

СЛИТНЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ И ЦИТОКИНОВ: ПОЛУЧЕНИЕ, ФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ОНКОЛОГИИ

УДК 616-006-097:576.8.097.3

Поступила 27.06.2013 г.



Е.Н. Кособокова, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории трансгенных препаратов;
В.С. Косоруков, к.б.н., зав. лабораторией трансгенных препаратов;
А.Ю. Барышников, д.м.н., профессор, директор НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, 115478, Каширское шоссе, 24

В медицине цитокины играют важную роль, являясь модуляторами иммунного ответа. Однако применение высоких доз биологически активных препаратов в онкологии сопровождается рядом нежелательных побочных эффектов, приводящих к прекращению лечения. Биологически направленная (таргетная) терапия позволяет увеличить эффективность использования цитокинов, а следовательно, снизить дозы препарата.

Достижения в генной инженерии и биотехнологии привели к росту числа новых — слитных — белков, полученных на основе антител. Такие гибриды могут сохранять свойства всех компонентов и приобретают преимущества по сравнению с отдельными белками. Например, моноклональные антитела, специфичные к определенному опухолевому антигену, связанные с цитокинами (МАт-Ц), обеспечивают накопление последних в микроокружении злокачественного образования, увеличение противоопухолевого эффекта антител и усиление иммунного ответа против опухоли. За последние двадцать лет созданы МАт-Ц с разной специфической направленностью к ряду опухолей. В экспериментах на животных было показано, что такие слитные белки, аккумулируясь в районе новообразования, способны вызывать значительный противоопухолевый ответ, который в ряде случаев приводит к полной элиминации опухоли. В обзоре суммируются данные по существующим моделям слитных белков на основе антител, технологиям их создания и перспективам применения в онкологии.

Ключевые слова: цитокины; антитела; слитные белки; противоопухолевые препараты.

English

Antibody-cytokine Fusion Proteins: Production, Functionality and Application Prospects in Oncology

E.N. Kosobokova, PhD, Senior Research Worker, the Laboratory of Transgenic Preparations;
V.S. Kosorukov, PhD, Head of the Laboratory of Transgenic Preparations;
A.Yu. Baryshnikov, D.Med.Sc., Professor, Director of Research Institute of Experimental Diagnostics and Tumor Therapy

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of Russian Academy of Medical Science, Kashirskoe shosse, 24, Moscow, Russian Federation, 115478

In medicine cytokines play an important role as the immune response modulators. However, biologically active drug application in high doses in oncology is followed by a number of unfavorable side effects resulting in treatment cessation. Target therapy enables to increase the efficiency of cytokine usage, and therefore, reduce the drug doses.

The achievements in genetic engineering and biotechnology led to a growing number of new antibody-cytokine fusion proteins. Such hybrids can have the properties of all components and acquire advantages compared to proteins alone. For example, monoclonal antibodies specific to a

Для контактов: Кособокова Екатерина Николаевна, тел. раб. 8(495)324-14-59, тел. моб. +7 903-590-05-91; e-mail: ekkos@mail.ru

particular tumor antigen being fused with cytokines (MAB-C) provide accumulation of cytokines in tumor microenvironment, increase antitumor effect of antibodies and enhancement of the immune response against a tumor. MAB-C with various specificity against a number of tumors have been created in the last twenty years. It was shown on animal models that such fusion proteins being accumulated around a tumor are capable to cause the considerable antitumor response, which in some cases results in complete tumor elimination. The present review describes data on existing models of antibody-cytokine fusion proteins, their technology and application prospects in oncology.

Key words: cytokines; antibodies; fusion proteins; antitumor drugs.

Цитокины — это медиаторы белковой природы, молекулы-посредники, участвующие в межклеточной передаче сигналов. Их основная роль — моделирование иммунного ответа. Связывание цитокинов со специфическими рецепторами на цитоплазматической мембране активирует механизм внутриклеточной передачи сигналов, обеспечивающий регулирование ряда генов, ответственных как за синтез самих модуляторов, так и за синтез других цитокинов, а также образование и появление на поверхности клеток цитокиновых рецепторов [1–3].

К настоящему времени открыто и описано более 100 различных цитокинов [4]. К ним относятся интерлейкины (ИЛ), интерфероны (ИФН), колониестимулирующие факторы (КСФ), факторы некроза опухоли (ФНО), факторы роста и хемокины. Эти медиаторы проявляют многообразную активность, которая частично пересекается. Цитокины редко образуются по отдельности и редко действуют поодиночке. Ответная реакция системы цитокинов носит сложный сетевой характер, при котором продукция одного из них влияет на образование или проявление активности ряда других [5–7].

Многие цитокины обладают прямой противоопухолевой активностью или являются медиаторами противоопухолевого иммунитета [8, 9]. Системная высокодозная цитокинотерапия часто сопровождается тяжелыми побочными эффектами, которые делают невозможным дальнейшее применение цитокинов в рекомендованной дозе [10–12]. Целенаправленное введение препарата в область злокачественного образования лишь частично решает проблему, так как концентрация цитокина в месте введения быстро снижается. Кроме того, часто локализация опухоли или микрометастаз делают невозможным проведение данной процедуры [13, 14].

Другой подход — использование генной терапии [15, 16]. В этом случае в организм вводится вектор, несущий ген, ответственный за синтез цитокина. Ожидаемым результатом является системный иммунный ответ, направленный против опухоли [17, 18]. Данный подход технически сложен, длительный и дорогой, что ограничивает его применение.

Специфичные к опухоли моноклональные антитела, генетически сшитые с цитокинами (МАТ-Ц), являются альтернативным способом накопления в области опухоли цитокинов в концентрации, достаточной для проявления значительного противоопухолевого эффекта без сопровождаемой системной токсичности. Влияние цитокинов может сказываться как на тех же клетках, с которыми связаны антитела, так и на соседних. Более того, благодаря связыванию с поверхностью клетки посредством антител слитные белки могут имитиро-

вать трансмембранную форму цитокина. Показано, что некоторые цитокины могут присутствовать как в растворенной форме, так и быть связанными с мембраной, функции их различаются. Эти эффекты описаны, например, для ФНО [19].

Помимо того, что антитела обеспечивают доставку цитокинов в область опухоли, они и сами могут использоваться в качестве противоопухолевых агентов, блокируя рецепторы на поверхности злокачественных клеток [20–24]. Около 50% всех антител на фармацевтическом рынке являются противоопухолевыми, а в 2013 г. ожидается появление еще около 10 новых препаратов, направленных на лечение разных типов опухолей [25].

В настоящее время разработаны и проходят испытания (на разных фазах) целый ряд МАТ-Ц, специфичных к разным опухолям и содержащих разные цитокины [26, 27]. В обзоре суммируются данные по существующим моделям слитных белков на основе антител, технологиям их создания и перспективам применения в онкологии.

Технология получения слитных белков

Выделяют пять классов иммуноглобулинов (антител) человека: IgG, IgA, IgM, IgD и IgE, которые различаются по размерам молекул, заряду, аминокислотному составу и содержанию углеводов. Вместе с тем существует значительная гетерогенность в пределах каждого класса. Основная структурная единица иммуноглобулина любого класса состоит из двух одинаковых легких и двух одинаковых тяжелых цепей, удерживаемых вместе дисульфидными связями (см. рисунок, а). Каждая легкая цепь состоит из одного переменного (V_L) и одного константного домена (C_L), в то время как тяжелая цепь — из одного переменного (V_H) и трех константных доменов (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}).

Переменные домены тяжелой и легкой цепи образуют переменный регион иммуноглобулинов (Fv), обеспечивающий специфическую связь с антигеном. При помощи протеазы папаина можно расщепить антитела на три фрагмента: два Fab (fragment antigen binding — антигенсвязывающий фрагмент) и один Fc (fragment crystallizable — фрагмент, способный к кристаллизации). Fab содержат всю легкую цепь, V_H -домен и C_{H1} , Fc — все остальные С-домены тяжелой цепи. Деление происходит по шарнирному участку (ШУ) — это особая часть полипептидной цепи, не входящая в состав доменов и генетически не родственная им.

Классическим методом получения моноклональных антител является гибридная технология [28, 29]. Идея состоит в том, что линию миеломных кле-

ток «сливают» с В-лимфоцитами, секретирующими специфические антитела после иммунизации мышей соответствующим антигеном. Полученные гибридные клетки (гибридомы) способны к неограниченному делению и синтезу целевых антител. Такие мышинные антитела проявляют противоопухолевый эффект, блокируя рецепторы на поверхности опухолевых клеток и нейтрализуя растворимые лиганды, а также индуцируя апоптоз [30]. Однако Fc-регион мышинных антител не способен в полной мере связываться с эффекторными клетками человека, что ограничивает их терапевтический потенциал. Кроме того, такой препарат иммуногенен и вызывает у пациентов ответ против мышинных антител с последующей их нейтрализацией и разрушением [31, 32].

Несмотря на значительные целенаправленные усилия, не удалось разработать адекватные подходы для получения гибридом на основе клеток человека. В настоящее время эта проблема решается с помощью молекулярно-генетических подходов [33]. Самым распространенным среди них является «гуманизация» мышинных антител. Суть метода состоит в создании слитных генетических комплексов, объединяющих V-ген мышинных моноклональных антител и C-гены иммуноглобулинов человека желаемого изотипа. Благодаря наличию человеческой константной области такие антитела обладают полным спектром биологических функций. Примером может служить ритуксимаб (Rituxan, MabThera) [34–36]. Ритуксимаб распознает антиген CD20 на поверхности нормальных и опухолевых В-клеток и индуцирует клеточно-опосредованную и комплементзависимую цитотоксичность и апоптоз этих опухолевых клеток. Еще более радикальный под-

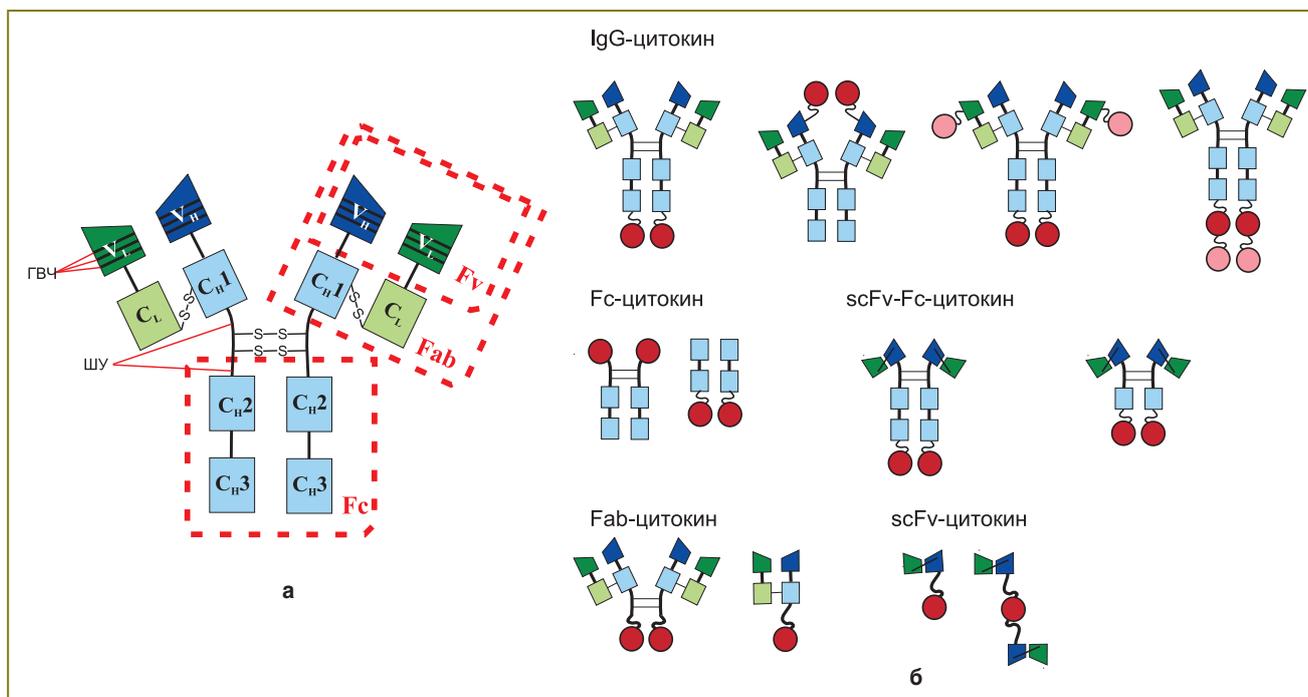
ход заключается в объединении гипервариабельных частей V-генов мыши с генами, кодирующими каркасную последовательность V-гена человека, и человеческими C-генами. У таких гуманизированных антител остается от мышей только гипервариабельный регион. Примером служит трастузумаб (Herceptin) — антитела, которые связываются с рецептором 2 эпидермального фактора роста человека (HER2). Препарат рекомендован для лечения рака молочной железы [37–39].

Для исключения иммуногенности необходимо получение полностью человеческих антител. С этой целью были созданы трансгенные мыши, у которых совокупность генов иммуноглобулинов заменили на человеческие (линии XenoMouse, Tc-mice). Такие мыши продуцируют человеческие поликлональные антитела [40–42].

Альтернативой полноценных антител являются мини-антитела, которые содержат две цепи одноцепочечного вариабельного региона антител (scFv), шарнирную область и C_H3-домен или C_H2–C_H3-домены [43–44]. В отличие от первых они характеризуются более высокой скоростью выведения (10 ч вместо 3–4 нед). Среди недостатков мини-антител — потеря части функций, в том числе клеточно-опосредованной цитотоксичности, играющей ключевую роль в противоопухолевом механизме действия антител [45].

Для получения человеческих антител может быть также использована технология фагового дисплея [46, 47]. Гены scFv клонируют в вектор фагового дисплея. Фрагмент scFv, экспрессируемый на поверхности бактериофага, обладает высокой степенью сродства с целевым антигеном.

За последнее десятилетие создан ряд МАТ–Ц различной структуры и функциональной значимости.



Схематическое изображение строения молекулы IgG (а) и примеры существующих слитных белков на основе антител или мини-антител (б). Описание см. в тексте

В основе этих рекомбинантных белков могут быть как целые антитела, так и их отдельные фрагменты (см. рисунок, б). Разнообразие слитных белков обеспечивается и используемыми цитокинами. Среди последних есть как мономерные белки, так и гомодимеры или гомотриммеры, более того, есть цитокины, образованные разными полипептидными цепями — гетеродимеры [4].

В настоящее время рекомбинантные МАТ–Ц представлены двумя основными формами: F(ab)₂/Ц, секретируемые клетками млекопитающих, и одноцепочечные FV/Ц (микроантитела), экспрессируемые *E. coli*. Первые представляют собой крупные молекулы размером 134–140 кДа, состоят из пары легких цепей и пары гибридных тяжелых цепей, каждая из которых включает переменный регион C_H1, шарнирную область и цитокин. Размер микроантител — 42–45 кДа, состоят они из одного переменного фрагмента тяжелой цепи, переменного региона легкой цепи и цитокина. В начале 90-х были получены МАТ–Ц, в которых цитокин связан с С-концом С3-домена тяжелой цепи. Исследования показали, что в большинстве случаев в такой молекуле сохраняются как функции антител (способность связывания с антигеном), так и функции цитокинов. Это свидетельствует о пригодности ДНК-технологии для создания бифункциональных белков.

Использование клеток млекопитающих в качестве экспрессионной системы для МАТ–Ц (например, культура клеток почки новорожденного хомячка) обеспечивает проведение посттрансляционных модификаций, характерных для человека, что увеличивает биологическую активность рекомбинантных иммуноглобулинов и стабильность комплекса *in vivo* [48].

Еще одним продуцентом полноценных антител, генетически слитых с цитокинами, могут стать растения с временной экспрессией рекомбинантных белков [49]. В настоящее время при помощи этой технологии получают аналог трастузумаба (Trastuzumab, Herceptin) [50].

Перспективы применения МАТ–Ц в онкологии

На фармацевтическом рынке нет МАТ–Ц, одобренных для применения в онкологической практике. Однако ряд препаратов проходят клинические испытания (на I–II фазе). Предварительные результаты свидетельствуют о серьезной перспективе использования рекомбинантных МАТ–Ц в качестве противоопухолевых препаратов. В связи с ростом количества комбинаций антител с цитокинами (табл. 1) невозможно охватить в одной статье все существующие варианты. Мы остановимся на наиболее разработанных и перспективных, в которых моноклональные антитела связаны с ИЛ-2, ИЛ-12, GM-CSF и ФНО.

МАТ–ИЛ-2. ИЛ-2 известен как иммуномодулятор клеточного и гуморального иммунитета с обширным терапевтическим потенциалом [51, 52]. Этот цитокин способен ингибировать рост опухоли, индуцируя апоптоз благодаря способности стимулировать макрофаги и NK-клетки и увеличивать экспрессию молекул комплекса гистосовместимости класса II [53]. E. Ortiz-Sanchez с

соавт. описали основные существующие МАТ–ИЛ-2 и их функциональную значимость [26]. Первые МАТ–ИЛ-2 появились в начале 90-х гг. Они представляли собой молекулу ИЛ-2, связанную с С-концом IgG3, специфичного к дансилу [54]. IgG3–ИЛ-2 обладал способностью стимулировать пролиферацию ИЛ-2-зависимых мышечных Т-клеток линии CTLL-2. Этот слитный белок проявлял большую аффинность (приблизительно в 4 раза), чем рекомбинантный ИЛ-2 человека, и был значительно более эффективен при активации LAK-клеток (lymphokine-activated killer). Кроме того, время полужизни IgG3–ИЛ-2 при внутривенном введении мышам составляло 7 ч, что дольше, чем при введении свободного ИЛ-2, но короче, чем при использовании одиночного IgG3.

Были сконструированы два МАТ–ИЛ-2, специфичные к Id-антигену, один из которых включает полноценный IgG1, второй — одноцепочечный фрагмент scFv IgG1 [55]. Исследователями было показано, что способность связываться с антигеном у scFv–ИЛ-2 в 30–40 раз ниже, чем у IgG1–ИЛ-2. Кроме того, scFv–ИЛ-2 в 20 раз быстрее выводится из организма, чем IgG1–ИЛ-2. И, наконец, у scFv–ИЛ-2 отсутствует Fc-регион, который необходим для индукции антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности и играет ключевую роль в противоопухолевой активности IgG1–ИЛ-2.

В 20–30% опухолей молочной железы и яичника наблюдается гиперэкспрессия рецептора HER2/neu (erbB2). Выше упоминалось о присутствии на фармацевтическом рынке препарата трастузумаб (Herceptin), который представляет собой моноклональные антитела к этому рецептору. Связываясь с HER2/neu, трастузумаб останавливает клеточный цикл в фазе G1, уменьшая пролиферацию опухолевых клеток. Был разработан анти-HER2/neu IgG3–ИЛ-2 [56]. Этот слитный белок сохраняет способность антител связываться с соответствующим рецептором и биологическую активность, аналогичную рекомбинантному ИЛ-2. Была изучена эффективность анти-HER2/neu IgG3–ИЛ-2 на клетках кишечной карциномы мышей, экспрессирующих HER2/neu человека. Применение этого МАТ–Ц вызвало значительное замедление роста опухоли, в то время как просто антитела (анти-HER2/neu IgG3) не оказывали какого-либо эффекта.

Другой МАТ–Ц, анти-erbB2 scFv-Fc–ИЛ-2, был сконструирован на основе C_H2–C_H3-доменов IgG1 человека, объединенных с мышинным scFv, специфичным к HER2/neu. Этот слитный белок также сохранял активность и антитела, и цитокина [56–58], что было подтверждено на Т-клетках линии CTLL-2, а также на мышах линии BALB/c с привитой карциномой яичника, клетки которой характеризуются высоким уровнем экспрессии HER2/neu. Внутривенное введение мышам белка scFv-Fc–ИЛ-2 приводило к снижению опухолевого роста.

Муцин-1 (MUC1) — трансмембранный белок, в норме экспрессируемый на поверхности клеток железистого эпителия. При карциномах наблюдается гиперэкспрессия этого белка на поверхности злокачественных клеток. Таким образом, MUC-1 может служить маркерным антигеном, а специфичные к нему антитела — исполь-

Таблица 1

Сводная таблица по существующим слитным белкам на основе цитокинов и антител к представленным в таблице антигенам

Цитокины	Антигены, специфичность															
	Лимфома	В зависимости от выбранного антитела	Рак молочной железы, яичников, толстой кишки	Рак яичников	Лимфома Ходжкина	Рак молочной железы, неходжкинская лимфома, хронический лимфолейкоз	Меланома, нейробластома, глиобластома, мелкоклеточная карцинома легких	Карциномы (в т.ч. простаты), рак молочной железы, рак яичников, рак толстой кишки	Опухоли желудочно-кишечного тракта, карцинома желчного протока	Ревматоидные артриты	Тератокарцинома, рак толстой кишки, простаты, рак кожи	Рак молочной железы, колоректальный рак и карцинома легкого	Неходжкинская лимфома, хронический лимфолейкоз	Глиома, рак толстой кишки, поджелудочной железы, нейробластома и др.	Аденокарцинома (эпителиальные железистые клетки), рак молочной железы	
	DNC	Id	HER2/neu	TAG-72	CD30	hMHC II	GD2	EpCAM	CEA	ED-A	ED-B	FAP	CD20	TfR	MUC-1	
ИЛ-2	+	+	+		+	+	+!!	+					+		+	
ИЛ-6		+														
ИЛ-7											+					
ИЛ-10											+	+				
ИЛ-12			+		+			+	+		+					
ИЛ-15							+				+	+				
ИЛ-17																
ИФН-α			+								+		+			
ИФН-γ				+								+				
ГМ-КСФ		+	+			+	+!	+			+			+		
TRAIL			+					+								
ФНО		+	+	+					+		+	+				
FasL													+	+		

Здесь: ГМ-КСФ — гранулоцитарный макрофагальный КСФ; TRAIL — апоптоз-индуцируемый лиганд ФНО; FasL — лиганд для мембранной молекулы Fas; DNC — дансил хлорид (5-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлорид); Id — идиотипичные антитела, аналоги или имитаторы антигена; EpCAM — молекула адгезии эпителиальных клеток; CEA — онкофетальный антиген; TfR — рецептор трансферина; ED-B, ED-A — изоформы фибронектина; FAP — белок активации стромального фибробласта; ! — фаза I клинических испытаний; !! — фаза II клинических испытаний.

зоваться для таргетной доставки целевого цитокина в микроокружение опухоли. С этой целью scFv мышиных антител, специфичных к MUC-1, был генетически слит с N-концом шарнирной области Fc-региона IgG1 человека, а к C-концу Fc-региона был присоединен ИЛ-2. Полученный слитный белок сохранял способность связываться с MUC-1, экспрессируемым клетками аденокарциномы молочной железы человека, а также биологическую активность ИЛ-2, выражающуюся в способности индуцировать пролиферацию CD25⁺-лимфоцитов и активировать NK-клетки [59].

При лимфоме Ходжкина на поверхности злокачественных клеток секретируется повышенное количество CD30, антитела к которому также использовались при создании слитных белков для доставки ИЛ-2. Рекомбинантный анти-CD30 МАт–ИЛ-2 был получен на основе scFv-региона моноклонального антитела против CD30, N-конец которого был слит с шарнирной областью IgG1, связанной C-концом с ИЛ-2. Анти-CD30 МАт–ИЛ-2 был бифункционален, активировал Т- и NK-клетки, индуцировал выработку ИФН-γ *in vivo*. В экспериментах *in*

in vivo было подтверждено предположение о возможном использовании данного слитного белка в специфической иммунотерапии при лимфоме Ходжкина [60].

Характерным маркером неходжкинской лимфомы является CD20. Слитные анти-CD20 МАт–Ц представляли собой полноценные гуманизированные мышиные моноклональные антитела, генетически связанные с ИЛ-2. В экспериментах анти-CD20 МАт–ИЛ-2 индуцировали апоптоз CD20⁺ клеток Дауди (линия клеток лимфомы человека) и сохраняли способность связываться со специфичным рецептором и проявлять антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность. Полученный слитный белок индуцировал противоопухолевый иммунный ответ в экспериментах на мышах линии SCID, которым внутривенно вводили клетки линии лимфомы человека Daudi Burkitt CD20⁺, имитируя диссеминированную лимфому [61].

МАт–ИЛ-12. Ил-12 представляет собой гетеродимерный белок с молекулярной массой 75 кДа [62]. Основными его продуцентами являются моноциты, макрофаги, а также дендритные клетки, нейтрофилы и

лимфоциты. ИЛ-12 активирует пролиферацию и цитотоксическую активность Т- и NK-клеток. Основным эффектом — стимуляция продукции ИФН- γ , который может затормаживать опухолевый рост и повышать экспрессию генов МНС класса I. Помимо этого, ИЛ-12 обладает антиангиогенной активностью за счет регуляции работы ИФН- γ -зависимых белков IP10 и MIG (monokine induced by IFN- γ). Эти цитокины ингибируют хемотаксис эндотелиальных клеток и блокируют их дифференцировку [63].

ИЛ-12 проявлял потенциальную противоопухолевую активность на различных моделях животных, а также использовался для лечения вирусных и бактериальных инфекций [64]. Однако в клинических исследованиях активность препарата была невысокой, наблюдались серьезные побочные эффекты [65, 66].

Исследования *in vivo* продемонстрировали, что слитный МАт-Ц(ИЛ-12) против HER2/neu сохраняет функции Ил-12 (гепаринсвязывающая активность, способность индуцировать секрецию ИФН- γ) [26] и IgG (способность связываться с антигеном человека HER2/neu) [67]. Показано также, что длительное введение мышам препарата анти-HER2/neu МАт-ИЛ-12 вызывает долговременный системный иммунный ответ, распространяющийся и на другие антигены [68].

С целью изучения антиангиогенной активности МАт-ИЛ-12 были созданы слитные белки против ED-B-домена фибронектина человека (маркер ангиогенеза, который секретируется опухолевыми и эндотелиальными клетками). *In vitro* продемонстрировано, что полученный рекомбинантный продукт проявляет биологическую активность ИЛ-12 и специфичность антител. Показана способность анти-ED-B МАт-ИЛ-12 замедлять опухолевый рост *in vivo* на мышинных моделях (карцинома толстой кишки и тератокарцинома). Кроме того, рекомбинантный белок локализовался в микроокружении опухоли раньше, чем ИЛ-12. При этом не проявлялись побочные эффекты [69].

Сравнение действия анти-HER2/neu МАт-ИЛ-12 с комбинированным введением анти-HER2/neu МАт и ИЛ-12, а также с монотерапией ИЛ-12 подтвердило значимость физического объединения антител с цитокином для увеличения противоопухолевой активности. Исследователи связывают это с размещением цитокина в экстрацеллюлярном матриксе микроокружения опухоли [70].

Получены также слитные белки против антигенов CD30 и СЕА (см. табл. 1). *In vitro* показано, что они сохраняют и функцию цитокина (способность индуцировать секрецию ИФН- γ Т- и NK-клетками), и функцию антитела (способность связываться с антигеном) [71, 72]. AS1409 — слитный белок, основанный на гуманизированных антителах, специфичных фибронектину и связанных с ИЛ-12. Первые клинические испытания этого препарата свидетельствуют о безопасности подхода. В ходе исследования установлена максимальная переносимая доза и продемонстрирована эффективность против метастатической меланомы [73].

МАт-ГМ-КСФ. ГМ-КСФ относится к группе гликопротеинов, регулирующих пролиферацию и дифференци-

ровку гемопоэтических клеток [74]. Основной областью применения этого цитокина является профилактика нейтропении и нейтропенических осложнений у больных с серьезным снижением нейтрофилов крови после цитостатической химиотерапии в связи с различными опухолевыми заболеваниями [75, 76]. Кроме того, ГМ-КСФ регулирует экспрессию генов МНС класса II и антигенпрезентирующую способность АПК (антигенпрезентирующие клетки). Широкий спектр действия делает этот цитокин потенциальным препаратом для адъювантной противоопухолевой иммунотерапии [77].

Системное введение препаратов ГМ-КСФ сопровождается рядом побочных действий: лихорадкой, ознобом, болью в мышцах, потерей аппетита, сонливостью и болью в костях [78, 79]. С целью снижения негативных эффектов и увеличения противоопухолевой активности ГМ-КСФ был генетически связан с антителами против различных опухолевых антигенов (см. табл. 1).

Трансферрин (TfR) — гликопротеин, выполняющий функцию переноса ионов железа, необходимых для клеточной пролиферации. Гиперэкспрессия рецептора к этому белку наблюдается на некоторых типах злокачественных клеток. На мышинной модели было показано, что ГМ-КСФ, слитый с антителами против TfR, демонстрирует противоопухолевую активность, заключающуюся в уменьшении роста мышинной метастатической нейробластомы печени (NXS2) и легочных метастазов мышинной карциномы толстой кишки (СТ26). Данные свидетельствуют о возможном использовании аналогичного слитного белка для лечения пациентов со злокачественными новообразованиями, характеризующимися гиперэкспрессией TfR [80].

Получены химерные (человек/мышь) антиганглиозидные GD2-антитела. Этот слитный белок проявлял антигензависимую клеточно-ассоциированную цитотоксичность и комплементзависимую цитотоксичность в экспериментах на клетках нейробластомы NMB7 и мононуклеарных клетках, выделенных из тех же пациентов. *In vivo* показано, что анти-GD2-ГМ-КСФ характеризуется более сильной адгезивной и дегранулирующей способностью в сравнении с антителами или цитокинами по отдельности. Препараты на основе анти-GD2-ГМ-КСФ и анти-GD2-ИЛ-2 в настоящее время проходят клинические испытания [81, 82].

В другой работе изучена биологическая активность анти-МНС II-ГМ-КСФ. Этот слитный белок проявлял свойства как цитокина (способность индуцировать образование гемопоэтических клеток-предшественников из мононуклеарных клеток костного мозга), так и антитела (способность связываться с опухолевыми клетками, экспрессирующими МНС класса II). Исследования биораспределения на мышинной ксенографтной модели подтвердили способность этого слитного белка специфично избирать злокачественные В-клетки человека [83].

Бифункциональность слитных МАт-Ц продемонстрирована также на анти-ED-B-ГМ-КСФ. Этот слитный белок проявлял высокую степень опухолевой специфичности и способность значительно снижать опухолевый рост в экспериментах на мышах 129SvEv с привитой

тератокарциномой F9 и аденокарциномой толстой кишки C51. Кроме того, на тех же моделях показан антима-тастатический эффект [84].

С целью тщательного изучения биологической активности, эффектов и механизма действия МАТ–Ц были получены мышинные анти-HER2/neu–ГМ-КСФ [85]. Слитный белок сохранял свойства цитокина, а именно способность стимулировать рост миелоидных клеток линии ABC-31, а также активировать мышинные макрофагальные клетки J774.2 и увеличивать антитело-зависимый цитокиноопосредованный лизис опухолевых клеток. С другой стороны, анти-HER2/neu–ГМ-КСФ связывается с мышинными клетками опухолевыми клетками СТ26, экспрессирующими на своей поверхности рецепторы HER2/neu, и усиливает анти-HER2/neu иммунный ответ. Важен тот факт, что этот слитный белок вызывает значительное замедление опухолевого роста на тех моделях, где использование только антител не обеспечивает защиты. Такие результаты еще раз подтверждают потенциальную значимость анти-HER2/neu–ГМ-КСФ для лечения пациентов с HER2/neu-положительными опухолями.

МАТ–ФНО. Фактор некроза опухоли — внеклеточный многофункциональный цитокин, продуцируемый в основном моноцитами и макрофагами [86, 87]. ФНО индуцирует апоптоз эндотелиальных клеток в новообразованных кровеносных сосудах, способствуя проникновению препаратов в опухолевую массу и вызывая геморрагический некроз опухоли [88]. Однако системное введение этого белка строго ограничено высокой токсичностью, выражающейся в синдроме, подобном септическому шоку, приводящему к полиорганной недостаточности.

С целью снижения терапевтической дозы высокоактивного белка был создан слитный белок L19–ФНО, который должен обеспечивать целевую доставку ФНО на кровеносные сосуды опухоли [89]. L19–ФНО представляет собой антитела L19 против В-домена фибронектина, связанные с ФНО. В предклинических исследованиях на животных продемонстрирована бифункциональность L19–ФНО. В клинических исследованиях фазы I–II проведен подбор безопасных терапевтических доз препарата. Показано, что негематологическая токсичность в таких дозах очень низкая, но в редких случаях регистрировалась серьезная миелосупрессия [90, 91].

Заключение

Суммируя описанную информацию, можно обозначить основные преимущества применения слитных белков на основе антител и цитокинов.

1. Рекомбинантный слитный белок быстрее, чем просто цитокин, оказывается в микроокружении опухоли. Присутствие цитокиновых рецепторов на разных нормальных клетках обеспечивает конкуренцию за связывание молекулы слитного белка, что влияет на степень накопления МАТ–Ц в области злокачественного образования. Тем не менее экспериментально на моделях животных и в клинике показано, что концентрация МАТ–Ц в области опухоли выше, чем при системном введении свободных антител. Концентрируясь в основном в области злокачественного образования, МАТ–Ц оказывают значительно меньший токсический эффект на нормальные органы и ткани. Благодаря связи со специфическим антигеном происходит увеличение времени выведения цитокина из организма и наблюдается пролонгация терапевтического эффекта.

2. Противоопухолевая активность слитного белка выше, чем комбинирования антитела с цитокином и цитокина в монотерапии (ИЛ-12). По всей вероятности, физическое соединение двух биологически активных белков обеспечивает «правильное» пространственное размещение цитокина в экстрацеллюлярном матриксе микроокружения опухоли [70]. Приведенные данные свидетельствуют о возможности снижения эффективной дозы и частоты введения препарата в сравнении с монотерапией цитокинами.

В настоящее время исследуются упрощенные варианты слитных белков на основе неполных антител, которые могут облегчить технологию получения препарата. Однако они имеют ряд недостатков:

- более низкую способность связываться с антигеном;
- более быстрое выведение из организма;
- неполный набор функций антитела (например, Fc-регион обеспечивает индукцию антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксической активности).

За последнее десятилетие созданы и проходят испытания МАТ–Ц разнообразной функциональной направленности. Одним из направлений стало получение антител, слитых с двумя разными цитокинами — дицитоклиновые слитные белки (табл. 2). Источником идеи стали работы по комбинации нескольких цитокинов,

Таблица 2

Дидитоклиновые слитные белки

МАТ–Ц1Ц2	Целевой антиген	Опухоль, на которую нацелено действие слитного белка	Статус	Литература
Анти-ЕрСАМ–мГМ-КСФ/ИЛ-2	ЕрСАМ	Рак толстой кишки	На модели животных	[97]
Анти-ЕрСАМ–чГМ-КСФ/ИЛ-2	ЕрСАМ	Рак желудка	<i>In vitro</i>	[98]
Анти-HER2/neu–ИЛ-12–IgG3–ИЛ-2	HER2/neu	Рак молочной железы и толстой кишки	На модели животных	[68, 99]
Анти-HER2/neu–ИЛ-12–IgG3–ГМ-КСФ	HER2/neu	Рак молочной железы и толстой кишки	На модели животных	[68, 99]
ИЛ-12–L19–ФНО–α	ED-B	Тератокарцинома	На модели животных	[100]
KS–ИЛ-12/ИЛ-2	ЕрСАМ	Карцинома легкого Льюис	На модели животных	[101]
Анти-CD30–ИЛ-12/ИЛ-2	CD30	Лимфома Ходжкина	На модели животных	[102]

которые свидетельствуют о значительном увеличении противоопухолевой активности [92–96].

Генная инженерия позволила получать рекомбинантные антитела при помощи разных экспрессионных систем — от бактерий до клеток млекопитающих. Усиленно развивается направление получения слитных белков из растений с временной экспрессией. Идет поиск комбинированных молекул с целью усиления терапевтического эффекта. Лишь небольшое количество МАТ–Ц проходят клинические испытания, но их появление на фармацевтическом рынке — это лишь вопрос времени.

Финансирование исследования и конфликт интересов. Исследование не финансировалось какими-либо источниками, и конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература

- Miyajima A., Kitamura T., Harada N., Yokota T., Arai K. Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 295–331.
- Cohen M.C., Cohen S. Cytokine function: a study in biologic diversity. *Am J Clin Pathol* 1996 May; 105(5): 589–598.
- Curfs J.H., Meis J.F., Hoogkamp-Korstanje J.A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev* 1997 Oct; 10(4): 742–780.
- Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. М: Фолиант; 2008. 552 с.
- Sun Q., Jones K., McClure B., Cambareri B., Zacharakis B., Iversen P.O., Stomski F., Woodcock J.M., Bagley C.J., D'Andrea R., Lopez A.F. Simultaneous antagonism of interleukin-5, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin-3 stimulation of human eosinophils by targeting the common cytokine binding site of their receptors. *Blood* 1999; 94: 1943–1951.
- D'Andrea R.J., Gonda T.J. A model for assembly and activation of the GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors: insights from activated mutants of the common beta subunit. *Exp Hematol* 2000 Mar; 28(3): 231–243.
- Kotenko S.V., Pestka S. Jak-Stat signal transduction pathway through the eyes of cytokine class II receptor complexes. *Oncogene* 2000 May 15; 19(21): 2557–2565.
- Kim-Schulze S., Taback B., Kaufman H.L. Cytokine therapy for cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2007 Oct; 16(4): 793–818.
- Tayal V., Kalra B.S. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics — an update. *Eur J Pharmacol* 2008 Jan 28; 579(1–3): 1–12.
- Leonard J.P., Sherman M.L., Fisher G.L., Buchanan L.J., Larsen G., Atkins M.B., Sosman J.A., Dutcher J.P., Vogelzang N.J., Ryan J.L. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood* 1997 Oct 1; 90(7): 2541–2548.
- Schwartz R.N., Stover L., Dutcher J. Managing toxicities of high-dose interleukin-2. *Oncology (Williston Park)* 2002 Nov; 16(11 Suppl 13): 11–20.
- Sleijfer S., Bannink M., Van Gool A.R., Kruit W.H., Stoter G. Side effects of interferon-alpha therapy. *Pharm World Sci* 2005 Dec; 27(6): 423–431.
- Den Otter W., Jacobs J.J., Battermann J.J., Hordijk G.J., Krastev Z., Moiseeva E.V., Stewart R.J., Ziekman P.G., Koten J.W. Local therapy of cancer with free IL-2. *Cancer Immunol Immunother* 2008 Jul; 57(7): 931–950.
- Johansson A., Hamzah J., Ganss R. Intratumoral TNF α improves immunotherapy. *Oncoimmunology* 2012 Nov 1; 1(8): 1395–1397.
- Dranoff G. Cancer gene therapy: connecting basic research with clinical inquiry. *J Clin Oncol* 1998 Jul; 16(7): 2548–2556.
- Barar J., Omid Y. Translational approaches towards cancer gene therapy: hurdles and hopes. *Bioimpacts* 2012; 2(3): 127–143.
- Hillman G.G., Slos P., Wang Y., Wright J.L., Layer A., De Meyer M., Yudelev M., Che M., Forman J.D. Tumor irradiation followed by intratumoral cytokine gene therapy for murine renal adenocarcinoma. *Cancer Gene Ther* 2004 Jan; 11(1): 61–72.
- Triozzi P.L., Allen K.O., Carlisle R.R., Craig M., LoBuglio A.F., Conry R.M. Phase I study of the intratumoral administration of recombinant canarypox viruses expressing B7.1 and interleukin 12 in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2005 Jun 1; 11(11): 4168–4175.
- Aggarwal B.B., Gupta S.C., Kim J.H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 2012 Jan 19; 119(3): 651–665.
- Weiner L.M., Dhodapkar M.V., Ferrone S. Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *Lancet* 2009 Mar 21; 373(9668): 1033–1040.
- Weiner L.M., Murray J.C., Shuptrine C.W. Antibody-based immunotherapy of cancer. *Cell* 2012 Mar 16; 148(6): 1081–1084.
- Galluzzi L., Vacchelli E., Fridman W.H., Galon J., Sautès-Fridman C., Tartour E., Zucman-Rossi J., Zitvogel L., Kroemer G. Trial watch: monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* 2012 Jan 1; 1(1): 28–37.
- Shuptrine C.W., Surana R., Weiner L.M. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Semin Cancer Biol* 2012 Feb; 22(1): 3–13.
- Vacchelli E., Eggermont A., Galon J., Sautès-Fridman C., Zitvogel L., Kroemer G., Galluzzi L. Trial watch: monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* 2013 Jan 1; 2(1): e22789.
- Reichert J.M. Which are the antibodies to watch in 2013? *MAbs* 2013 Jan–Feb; 5(1): 1–4.
- Ortiz-Sánchez E., Helguera G., Daniels T.R., Penichet M.L. Antibody-cytokine fusion proteins: applications in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2008 May; 8(5): 609–632.
- Kontermann R.E. Antibody-cytokine fusion proteins. *Arch Biochem Biophys* 2012 Oct 15; 526(2): 194–205.
- Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *J Immunol* 2005 Mar 1; 174(5): 2453–2455.
- Nilsang S., Nehru V., Plieva F.M., Nandakumar K.S., Rakshit S.K., Holmdahl R., Mattiasson B., Kumar A. Three-dimensional culture for monoclonal antibody production by hybridoma cells immobilized in macroporous gel particles. *Biotechnol Prog* 2008 Sep–Oct; 24(5): 1122–1131.
- Dillman R.O. The history and rationale for monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancy. *Curr Pharm Biotechnol* 2001 Dec; 2(4): 293–300.
- Shawler D.L., Bartholomew R.M., Smith L.M., Dillman R.O. Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J Immunol* 1985 Aug; 135(2): 1530–1535.
- Dillman R.O., Beauregard J.C., Jamieson M., Amox D., Halpern S.E. Toxicities associated with monoclonal antibody infusions in cancer patients. *Mol Biother* 1988; 1(2): 81–85.
- Maynard J., Georgiou G. Antibody engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 2000; 2: 339–376.
- Scheinfeld N. A review of rituximab in cutaneous medicine. *Dermatol Online J* 2006 Jan 27; 12(1): 3.
- Barcellini W., Zanella A. Rituximab therapy for autoimmune haematologic diseases. *Eur J Intern Med* 2011 Jun; 22(3): 220–229.
- Abdulla N.E., Ninan M.J., Markowitz A.B. Rituximab: current status as therapy for malignant and benign hematologic disorders. *BioDrugs* 2012 Apr 1; 26(2): 71–82.
- Nahta R., Esteva F.J. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett* 2006 Feb 8; 232(2): 123–138.
- Viani G.A., Afonso S.L., Stefano E.J., De Fendi L.I., Soares F.V. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer* 2007 Aug 8; 7: 153.
- Akbarzadeh-Sharbat S., Yakhchali B., Minuchehr Z., Shokrgozar M.A., Zeinali S. In silico design, construction and cloning of Trastuzumab humanized monoclonal antibody: a possible biosimilar for Herceptin. *Adv Biomed Res* 2012; 1: 21.
- Green L.L. Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation

- of therapeutic human monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1999 Dec 10; 231(1–2): 11–23.
41. Coughlin M., Lou G., Martinez O., Masterman S.K., Olsen O.A., Moksa A.A., Farzan M., Babcook J.S., Prabhakar B.S. Generation and characterization of human monoclonal neutralizing antibodies with distinct binding and sequence features against SARS coronavirus using XenoMouse. *Virology* 2007 Apr 25; 361(1): 93–102.
42. Jakobovits A., Amado R.G., Yang X., Roskos L., Schwab G. From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol* 2007 Oct; 25(10): 1134–1143.
43. Holliger P., Hudson P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 2005 Sep; 23(9): 1126–1136.
44. Albrecht H., DeNardo S.J. Recombinant antibodies: from the laboratory to the clinic. *Cancer Biother Radiopharm* 2006 Aug; 21(4): 285–304.
45. Presta L. Antibody engineering for therapeutics. *Curr Opin Struct Biol* 2003 Aug; 13(4): 519–525.
46. Babaei A., Zarkesh-Esfahani S.H., Gharagozloo M. Production of a recombinant anti-human CD4 single-chain variable-fragment antibody using phage display technology and its expression in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol* 2011 May; 21(5): 529–535.
47. Hairul Bahara N.H., Tye G.J., Choong Y.S., Ong E.B., Ismail A., Lim T.S. Phage display antibodies for diagnostic applications. *Biologicals* 2013 Jul; 41(4): 209–216. Epub 2013 May 3.
48. Cruz H.J., Conrad H.S., Dunker R., Peixoto C.M., Cunha A.E., Thomaz M., Burger C., Dias E.M., Clemente J., Moreira J.L., Rieke E., Carrondo M.J. Process development of a recombinant antibody/interleukin-2 fusion protein expressed in protein-free medium by BHK cells. *J Biotechnol* 2002 Jun 26; 96(2): 169–183.
49. Komarova T.V., Skulachev M.V., Zvereva A.S., Schwartz A.M., Dorokhov Y.L., Atabekov J.G. New viral vector for efficient production of target proteins in plants. *Biochemistry (Mosc)* 2006 Aug; 71(8): 846–850.
50. Komarova T.V., Kosorukov V.S., Frolova O.Y., Petrunia I.V., Skrypnik K.A., Gleba Y.Y., Dorokhov Y.L. Plant-made trastuzumab (herceptin) inhibits HER2/Neu+ cell proliferation and retards tumor growth. *PLoS One* 2011 Mar 3; 6(3): e17541.
51. Liao W., Lin J.X., Leonard W.J. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 2011 Oct; 23(5): 598–604.
52. Liao W., Lin J.X., Leonard W.J. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 2013 Jan 24; 38(1): 13–25.
53. Antony G.K., Dudek A.Z. Interleukin 2 in cancer therapy. *Curr Med Chem* 2010; 17(29): 3297–3302.
54. Harvill E.T., Fleming J.M., Morrison S.L. In vivo properties of an IgG3-IL-2 fusion protein. A general strategy for immune potentiation. *J Immunol* 1996 Oct 1; 157(7): 3165–3170.
55. Liu S.J., Sher Y.P., Ting C.C., Liao K.W., Yu C.P., Tao M.H. Treatment of B-cell lymphoma with chimeric IgG and single-chain Fv antibody-interleukin-2 fusion proteins. *Blood* 1998 Sep 15; 92(6): 2103–2112.
56. Penichet M.L., Dela Cruz J.S., Shin S.U., Morrison S.L. A recombinant IgG3-(IL-2) fusion protein for the treatment of human HER2/neu expressing tumors. *Hum Antibodies* 2001; 10(1): 43–49.
57. Shi M., Xie Z., Feng J., Sun Y., Yu M., Shen B., Guo N. A recombinant anti-erbB2, scFv-Fc-IL-2 fusion protein retains antigen specificity and cytokine function. *Biotechnol Lett* 2003 May; 25(10): 815–819.
58. Shi M., Zhang L., Gu H.T., Jiang F.Q., Qian L., Yu M., Chen G.J., Luo Q., Shen B.F., Guo N. Efficient growth inhibition of ErbB2-overexpressing tumor cells by anti-ErbB2 ScFv-Fc-IL-2 fusion protein in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol Sin* 2007 Oct; 28(10): 1611–1620.
59. Heuser C., Ganser M., Hombach A., Brand H., Denton G., Hanisch F.G., Abken H. An anti-MUC1-antibody-interleukin-2 fusion protein that activates resting NK cells to lysis of MUC1-positive tumour cells. *Br J Cancer* 2003 Sep 15; 89(6): 1130–1139.
60. Heuser C., Gohlke S., Matthies A., Bender H., Barth S., Diehl V., Abken H., Hombach A. Anti-CD30-scFv-Fc-IL-2 antibody-cytokine fusion protein that induces resting NK cells to highly efficient cytotoxicity of Hodgkin's lymphoma derived tumour cells. *Int J Cancer* 2004 Jun 20; 110(3): 386–394.
61. Gillies S.D., Lan Y., Williams S., Carr F., Forman S., Raubitschek A., Lo K.M. An anti-CD20-IL-2 immunocytokine is highly efficacious in a SCID mouse model of established human B lymphoma. *Blood* 2005 May 15; 105(10): 3972–3978.
62. Yoon C., Johnston S.C., Tang J., Stahl M., Tobin J.F., Somers W.S. Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine interleukin-12. *EMBO J* 2000 Jul 17; 19(14): 3530–3541.
63. Vignali D.A., Kuchroo V.K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* 2012 Jul 19; 13(8): 722–728.
64. Colombo M.P., Trinchieri G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002 Apr; 13(2): 155–168.
65. Lee P., Wang F., Kuniyoshi J., Rubio V., Stuges T., Groshen S., Gee C., Lau R., Jeffery G., Margolin K., Marty V., Weber J. Effects of interleukin-12 on the immune response to a multipptide vaccine for resected metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3836–3847.
66. Lacy M.Q., Jacobus S., Blood E.A., Kay N.E., Rajkumar S.V., Greipp P.R. Phase II study of interleukin-12 for treatment of plateau phase multiple myeloma (E1A96): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Leuk Res* 2009 Nov; 33(11): 1485–1489.
67. Peng L.S., Penichet M.L., Morrison S.L. A single-chain IL-12 IgG3 antibody fusion protein retains antibody specificity and IL-12 bioactivity and demonstrates antitumor activity. *J Immunol* 1999 Jul 1; 163(1): 250–258.
68. Helguera G., Rodríguez J.A., Daniels T.R., Penichet M.L. Long-term immunity elicited by antibody-cytokine fusion proteins protects against sequential challenge with murine mammary and colon malignancies. *Cancer Immunol Immunother* 2007 Sep; 56(9): 1507–1512.
69. Gafner V., Trachsel E., Neri D. An engineered antibody-interleukin-12 fusion protein with enhanced tumor vascular targeting properties. *Int J Cancer* 2006 Nov 1; 119(9): 2205–2212.
70. Lo K.M., Lan Y., Lauder S., Zhang J., Brunkhorst B., Qin G., Verma R., Courtenay-Luck N., Gillies S.D. huBC1-IL12, an immunocytokine which targets EDB-containing oncofetal fibronectin in tumors and tumor vasculature, shows potent anti-tumor activity in human tumor models. *Cancer Immunol Immunother* 2007 Apr; 56(4): 447–457.
71. Heuser C., Diehl V., Abken H., Hombach A. Anti-CD30-IL-12 antibody-cytokine fusion protein that induces IFN-gamma secretion of T cells and NK cell-mediated lysis of Hodgkin's lymphoma-derived tumor cells. *Int J Cancer* 2003 Sep 10; 106(4): 545–552.
72. Makabe K., Asano R., Ito T., Tsumoto K., Kudo T., Kumagai I. Tumor-directed lymphocyte-activating cytokines: refolding-based preparation of recombinant human interleukin-12 and an antibody variable domain-fused protein by additive-introduced stepwise dialysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Mar 4; 328(1): 98–105.
73. Rudman S.M., Jameson M.B., McKeage M.J., Savage P., Jodrell D.I., Harries M., Acton G., Erlandsson F., Spicer J.F. A phase 1 study of AS1409, a novel antibody-cytokine fusion protein, in patients with malignant melanoma or renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2011 Apr 1; 17(7): 1998–2005.
74. Armitage J.O. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998 Dec 15; 92(12): 4491–4508.
75. Itälä M., Pelliniemi T.T., Remes K., Vanhatalo S., Vainio O. Long-term treatment with GM-CSF in patients with chronic lymphocytic leukemia and recurrent neutropenic infections. *Leuk Lymphoma* 1998 Dec; 32(1–2): 165–174.
76. Ravaut A., Chevreau C., Cany L., Houyau P., Dohollou N., Roché H., Soubeyran P., Bonichon F., Mihura J., Eghbali H., Tabah I., Bui B.N. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with neutropenic fever is potent after low-risk but not after high-risk neutropenic chemotherapy regimens: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 1998 Sep; 16(9): 2930–2936.
77. Половинкина В.С., Косоруков В.С. Рекомбинантный

чГМ-КСФ в онкологии. Российский биотерапевтический журнал 2009; 8(1): 29–39.

78. Ruef C., Coleman D.L. GM-CSF and G-CSF: cytokines in clinical application. *Schweiz Med Wochenschr* 1991 Mar 23; 121(12): 397–412.

79. Stern A.C., Jones T.C. The side-effect profile of GM-CSF. *Infection* 1992; 20 Suppl 2: 124–127.

80. Dreier T., Lode H.N., Xiang R., Dolman C.S., Reisfeld R.A., Kang A.S. Recombinant immunocytokines targeting the mouse transferrin receptor: construction and biological activities. *Bioconjug Chem* 1998 Jul–Aug; 9(4): 482–489.

81. Albertini M.R., Hank J.A., Gadbow B., Kostlevy J., Haldeman J., Schalch H., Gan J., Kim K., Eickhoff J., Gillies S.D., Sondel P.M. Phase II trial of hu14.18-IL2 for patients with metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2012 Dec; 61(12): 2261–2271.

82. Yu A.L., Gilman A.L., Ozkaynak M.F., London W.B., Kreissman S.G., Chen H.X., Smith M., Anderson B., Villablanca J.G., Matthay K.K., Shimada H., Grupp S.A., Seeger R., Reynolds C.P., Buxton A., Reisfeld R.A., Gillies S.D., Cohn S.L., Maris J.M., Sondel P.M. Children's Oncology Group Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010 Sep 30; 363(14): 1324–1334.

83. Hornick J.L., Khawli L.A., Hu P., Lynch M., Anderson P.M., Epstein A.L. Chimeric CLL-1 antibody fusion proteins containing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-2 with specificity for B-cell malignancies exhibit enhanced effector functions while retaining tumor targeting properties. *Blood* 1997 Jun 15; 89(12): 4437–4447.

84. Kaspar M., Trachsel E., Neri D. The antibody-mediated targeted delivery of interleukin-15 and GM-CSF to the tumor neovasculature inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2007 May 15; 67(10): 4940–4948.

85. Dela Cruz J.S., Trinh K.R., Morrison S.L., Penichet M.L. Recombinant anti-human HER2/neu IgG3-(GM-CSF) fusion protein retains antigen specificity and cytokine function and demonstrates antitumor activity. *J Immunol* 2000 Nov 1; 165(9): 5112–5121.

86. Bazzoni F., Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996; 334: 1717–1725.

87. Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104: 487–501.

88. Van Horssen R., Ten Hagen T.L., Eggermont A.M. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist* 2006 Apr; 11(4): 397–408.

89. Borsi L., Balza E., Carnemolla B., Sassi F., Castellani P., Berndt A., Kosmehl H., Biro A., Siri A., Orecchia P., Grassi J., Neri D., Zardi L. Selective targeted delivery of TNFalpha to tumor blood vessels. *Blood* 2003 Dec 15; 102(13): 4384–4392.

90. Papadia F., Basso V., Patuzzo R., Maurichi A., Di Florio A., Zardi L., Ventura E., González-Iglesias R., Lovato V., Giovannoni L., Tasciotti A., Neri D., Santinami M., Menssen H.D., De Cian F. Isolated limb perfusion with the tumor-targeting human monoclonal antibody

cytokine fusion protein L19-TNF plus melphalan and mild hyperthermia in patients with locally advanced extremity melanoma. *J Surg Oncol* 2013 Feb; 107(2): 173–179.

91. Spitaleri G., Berardi R., Pierantoni C., De Pas T., Noberasco C., Libbra C., González-Iglesias R., Giovannoni L., Tasciotti A., Neri D., Menssen H.D., de Braud F. Phase I/II study of the tumour-targeting human monoclonal antibody-cytokine fusion protein L19-TNF in patients with advanced solid tumours. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013 Mar; 139(3): 447–455.

92. Liebau C., Baltzer A.W., Schmidt S., Roesel C., Karreman C., Prisack J.B., Bojar H., Merk H. Interleukin-12 and interleukin-18 induce indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity in human osteosarcoma cell lines independently from interferon-gamma. *Anticancer Res* 2002 Mar–Apr; 22(2A): 931–936.

93. Khawli L.A., Hu P., Epstein A.L. Cytokine, chemokine, and co-stimulatory fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. *Handb Exp Pharmacol* 2008; (181): 291–328.

94. Wilke C.M., Wei S., Wang L., Kryczek I., Kao J., Zou W. Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon-gamma. *Cancer Immunol Immunother* 2011 Nov; 60(11): 1529–1541.

95. Peng R.Q., Ding Y., Zhang X., Liao Y., Zheng L.M., Zhang X.S. A pilot study of paclitaxel combined with gemcitabine followed by interleukin-2 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor for patients with metastatic melanoma. *Cancer Biol Ther* 2012 Dec 1; 13(14): 1443–1448.

96. Hombach A.A., Abken H. Targeting two co-operating cytokines efficiently shapes immune responses. *Oncoimmunology* 2013 Mar 1; 2(3): e23205.

97. Schanzer J.M., Baeuerle P.A., Dreier T., Kufer P. A human cytokine/single-chain antibody fusion protein for simultaneous delivery of GM-CSF and IL-2 to Ep-CAM overexpressing tumor cells. *Cancer Immunol* 2006 Feb 17; 6: 4.

98. Schanzer J.M., Fichtner I., Baeuerle P.A., Kufer P. Antitumor activity of a dual cytokine/single-chain antibody fusion protein for simultaneous delivery of GM-CSF and IL-2 to Ep-CAM expressing tumor cells. *J Immunother* 2006 Sep–Oct; 29(5): 477–488.

99. Helguera G., Rodríguez J.A., Penichet M.L. Cytokines fused to antibodies and their combinations as therapeutic agents against different peritoneal HER2/neu expressing tumors. *Mol Cancer Ther* 2006 Apr; 5(4): 1029–1040.

100. Halin C., Gafner V., Villani M.E., Borsi L., Berndt A., Kosmehl H., Zardi L., Neri D. Synergistic therapeutic effects of a tumor targeting antibody fragment, fused to interleukin 12 and to tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res* 2003 Jun 15; 63(12): 3202–3210.

101. Gillies S.D., Lan Y., Brunkhorst B., Wong W.K., Li Y., Lo K.M. Bi-functional cytokine fusion proteins for gene therapy and antibody-targeted treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2002 Oct; 51(8): 449–460.

102. Jahn T., Zuther M., Friedrichs B., Heuser C., Gohlke S., Abken H., Hombach A.A. An IL12-IL2-antibody fusion protein targeting Hodgkin's lymphoma cells potentiates activation of NK and T cells for an anti-tumor attack. *PLoS One* 2012; 7(9): e44482.