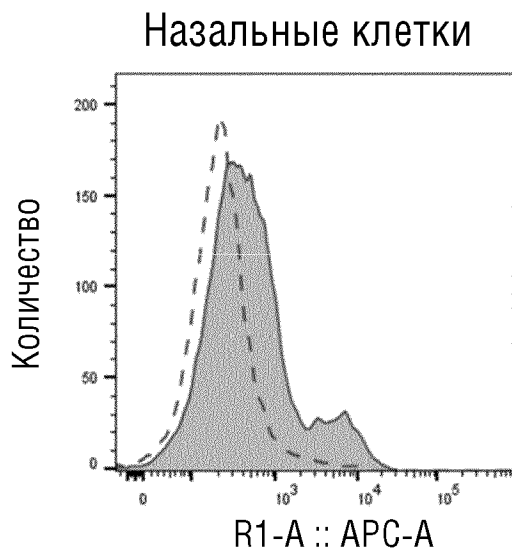


## ФИГ.18В

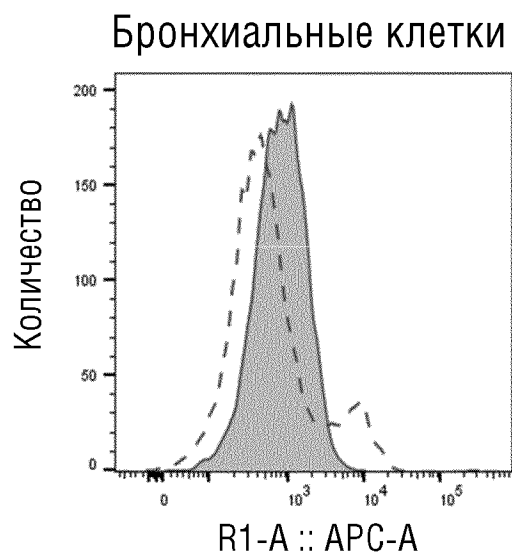
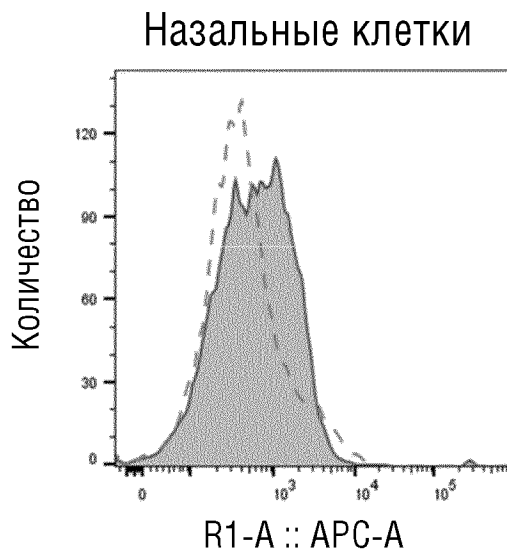
## Экспрессия CD40



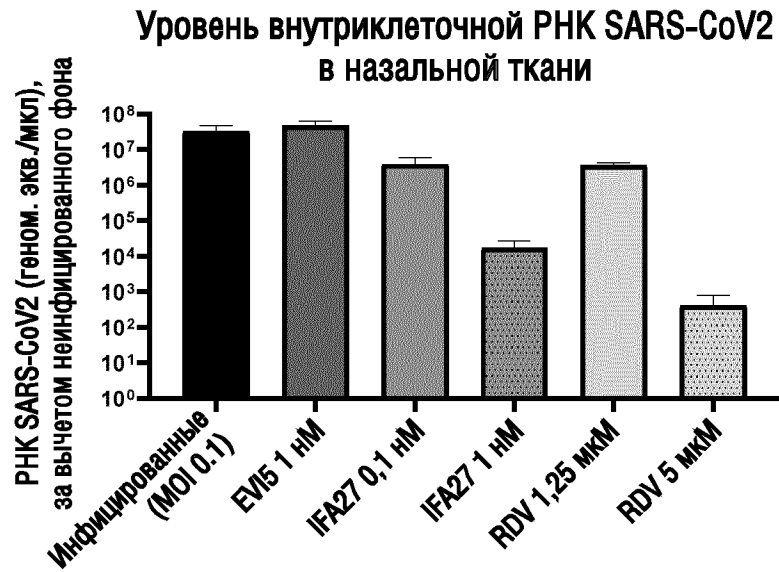
## Экспрессия IFNAR1



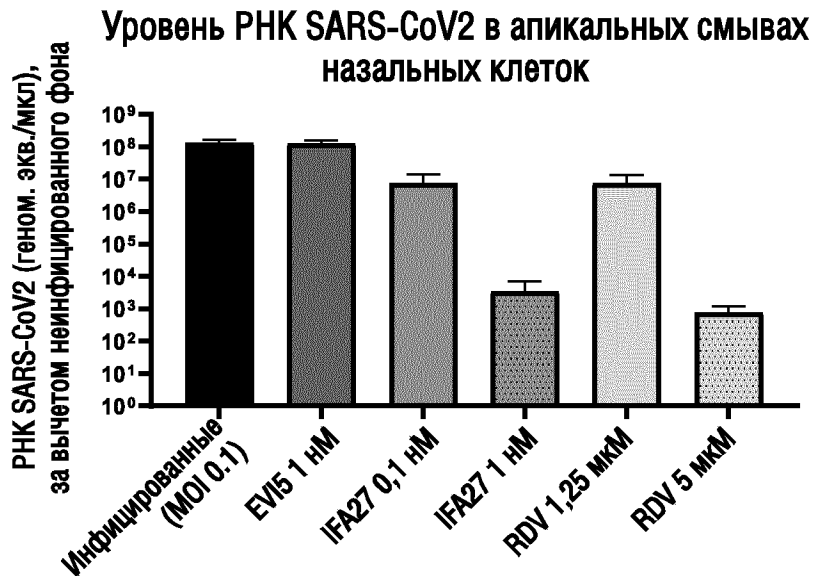
## Экспрессия IFNAR2



ФИГ.19А

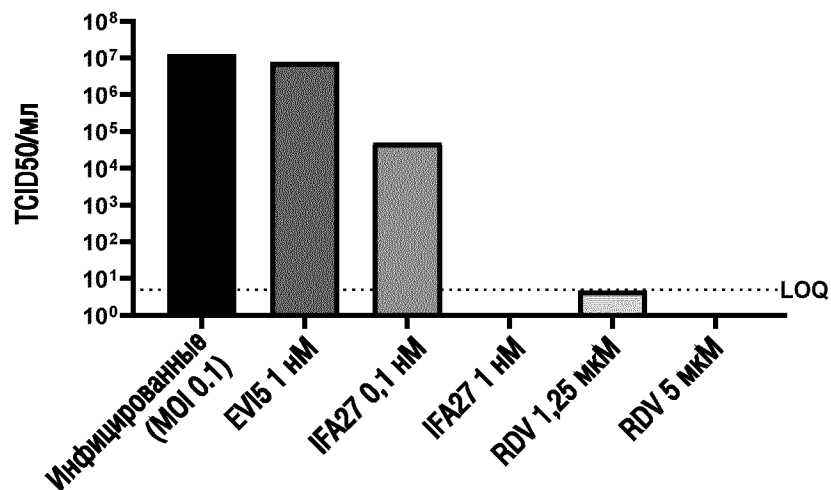


ФИГ.19В

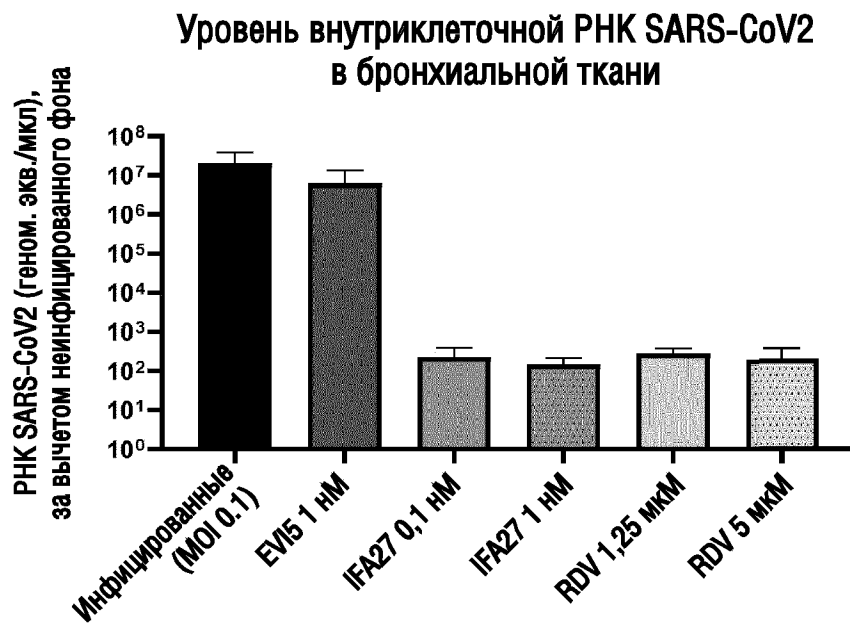


ФИГ.19С

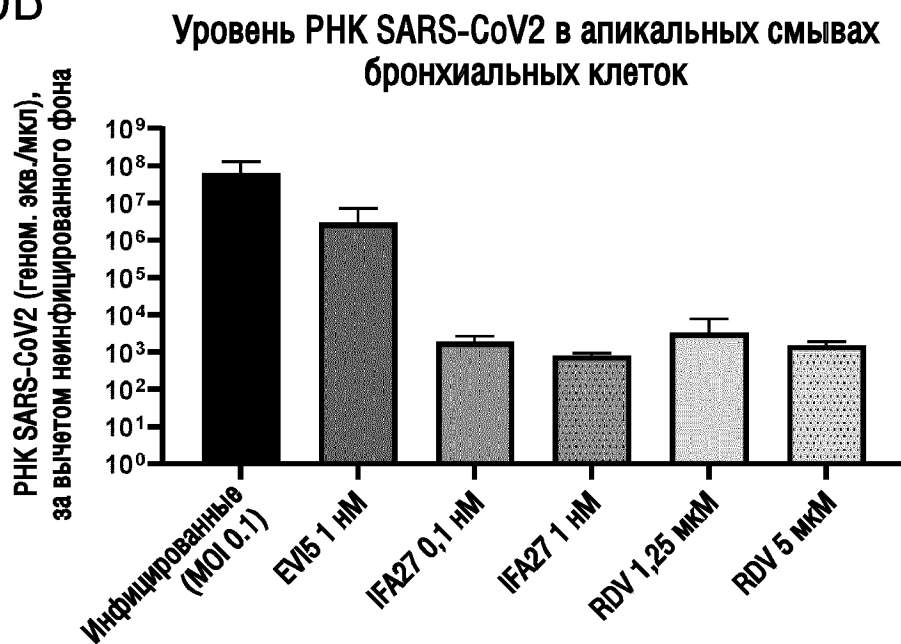
**Титрование (TCID<sub>50</sub>) SARS-CoV2 в апикальных смывах назальных клеток  
(повторы (3) пулов биологических образцов)**



ФИГ.20А

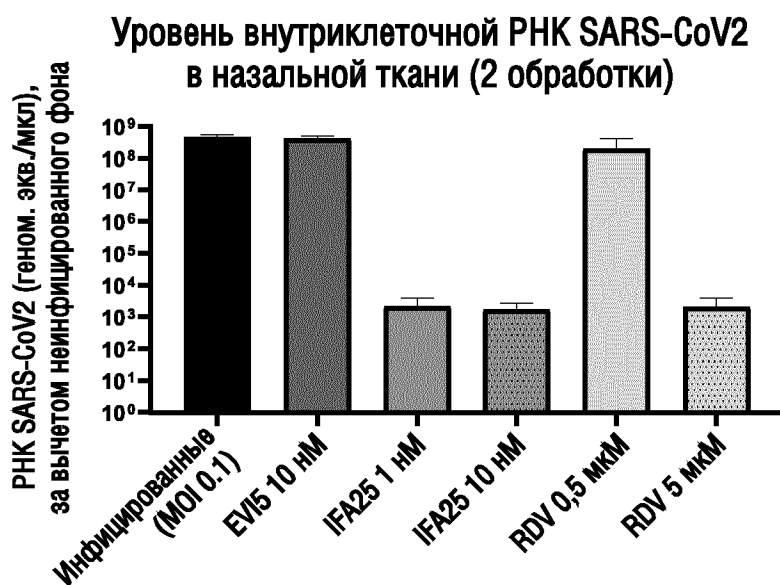


ФИГ.20В

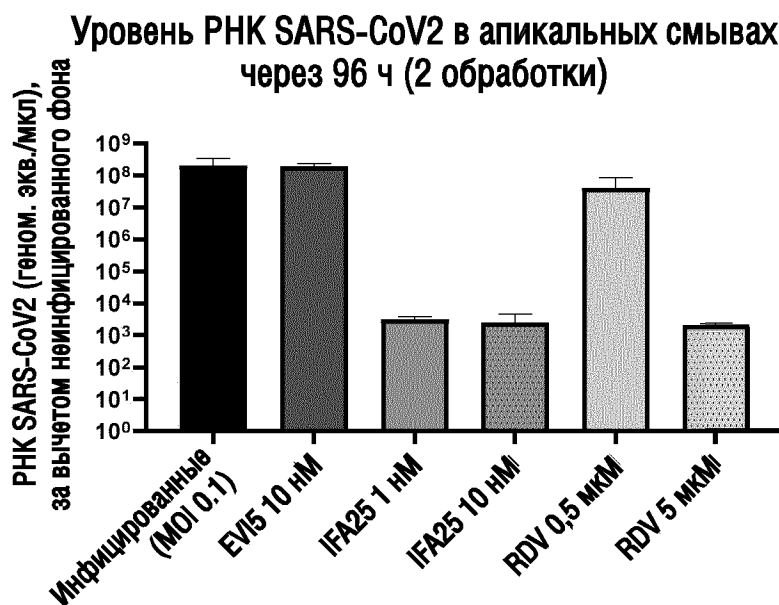




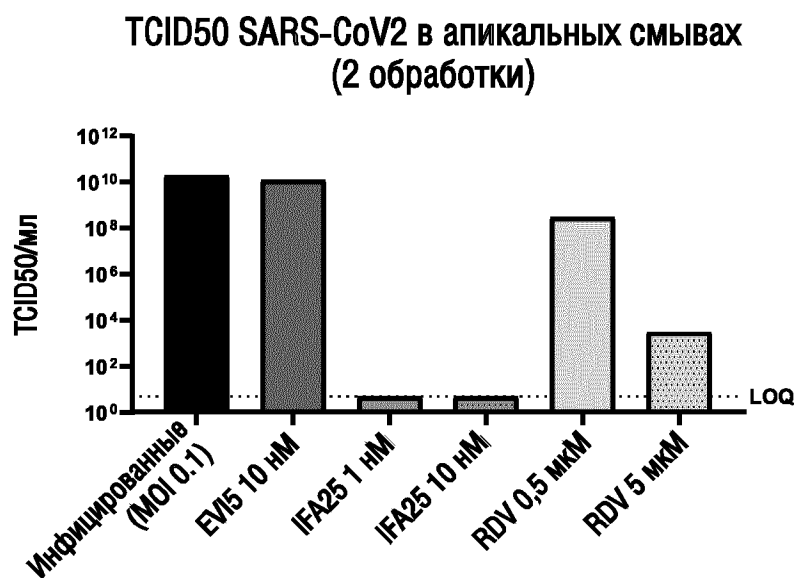
ФИГ.21А



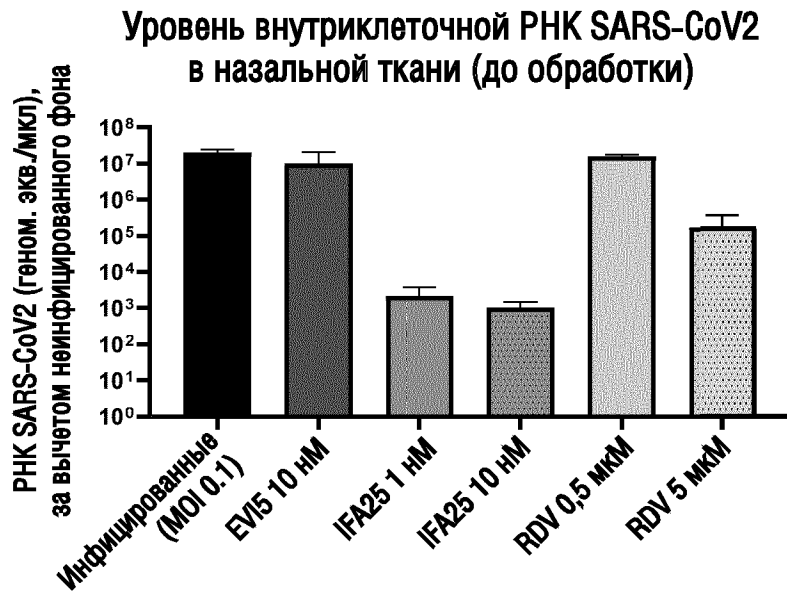
ФИГ.21В



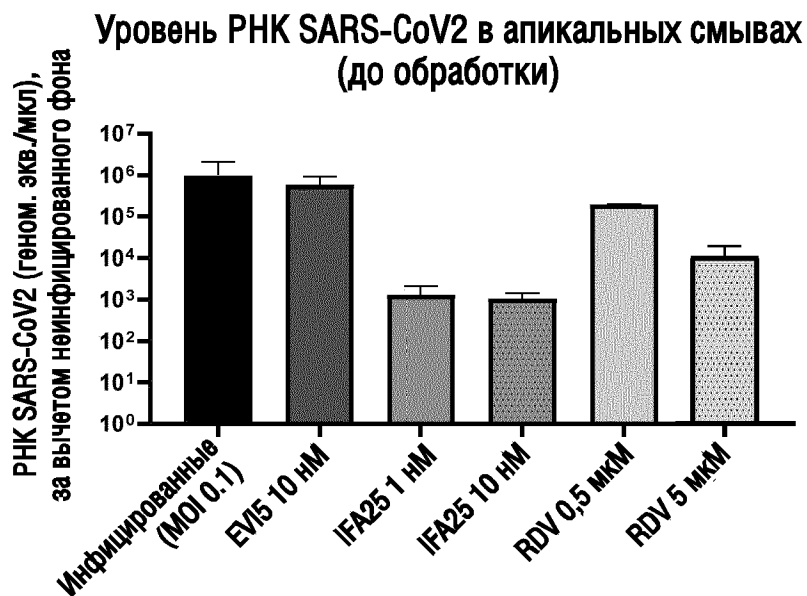
ФИГ.21С



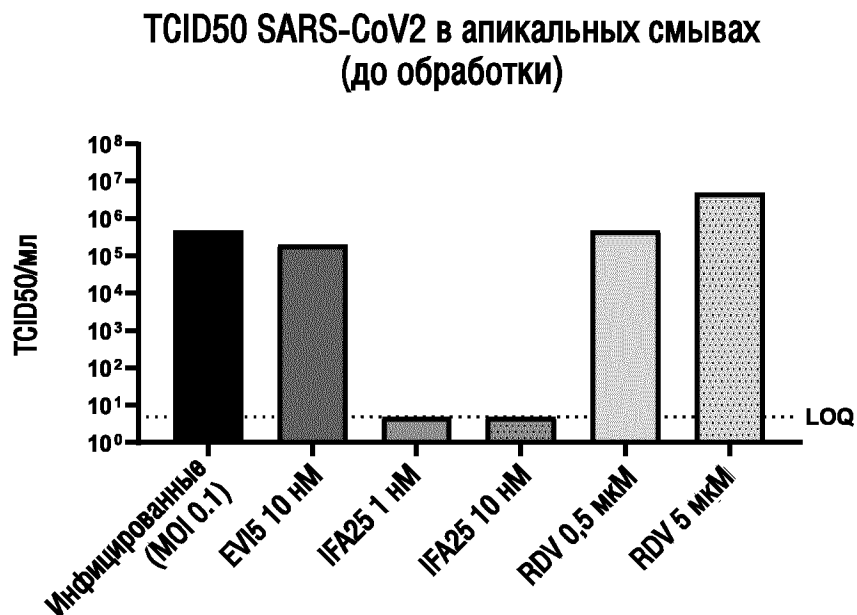
ФИГ.22А



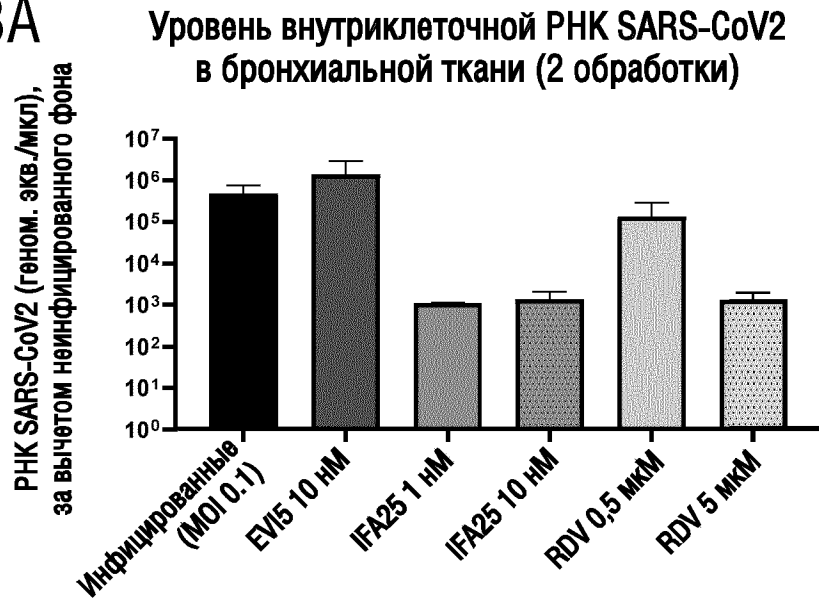
ФИГ.22В



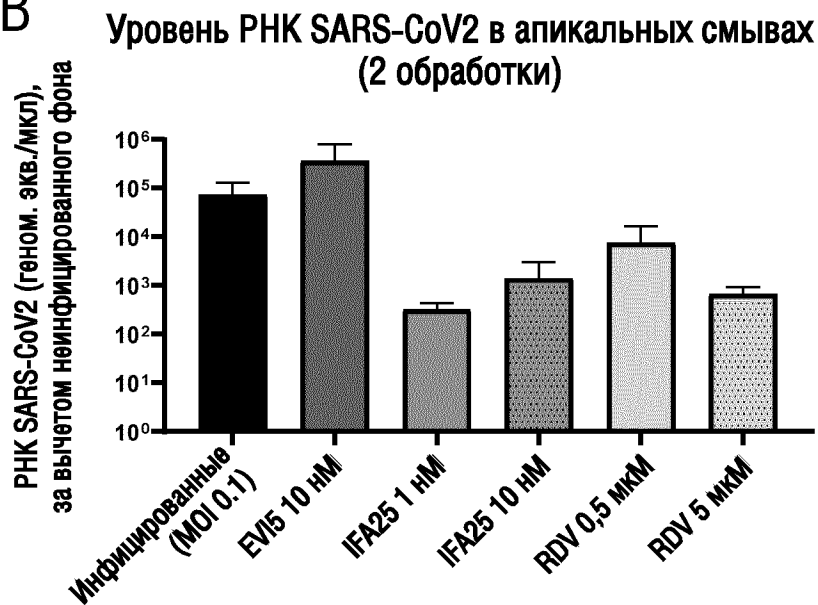
ФИГ.22С



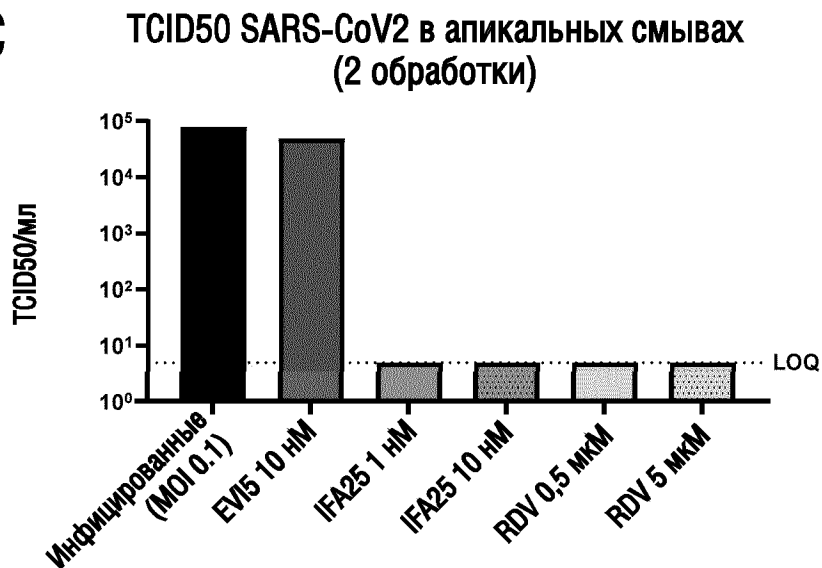
ФИГ.23А



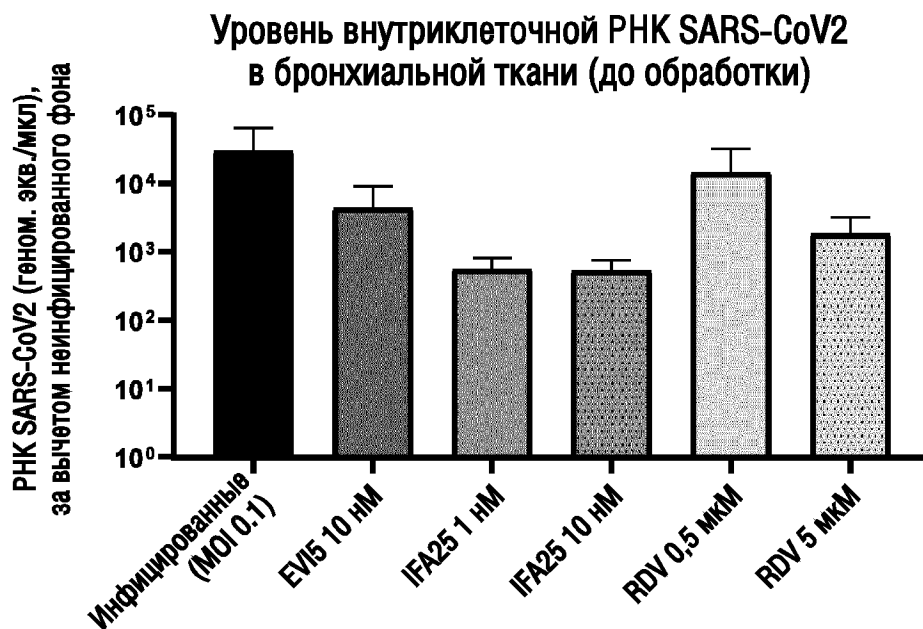
ФИГ.23В



ФИГ.23С



ФИГ.24А



ФИГ.24В

