

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046369**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.06

(21) Номер заявки
201991195

(22) Дата подачи заявки
2017.12.20

(51) Int. Cl. **A61K 38/16** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)

(54) **МУЛЬТИМЕРНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ, МОДУЛИРУЮЩИЕ Т-КЛЕТКИ, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/438,272; 62/470,774; 62/555,435;
62/582,132**

(32) **2016.12.22; 2017.03.13; 2017.09.07;
2017.11.06**

(33) **US**

(43) **2019.11.29**

(86) **PCT/US2017/067663**

(87) **WO 2018/119114 2018.06.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КБЮ БИОФАРМА, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Сейдел III Рональд Д., Чапарро
Родольфо (US)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) **US-A1-20070036752
WO-A2-2015195531
US-A1-20060269515**

(57) Изобретение относится к вариантным иммуномодуляторным полипептидам и гибридным полипептидам, содержащим варианты иммуномодулирующие пептиды. Изобретение относится к мультимерным полипептидам, модулирующим Т-клетки, и к композициям, содержащим их, в которых указанные мультимерные полипептиды, модулирующие Т-клетки, содержат вариантный иммуномодуляторный полипептид по данному изобретению. Изобретение относится к нуклеиновым кислотам, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерные полипептиды, модулирующие Т-клетки, и к клеткам-хозяевам, содержащим указанные нуклеиновые кислоты. Изобретение предоставляет способы модулирования активности Т-клетки, причем указанные способы включают контактирование Т-клетки с мультимерным полипептидом, модулирующим Т-клетки, по данному изобретению.

B1

046369

046369

B1

Перекрестная ссылка

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/438272, поданной 22 декабря 2016 г., предварительной заявке на патент США № 62/470774, поданной 13 марта 2017 г., предварительной заявке на патент США № 62/555435, поданной 7 сентября 2017 г., и предварительной заявке на патент США № 62/582132, поданной 6 ноября 2017 г., каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Включение путем ссылки перечня последовательностей, предоставленного в виде текстового файла

Приводится Перечень последовательностей в виде текстового файла "CUEB-107WO_SEQ_LISTING_171133_ST25.txt", созданного 14 ноября 2017 г. и имеющего размер 153 КБ. Содержимое текстового файла включено в данный документ в качестве ссылки во всей своей полноте.

Введение

Адаптивный иммунный ответ включает взаимодействие Т-клеточного рецептора (ТКР), присутствующего на поверхности Т-клеток, с небольшим пептидным антигеном, нековалентно представленным на поверхности антигенпрезентирующей клетки (АПК) главным комплексом гистосовместимости (ГКГС; также называется у человека комплексом человеческого лейкоцитарного антигена (ЧЛА)). Это взаимодействие представляет собой механизм нацеливания иммунной системы и является необходимым молекулярным взаимодействием для модуляции (активации или ингибирования) и эффекторной функции Т-клеток. После эпитоп-специфического нацеливания на целевые клетки нацеливаемые Т-клетки активируются посредством взаимодействия костимулирующих белков, присутствующих на АПК, с костимуляторными белками-партнерами на Т-клетках. Оба сигнала - связывание эпитопа/ТКР и взаимодействие костимуляторных белков АПК с костимуляторными белками Т-клеток - необходимы для управления специфичностью и активацией или ингибированием Т-клеток. ТКР специфичен для данного эпитопа; однако костимуляторный белок не является эпитоп-специфичным и вместо этого обычно экспрессируется на всех Т-клетках или на больших подгруппах Т-клеток.

Краткое описание сущности изобретения

Данное изобретение относится к вариантным иммуномодуляторным полипептидам и гибридным полипептидам, содержащим варианты иммуномодулирующие пептиды. Данное изобретение относится к мультимерным полипептидам, модулирующим Т-клетки, и к композициям, содержащим их, в которых указанные мультимерные полипептиды, модулирующие Т-клетки, содержат вариантный иммуномодуляторный полипептид по данному изобретению. Данное изобретение относится к нуклеиновым кислотам, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерные полипептиды, модулирующие Т-клетки, и к клеткам-хозяевам, содержащим указанные нуклеиновые кислоты. Данное изобретение предоставляет способы модулирования активности Т-клетки, причем указанные способы включают контактирование Т-клетки с мультимерным полипептидом, модулирующим Т-клетки, по данному изобретению.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А-1Д схематически демонстрируют различные варианты осуществления мультимерного полипептида, модулирующего Т-клетки, по данному изобретению. В этих вариантах осуществления дисульфидные связи образуются между полипептидами ГКГС (например, ЧЛА), присутствующими в отдельных полипептидах.

Фиг. 2А-2Q демонстрируют аминокислотную последовательность человеческого ИЛ-2 дикого типа (фиг. 2А); и аминокислотные последовательности вариантных полипептидов ИЛ-2 (фиг. 2В-2Q).

Фиг. 3А-3С демонстрируют аминокислотные последовательности альфа-цепи (фиг. 3А), бета-цепи (фиг. 3В) и гамма-цепи (фиг. 3С) рецептора ИЛ-2.

Фиг. 4А-4С демонстрируют аминокислотные последовательности полипептидов Fc иммуноглобулина.

Фиг. 5А-5С демонстрируют аминокислотные последовательности полипептидов тяжелой цепи лейкоцитарного антигена человека (ЧЛА) I класса. Сигнальные последовательности подчеркнуты.

Фиг. 6 демонстрирует множественное выравнивание аминокислотной последовательности предшественников бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$) (т.е. включая лидерную последовательность) из Homo sapiens (NP_004039.1; SEQ ID NO: 95), Pan troglodytes (NP_001009066.1; SEQ ID NO: 96), Macaca mulatta (NP_001040602.1; SEQ ID NO: 97), Bos Taurus (NP_776318.1; SEQ ID NO: 98) и Mus musculus (NP_033865.2; SEQ ID NO: 99). Аминокислоты 1-20 представляют собой сигнальный пептид.

Фиг. 7А, 7В демонстрируют продукцию ИЛ-2/synTacs ("Cue-ИЛ-2-a" и "Cue-ИЛ-2-b") по данному изобретению после транзientной трансфекции. Фиг. 7А демонстрирует неочищенный продукт; фиг. 7В демонстрирует очищенный продукт.

Фиг. 8А, 8В демонстрируют продукцию ИЛ-2/synTacs по данному изобретению, в которой ИЛ-2 полипептид присутствует в легкой цепи (полипептидная цепь с легкой цепью (например, $\beta 2M$) молекулы ГКГС класса I) или в тяжелой цепи (полипептидная цепь с тяжелой цепью молекулы ГКГС класса I).

На фиг. 9 продемонстрирован уровень экспрессии ИЛ-2/syn-Tacs, в котором ИЛ-2 относится к ди-

кому типу (дт) или содержит различные комбинации F42A, D20K, Q126A, E15A, Y45A и H16A.

Фиг. 10 демонстрирует экспрессию ИЛ-2/synTас по данному изобретению, в которой ИЛ-2 присутствует в одной копии (1X), двух копиях (2X) или трех копиях (3X) в synTас.

Фиг. 11 демонстрирует стимуляцию *in vitro* антигенспецифических CD8⁺ Т-клеток и неспецифических CD8⁺ Т-клеток с помощью ИЛ-2/synTас по данному изобретению, причем указанный вариантный ИЛ-2, содержащий замены F42A и H16A, присутствует в synTас в двух копиях.

Фиг. 12 демонстрирует связывание ИЛ-2/synTас со специфическими (вирус лимфоцитарного хориоменингита; LCMV - lymphocytic choriomeningitis virus) или неспецифическими (OT1; распознающими овальбумин) CD8⁺ Т-клетками.

Фиг. 13 демонстрирует опосредованную ИЛ-2/synTас передачу сигналов в антигенспецифических (LCMV) или неспецифических (BL6) CD8⁺ Т-клетках.

Фиг. 14A-14F демонстрирует процент клеток позитивных по фосфо-трансдуктанту сигнала и активатору транскрипции 5 (pSTAT5 - phospho-signal transducer and activator of transcription 5) после стимуляции CD8⁺ антигенспецифических (LCMV) или неспецифических (BL6) клеток с помощью ИЛ-2/synTас по данному изобретению, при различных концентрациях ИЛ-2/synTас.

Фиг. 15 демонстрирует *in vivo* активность ИЛ-2/synTас по данному изобретению. На левой панели продемонстрировано кратное изменение количества антигенспецифических CD8⁺ Т-клеток после введения фосфатно-солевого буфера (ФСБ), рекомбинантного ИЛ-2 (rИЛ-2) или ИЛ-2/synTас по данному изобретению. Правая панель демонстрирует антигенспецифические и неантигенспецифические ответы после введения ФСБ, rИЛ-2 или ИЛ-2/synTас по данному изобретению.

Фиг. 16A, 16B демонстрируют эффекты увеличения дозы (фиг. 16A) и пути введения (фиг. 16B).

Фиг. 17A, 17B демонстрируют влияние количества копий ИЛ-2 на эффективность *in vivo* против опухоли.

Фиг. 18 демонстрирует период полувыведения из сыворотки ИЛ-2/synTас по данному изобретению после внутрибрюшинного введения ИЛ-2/synTас в количестве 10 мг/кг.

Фиг. 19 демонстрирует стабильность ИЛ-2/synTас данного изобретения через 2 ч после внутрибрюшинного введения ИЛ-2/synTас в количестве 10 мг/кг.

Фиг. 20 демонстрирует данные эксклюзионной хроматографии ИЛ-2/synTас по данному изобретению после выдерживания ИЛ-2/synTас при 4°C или 37°C в течение 5 дней.

Фиг. 21 демонстрирует аминокислотную последовательность тяжелой цепи ИЛ-2/synTас по данному изобретению с лидерным пептидом, причем тяжелая цепь ИЛ-2/synTас содержит Fc IgG1 с заменой N297A.

Фиг. 22 демонстрирует аминокислотную последовательность тяжелой цепи ИЛ-2/synTас по данному изобретению без лидерного пептида, причем тяжелая цепь ИЛ-2/synTас содержит Fc IgG1 с заменой N297A.

Фиг. 23A, 23B демонстрируют нуклеотидную последовательность (фиг. 23A), кодирующую тяжелую цепь ИЛ-2/synTас, изображенную на фиг. 21; и ключ (фиг. 23B) для последовательности.

Фиг. 24 демонстрирует аминокислотную последовательность тяжелой цепи ИЛ-2/synTас по данному изобретению с лидерным пептидом, причем тяжелая цепь ИЛ-2/synTас содержит Fc IgG1 с заменами L234A и L235A.

Фиг. 25 демонстрирует аминокислотную последовательность тяжелой цепи ИЛ-2/synTас по данному изобретению без лидерного пептида, причем тяжелая цепь ИЛ-2/synTас содержит Fc IgG1 с заменами L234A и L235A.

Фиг. 26A, 26B демонстрируют нуклеотидную последовательность (фиг. 26A), кодирующую тяжелую цепь ИЛ-2/synTас, изображенную на фиг. 24; и ключ (фиг. 26B) для последовательности.

Фиг. 27 демонстрирует аминокислотную последовательность тяжелой цепи ИЛ-2/synTас по данному изобретению с лидерным пептидом, причем тяжелая цепь ИЛ-2/synTас содержит Fc IgG1 с заменами L234F, L235E и P331S.

Фиг. 28 демонстрирует аминокислотную последовательность тяжелой цепи ИЛ-2/synTас по данному изобретению без лидерного пептида, причем тяжелая цепь ИЛ-2/synTас содержит Fc IgG1 с заменами L234F, L235E и P331S.

Фиг. 29A, 29B демонстрируют нуклеотидную последовательность (фиг. 29A), кодирующую тяжелую цепь ИЛ-2/synTас, изображенную на фиг. 27; и ключ (фиг. 29B) для последовательности.

Фиг. 30 демонстрирует аминокислотную последовательность легкой цепи ИЛ-2/synTас по данному изобретению с лидерным пептидом, причем легкая цепь ИЛ-2/synTас содержит эпитоп E7 вируса папилломы человека (ВПЧ - HPV - human papilloma virus).

Фиг. 31 демонстрирует аминокислотную последовательность легкой цепи ИЛ-2/synTас по данному изобретению без лидерного пептида, причем легкая цепь ИЛ-2/synTас содержит эпитоп E7 ВПЧ.

Фиг. 32 демонстрирует нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь ИЛ-2/synTас, изображенную на фиг. 30.

Фиг. 33A-33D демонстрирует аминокислотные последовательности Fc IgG1 человека дикого типа (фиг. 33A), Fc IgG1 с заменами L234F, L235E и P331S (фиг. 33B), Fc IgG1 с заменой N297A (фиг. 33C) и

Fc IgG1 с заменами L234A и L235A (фиг. 33D).

Фиг. 34А-34С демонстрирует аминокислотную последовательность полипептида $\beta 2$ -микроглобулина (R12C) (фиг. 34А), вариантного ИЛ-2 полипептида (H16A; F42A) (фиг. 34В) и Н-цепи ГКГС класса I A0201 (Y84A); A236C) (фиг. 34С).

Фиг. 35 демонстрирует опосредованную ИЛ-2/synTас экспансию человеческих ЦМВ(CMV)-специфичных CD8⁺ Т-клеток.

Фиг. 36 демонстрирует данные экспрессии и данные связывания рецептора для synTас с вариантами ИЛ-2 полипептидами.

Фиг. 37 демонстрирует связывание ИЛ-2/synTас с первичными человеческими E7 ВПЧ16 (11-20)-специфичными CD8⁺ Т-клетками, как обнаружено с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 38 демонстрирует влияние связывания вариантного ИЛ-2/synTас с первичными ВПЧ16 E7 (11-20)-специфичными CD8⁺ Т-клетками человека на фосфорилирование SLP76.

Фиг. 39 демонстрирует влияние связывания вариантного ИЛ-2/synTас с первичными ВПЧ16 E7 (11-20)-специфичными Т-клетками человека на продукцию CD25, гранзима В и CD107 α .

Фиг. 40 демонстрирует влияние связывания вариантного ИЛ-2/synTас с первичными ВПЧ16 E7 (11-20)-специфичными CD8⁺ Т-клетками человека на продукцию IFN- γ .

Определения

Термины "полинуклеотид" и "нуклеиновая кислота", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо рибонуклеотидов, либо дезоксирибонуклеотидов. Таким образом, этот термин включает, но не ограничивается ими, одно-, двух- или многоцепочечные ДНК или РНК, геномные ДНК, кДНК ДНК-РНК-гибриды или полимер, содержащий пуриновые и пиримидиновые основания или другие природные, химически или биохимически модифицированные, неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания.

Термины "пептид", "полипептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме аминокислот любой длины, которая может включать кодированные и некодированные аминокислоты, химически или биохимически модифицированные или дериватизированные аминокислоты и полипептиды, имеющие модифицированные пептидные основные цепи.

Полинуклеотид или полипептид имеет определенный процент "идентичности последовательности" с другим полинуклеотидом или полипептидом, что означает, что при выравнивании этот процент оснований или аминокислот одинаков и в одинаковом относительном положении при сравнении двух последовательностей. Идентичность последовательности может быть определена различными способами. Чтобы определить идентичность последовательности, последовательности могут быть выровнены с использованием различных удобных способов и компьютерных программ (например, BLAST, T-COFFEE, MUSCLE, MAFFT и т.д.), доступных во всемирной сети на сайтах, включая ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/, ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/, mafft.cbrc.jp/alignment/software/. См., например, Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol., 215:403-10.

Термин "консервативная аминокислотная замена" относится к взаимозаменяемости в белках аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи. Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, состоит из глицина, аланина, валина, лейцина и изолейцина; группа аминокислот, имеющих алифатически-гидроксильные боковые цепи, состоит из серина и треонина; группа аминокислот, имеющих амидсодержащие боковые цепи, состоит из аспарагина и глутамина; группа аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, состоит из фенилаланина, тирозина и триптофана; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, состоит из лизина, аргинина и гистидина; группа аминокислот, имеющих кислотные боковые цепи, состоит из глутамата и аспартата; и группа аминокислот, имеющих серосодержащие боковые цепи, состоит из цистеина и метионина. Примерами консервативных групп аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин-глицин и аспарагин-глутамин.

Используемый в данном документе термин "связывание" (например, в отношении связывания мультимерного полипептида, модулирующего Т-клетки, согласно данному изобретению, с полипептидом (например, Т-клеточным рецептором на Т-клетке) относится к нековалентному взаимодействию между ними. Связывающие взаимодействия обычно характеризуются константой диссоциации (K_D) менее чем 10^{-6} М, менее чем 10^{-7} М, менее чем 10^{-8} М, менее чем 10^{-9} М, менее чем 10^{-10} М, менее чем 10^{-11} М, менее чем 10^{-12} М, менее чем 10^{-13} М, менее чем 10^{-14} М или менее чем 10^{-15} М. "Аффинность" относится к силе связывания, повышенной аффинности связывания коррелирующей с более низкой K_D .

Используемый в данном документе термин "иммунологический синапс" или "иммунный синапс" обычно относится к естественному интерфейсу между двумя взаимодействующими иммунными клетками адаптивного иммунного ответа, включая, например, интерфейс между антиген-презентирующей клеткой (АПК) или целевой клеткой и эффекторной клеткой, например лимфоцитом, эффекторной Т-клеткой, клеткой-естественным килером и т.п. Иммунологический синапс между АПК и Т-клеткой обычно инициируется взаимодействием Т-клеточного антигенного рецептора и молекул главного комплекса гистосовместимости, например, как описано в Bromley et al., Annu. Rev. Immunol., 2001,

19:375-96, раскрытие которых полностью включено в данное описание посредством ссылки.

"Т-клетка" включает все типы иммунных клеток, экспрессирующих CD3, включая Т-хелперные клетки (CD4⁺ клетки), цитотоксические Т-клетки (CD8⁺ клетки), регуляторные Т-клетки (Treg) и NK-Т клетки.

"Костимуляторный полипептид" в том смысле, в котором он используется в данном документе, включает полипептид на антигенпрезентирующей клетке (АПК) (например, на дендритной клетке, В-клетке и т.п.), который специфически связывает когнатный костимуляторный полипептид на Т-клетке, обеспечивая тем самым сигнал, который, в дополнение к первичному сигналу, обеспечиваемому, например, связыванием комплекса ТКР/CD3 с полипептидом главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), содержащего пептид, опосредует ответ Т-клетки, включая, но не ограничиваясь ими, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. Костимуляторный лиганд может включать, но не ограничивается ими, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, лиганд Fas (FasL), индуцибельный костимуляторный лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, ЧЛА-G, МІСА, МІСВ, HVEM, бета-рецептор лимфотоксина, 3/TR6, ІLT3, ІLT4, HVEM, агонист или антитело, которое связывает рецептор лиганда Toll, и лиганд, который специфически связывается с B7-H3. Костимуляторный лиганд также включает, среди прочего, антитело, которое специфически связывается с костимуляторной молекулой, присутствующей в Т-клетке, такой как, но не ограничиваясь ими, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-1 - lymphocyte function-associated antigen-1), CD2, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83.

"Модуляторный домен" ("MOD"), мультимерного полипептида, модулирующего Т-клетки, по данному изобретению включает костимуляторный полипептид, например ІЛ-2 полипептид, такой как вариант ІЛ-2 полипептид по данному изобретению.

"Гетерологичный", как используется в данном документе, означает нуклеотид или полипептид, который не присутствует в нативной нуклеиновой кислоте или белке, соответственно.

"Рекомбинантный", как используется в данном документе, означает, что конкретная нуклеиновая кислота (ДНК или РНК) является продуктом различных комбинаций стадий клонирования, рестрикции, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или лигирования, приводящих к конструкции, имеющей структурную кодирующую или некодирующую последовательность, отличающуюся от эндогенных нуклеиновых кислот, присутствующих в природных системах. Последовательности ДНК, кодирующие полипептиды, могут быть собраны из фрагментов кДНК или из ряда синтетических олигонуклеотидов, чтобы получить синтетическую нуклеиновую кислоту, которая способна экспрессироваться из рекомбинантной транскрипционной единицы, содержащейся в клетке или в бесклеточной системе транскрипции и трансляции.

Термины "рекомбинантный вектор экспрессии" или "конструкция ДНК" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения молекулы ДНК, содержащей вектор и одну вставку. Рекомбинантные векторы экспрессии обычно генерируют с целью экспрессии и/или размножения вставки (вставок) или для конструирования других рекомбинантных нуклеотидных последовательностей. Вставка(и) может или не может быть функционально связана с промоторной последовательностью и может или не может быть функционально связана с регуляторными последовательностями ДНК.

Клетка была "генетически модифицирована", или "трансформирована", или "трансфицирована" экзогенной ДНК, например вектором рекомбинантной экспрессии, когда такая ДНК была введена внутрь клетки. Присутствие экзогенной ДНК приводит к постоянным или временным генетическим изменениям. Трансформирующая ДНК может или не может быть интегрирована (ковалентно связана) в геном клетки. Например, в прокариотах, дрожжах и клетках млекопитающих трансформирующая ДНК может поддерживаться на эписомальном элементе, таком как плаزمид. Что касается эукариотических клеток, то стабильно трансформированная клетка представляет собой клетку, в которой трансформирующая ДНК интегрируется в хромосому, так что она наследуется дочерними клетками посредством репликации хромосомы.

Используемая в данном документе "клетка-хозяин" обозначает эукариотическую клетку *in vivo* или *in vitro* или клетку многоклеточного организма (например, клеточную линию), культивируемую как одноклеточный объект, причем эукариотические клетки могут использоваться или использовались в качестве реципиентов для нуклеиновой кислоты (например, вектора экспрессии, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую мультимерный полипептид по данному изобретению), и включают потомство исходной клетки, которая была генетически модифицирована нуклеиновой кислотой. Понятно, что потомство отдельной клетки необязательно может быть полностью идентичным по морфологии или по геномному или полному комплексу ДНК исходному родителю вследствие естественной, случайной или преднамеренной мутации. "Рекомбинантная клетка-хозяин" (также называемая "генетически модифицированная клетка-хозяин") представляет собой клетку-хозяин, в которую была введена гетерологичная нуклеиновая кислота, например, вектор экспрессии. Например, генетически модифицированная эукариотическая клетка-хозяин генетически модифицируется путем введения в подходящую эукариотическую клетку-хозяин гетерологичной нуклеиновой кислоты, например, экзогенной

нуклеиновой кислоты, которая является чужеродной для эукариотической клетки-хозяина, или рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая обычно не находится в эукариотической клетке-хозяине.

Термины "лечение", "лечить", "обработка", "обрабатывать" и т.п. используются в данном документе для обозначения достижения желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения от заболевания и/или неблагоприятного эффекта, связанного с заболеванием. Используемое в данном описании "лечение"/"обработка" охватывает любое лечение/обработку заболевания или симптома у млекопитающего и включает

(a) предотвращение возникновения заболевания или симптома у субъекта, который может быть предрасположен к приобретению заболевания или симптома, но еще не был диагностирован как имеющий их;

(b) подавление заболевания или симптома, т.е. прекращение их развития; или

(c) облегчение заболевания, т.е. вызывание регрессии заболевания.

Терапевтический агент можно вводить до, во время или после начала заболевания или травмы. Лечение продолжающегося заболевания, при котором лечение стабилизирует или уменьшает нежелательные клинические симптомы пациента, представляет особый интерес. Такое лечение желательно проводить до наступления полной потери функции в пораженных тканях. Терапию субъекту желательно вводить во время симптоматической стадии заболевания, а в некоторых случаях после симптоматической стадии заболевания.

Термины "индивидуум", "субъект", "хозяин" и "пациент" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту-млекопитающему, для которого требуется диагностика, лечение или терапия. Млекопитающие включают, например, людей, приматов, не являющихся людьми, грызунов (например, крыс; мышей), лагоморфов (например, кроликов), копытных (например, коров, овец, свиней, лошадей, коз и т.п.) и т.д.

Прежде чем данное изобретение будет дополнительно описано, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными вариантами осуществления, поскольку они, конечно, могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем по данному изобретению будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Когда предоставляется диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение, с точностью до десятой доли нижнего предела, если контекст явно не предписывает иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим установленным или промежуточным значением в указанном диапазоне находится в пределах изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться в меньшие диапазоны и также охватываются изобретением, с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает одно или оба из пределов, диапазоны, исключающие один или оба из этих включенных пределов, также включены в данное изобретение.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, также могут использоваться при практическом применении или испытании по данному изобретению, предпочтительные способы и материалы описаны в данном случае. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в него посредством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитируются указанные публикации.

Следует отметить, что используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число, если контекст явно не предписывает иное. Таким образом, например, ссылка на "вариантный ИЛ-2 полипептид" включает множество таких полипептидов, а ссылка на "полипептид тяжелой цепи ЧЛА класса I" включает ссылку на один или несколько полипептидов тяжелой цепи ЧЛА класса I и их эквиваленты, известные специалистам в данной области техники и так далее. Кроме того, следует отметить, что формула изобретения может быть составлена таким образом, чтобы исключить любой необязательный элемент. Как таковое, это утверждение предназначено для использования в качестве предшествующей основы для использования такой исключительной терминологии, как "единственно", "только" и т.п., в связи с перечислением элементов претензии (пунктов формулы) или использованием "отрицательного" ограничения.

Понятно, что определенные признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предоставлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предусмотрены отдельно или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящихся к данному изобретению, конкретно охватываются данным изобретением и раскрываются в данном документе так же, как если бы

каждая комбинация была раскрыта индивидуально и в явном виде. Кроме того, все подкомбинации различных вариантов осуществления и их элементов также конкретно охватываются данным изобретением и раскрываются в данном документе так же, как если бы каждое такое сочетание было индивидуально и в явном виде раскрыто в данном документе.

Публикации, обсуждаемые в данном документе, предназначены исключительно для их раскрытия до даты подачи данной заявки. Ничто в данном документе не должно быть истолковано как признание того, что данное изобретение не имеет права предшествовать такой публикации в силу предшествующего изобретения. Кроме того, предоставленные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые, возможно, потребуется подтвердить независимо.

Подробное описание сущности изобретения

Данное изобретение относится к вариантным иммуномодуляторным полипептидам и гибридным полипептидам, содержащим варианты иммуномодулирующие пептиды. Данное изобретение относится к мультимерным полипептидам, модулирующим Т-клетки, и к композициям, содержащим их, в которых указанные мультимерные полипептиды, модулирующие Т-клетки, содержат варианты иммуномодуляторный полипептид по данному изобретению. Данное изобретение относится к нуклеиновым кислотам, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерные полипептиды, модулирующие Т-клетки, и к клеткам-хозяевам, содержащим указанные нуклеиновые кислоты. Данное изобретение предоставляет способы модулирования активности Т-клетки; указанные способы включают контактирование Т-клетки с мультимерным полипептидом, модулирующим Т-клетки, по данному изобретению.

В вариантах осуществления, описанных в данном документе, мультимерный полипептид функционирует как суррогатный АПК и имитирует адаптивный иммунный ответ. Мультимерный полипептид делает это путем взаимодействия ТКР, присутствующего на поверхности Т-клетки, с эпитоп-презентирующим пептидом в комплексе, с ГКГС, присутствующем в указанном мультимерном полипептиде. Это взаимодействие обеспечивает мультимерный полипептид способностью достигать эпитоп-специфического нацеливания на клетки. В вариантах осуществления, описанных в данном документе, мультимерный полипептид также обладает по меньшей мере одним иммуномодуляторным белком (также называемым в данном документе "модуляторным доменом" или "MOD"), который взаимодействует с костимуляторным белком-партнером (также называемым в данном документе "иммуномодуляторным полипептидом", "когнатным иммуномодуляторным полипептидом" или "когнатным костимуляторным белком" и т.п.) на Т-клетке. Оба сигнала - связывание эпитопа/ГКГС с ТКР и связывание иммуномодуляторного полипептида с когнатным костимулирующим полипептидом - затем управляют как желаемой специфичностью Т-клеток, так и ингибированием или активацией/пролиферацией. Как дополнительно описано в данном документе, по меньшей мере один иммуномодуляторный белок может представлять собой вариант встречающегося в природе иммуномодуляторного белка (например, встречающегося в природе ИЛ-2), при этом указанный вариант проявляет пониженную аффинность к своему партнерскому костимуляторному белку на Т-клетке (например, ИЛ-2Р) по сравнению с аффинностью природного иммуномодуляторного белка к партнерскому костимуляторному белку.

Мультимерный полипептид, модулирующий Т-клетки, по данному изобретению также упоминается как "полипептид supTas". Полипептид supTas по данному изобретению содержит вариантный модуляторный домен, причем указанный вариантный модуляторный домен проявляет пониженную аффинность связывания с иммуномодуляторным полипептидом (когнатным костимулирующим полипептидом, например, когнатным костимулирующим полипептидом на поверхности Т-клетки), по сравнению со сродством модулирующего домена дикого типа к иммуномодулирующему полипептиду. Полипептид supTas по данному изобретению может модулировать активность целевой Т-клетки. Полипептид supTas по данному изобретению обеспечивает повышенную специфичность к целевым клеткам.

Вариантные иммуномодулирующие полипептиды.

Данное изобретение обеспечивает модулирующие варианты ИЛ-2 полипептиды. Аминокислотная последовательность дикого типа человеческого ИЛ-2 продемонстрирована на фиг. 2А. Аминокислотная последовательность человеческого ИЛ-2 полипептида дикого типа может быть следующей:

APTSSSTKKT QLQLEEHLLLD

LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVL

NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNRWITFCQSSIIS

TLT (SEQ ID NO:1).

ИЛ-2 дикого типа связывается с рецептором ИЛ-2 (ИЛ-2Р) на поверхности клетки. Рецептор ИЛ-2 представляет собой в некоторых случаях гетеротримерный полипептид, содержащий альфа-цепь (ИЛ-2Р α ; также называемую CD25), бета-цепь (ИЛ-2Р β ; также называемую CD122) и гамма-цепь (ИЛ-2Р γ ; также называемую CD132). Аминокислотные последовательности человеческого ИЛ-2Р α , ИЛ-2Р β и ИЛ-2Р γ продемонстрированы на фиг. 3А-3С.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению проявляет пониженную аффинность связывания с ИЛ-2Р по сравнению с аффинностью связывания ИЛ-2 полипептида, со-

Вариант ИЛ-2 полипептида по данному изобретению может иметь длину от 120 до 140 аминокислот, например от 120 до 125 аминокислот, от 125 до 130 аминокислот, от 130 до 135 аминокислот или от 135 до 140 аминокислот. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению имеет длину 133 аминокислоты.

Замена E15.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2D, при этом аминокислота 15 представляет собой аминокислоту, отличную от глутаминовой кислоты, например, при этом аминокислота 15 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His или Asp. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2D, при этом аминокислота 15 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2D, при этом аминокислота 15 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2D, при этом аминокислота 15 представляет собой Gly. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2D, при этом аминокислота 15 представляет собой Val. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2D, при этом аминокислота 15 представляет собой Leu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2D, при этом аминокислота 15 представляет собой Ile. В некоторых случаях описанные выше вариантные ИЛ-2 полипептиды с заменой E15 имеют'affинность связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, от около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ. В некоторых случаях такие вариантные ИЛ-2 полипептиды связывают ИЛ-2Р с'affинностью связывания, которая по меньшей мере на 5% меньше, на 10% меньше, по меньшей мере на 15% меньше, по меньшей мере на 20% меньше, по меньшей мере на 25% меньше, по меньшей мере на 30% меньше, по меньшей мере на 35% меньше, по меньшей мере на 40% меньше, по меньшей мере на 45% меньше, по меньшей мере на 50% меньше, по меньшей мере на 55% меньше, по меньшей мере на 60% меньше, по меньшей мере на 65% меньше, по меньшей мере на 70% меньше, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80% меньше, по меньшей мере на 85% меньше, по меньшей мере на 90% меньше, по меньшей мере на 95% меньше или более чем на 95% меньше, чем'affинность связывания ИЛ-2 полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2А, с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, содержащий альфа-, бета- и гамма-цепи, содержащие аминокислотные последовательности (зрелые формы), изображенные на фиг. 3А-3С). В некоторых случаях такой вариантный ИЛ-2 полипептид имеет длину 133 аминокислоты.

Замена H16.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2E, при этом аминокислота 16 представляет собой аминокислоту, отличную от гистидина, например, при этом аминокислота 16 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, Asp или Glu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2E, при этом аминокислота 16 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu

200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, от около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ. В некоторых случаях такие вариантные ИЛ-2 полипептиды связывают ИЛ-2Р с аффинностью связывания, которая по меньшей мере на 5% меньше, на 10% меньше, по меньшей мере на 15% меньше, по меньшей мере на 20% меньше, по меньшей мере на 25% меньше, по меньшей мере на 30% меньше, по меньшей мере на 35% меньше, по меньшей мере на 40% меньше, по меньшей мере на 45% меньше, по меньшей мере на 50% меньше, по меньшей мере на 55% меньше, по меньшей мере на 60% меньше, по меньшей мере на 65% меньше, по меньшей мере на 70% меньше, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80% меньше, по меньшей мере на 85% меньше, по меньшей мере на 90% меньше, по меньшей мере на 95% меньше или более чем на 95% меньше, чем аффинность связывания ИЛ-2 полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2А с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, содержащий альфа-, бета- и гамма-цепи, содержащие аминокислотные последовательности (зрелые формы), изображенные на фиг. 3А-3С). В некоторых случаях такой вариантный ИЛ-2 полипептид имеет длину 133 аминокислоты.

Замена F42.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2В, при этом аминокислота 42 представляет собой аминокислоту, отличную от фенилаланина, например, при этом аминокислота 42 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2В, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2В, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2В, при этом аминокислота 42 представляет собой Gly. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2В, при этом аминокислота 42 представляет собой Val. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2В, при этом аминокислота 42 представляет собой Leu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2В, при этом аминокислота 42 представляет собой Ile. В некоторых случаях описанные выше вариантные ИЛ-2 полипептиды с F42-заменой имеют аффинность связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, от около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ. В некоторых случаях такие вариантные ИЛ-2 полипептиды связывают ИЛ-2Р с аффинностью связывания, которая по меньшей мере на 5% меньше, на 10% меньше, по меньшей мере на 15% меньше, по меньшей мере на 20% меньше, по меньшей мере на 25% меньше, по меньшей мере на 30% меньше, по меньшей мере на 35% меньше, по меньшей мере на 40% меньше, по меньшей мере на 45% меньше, по меньшей мере на 50% меньше, по меньшей мере на 55% меньше, по меньшей мере на 60% меньше, по меньшей мере на 65% меньше, по меньшей мере на 70% меньше, по меньшей мере на 75% меньше, по меньшей мере на 80% меньше, по меньшей мере на 85% меньше, по меньшей мере на 90% меньше, по меньшей мере на 95% меньше или более чем на 95% меньше, чем аффинность связывания ИЛ-2 полипепти-

да, содержащего аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2А с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, включающего альфа-, бета- и гамма-цепи, содержащие аминокислотные последовательности (зрелые формы), изображенные на фиг. 3А-3С). В некоторых случаях такой вариантный ИЛ-2 полипептид имеет длину 133 аминокислоты.

Замена Y45.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2F, при этом аминокислота 45 представляет собой аминокислоту, отличную от тирозина, например, при этом аминокислота 45 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2F, при этом аминокислота 45 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2F, при этом аминокислота 45 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2F, при этом аминокислота 45 представляет собой Gly. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2F, при этом аминокислота 45 представляет собой Val. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2F, при этом аминокислота 45 представляет собой Leu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2F, при этом аминокислота 45 представляет собой Ile. В некоторых случаях описанные выше вариантные ИЛ-2 полипептиды с заменой Y45 имеют аффинность связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 до около 800 нМ, от около 800 до около 900 нМ, от около 900 до около 1 мкМ, от около 1 до около 5 мкМ, от около 5 до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ. В некоторых случаях такие вариантные ИЛ-2 полипептиды связывают ИЛ-2Р с аффинностью связывания по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере на 50% меньше, по меньшей мере на 55% меньше, по меньшей мере на 60% меньше, по меньшей мере на 65% меньше, по меньшей мере на 70% меньше, по меньшей мере на 75% меньше, по меньшей мере на 80% меньше, по меньшей мере на 85% меньше, по меньшей мере на 90% меньше, по меньшей мере на 95% меньше или более чем на 95% меньше, чем аффинность связывания ИЛ-2 полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2А с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, включающем альфа-, бета- и гамма-цепи, содержащие аминокислотные последовательности (зрелые формы), изображенные на фиг. 3А-3С). В некоторых случаях такой вариантный ИЛ-2 полипептид имеет длину 133 аминокислоты.

Замена Q126.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2G, при этом аминокислота 126 представляет собой аминокислоту, отличную от глутамина, например, при этом аминокислота 126 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Lys, Arg, His, Asp или Glu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2G, при этом аминокислота 126 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит ами-

нокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2G, при этом аминокислота 126 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2G, при этом аминокислота 126 представляет собой Gly. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2G, при этом аминокислота 126 представляет собой Val. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2G, при этом аминокислота 126 представляет собой Leu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2G, при этом аминокислота 126 представляет собой Ile. В некоторых случаях описанные выше варианты ИЛ-2 полипептиды с заменой Q126 имеют аффинность связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, от около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ. В некоторых случаях такие варианты ИЛ-2 полипептиды связывают ИЛ-2Р с аффинностью связывания, которая по меньшей мере на 5% меньше, на 10% меньше, по меньшей мере на 15% меньше, по меньшей мере на 20% меньше, по меньшей мере на 30% меньше, по меньшей мере на 35% меньше, по меньшей мере на 40% меньше, по меньшей мере на 45% меньше, по меньшей мере на 50% меньше, по меньшей мере на 55% меньше, по меньшей мере на 60% меньше, по меньшей мере на 65% меньше, по меньшей мере на 70% меньше, по меньшей мере на 80% меньше, по меньшей мере на 85% меньше, по меньшей мере на 90% меньше, по меньшей мере на 95% меньше или более чем на 95% меньше, чем аффинность связывания ИЛ-2 полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2А с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, включающего альфа-, бета- и гамма-цепи, содержащие аминокислотные последовательности (зрелые формы), изображенные на фиг. 3А-3С). В некоторых случаях такой вариантный ИЛ-2 полипептид имеет длину 133 аминокислоты.

Замены F42 и H16.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2H, при этом аминокислота 42 представляет собой аминокислоту, отличную от фенилаланина, например, при этом аминокислота 42 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; и при этом аминокислота 16 представляет собой аминокислоту, отличную от гистидина, например, при этом аминокислота 16 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, Asp или Glu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2H, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; и при этом аминокислота 16 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2H, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, а аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере на 99% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2H, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, а аминокислота 16 представляет собой Gly. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2H, при этом аминокислота 42 представляет собой Val, а аминокислота 16

представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2H, при этом аминокислота 42 представляет собой Leu, а аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере на 99% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2H, при этом аминокислота 42 представляет собой Ile, а аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях описанные выше варианты ИЛ-2 полипептиды F42/H16 имеют аффинность связывания с ИЛ-2R, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, до около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ. В некоторых случаях такие варианты ИЛ-2 полипептиды связывают ИЛ-2R с аффинностью связывания, которая по меньшей мере на 5% меньше, по меньшей мере на 10% меньше, по меньшей мере на 15% меньше, по меньшей мере на 20% меньше, по меньшей мере на 25% меньше, по меньшей мере на 30% меньше, по меньшей мере на 35% меньше, по меньшей мере на 40% меньше, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50% меньше, по меньшей мере на 55% меньше, по меньшей мере на 60% меньше, по меньшей мере на 65% меньше, по меньшей мере на 70% меньше, по меньшей мере на 75% меньше, по меньшей мере на 80% меньше, по меньшей мере на 85% меньше, по меньшей мере на 90% меньше, по меньшей мере на 95% меньше или более чем на 95% меньше, чем аффинность связывания ИЛ-2 полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2A с ИЛ-2R (например, ИЛ-2R, включающего альфа-, бета- и гамма-цепи, содержащие аминокислотные последовательности (зрелые формы), изображенные на фиг. 3A-3C). В некоторых случаях такой вариантный ИЛ-2 полипептид имеет длину 133 аминокислоты.

Замены F42 и D20.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2I, при этом аминокислота 42 представляет собой аминокислоту, отличную от фенилаланина, например, при этом аминокислота 42 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; и при этом аминокислота 20 представляет собой аминокислоту, отличную от аспарагиновой кислоты, например, при этом аминокислота 20 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His или Glu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2I, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; и при этом аминокислота 20 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2I, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; и при этом аминокислота 20 представляет собой Asn, Gln, Lys, Arg или His. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2I, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, а аминокислота 20 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2I, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, а аминокислота 20 представляет собой Gly. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2I, при этом аминокислота 42 представляет собой Val, а аминокислота 20 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью,

стью, изображенной на фиг. 2I, при этом аминокислота 42 представляет собой Leu, а аминокислота 20 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2I, при этом аминокислота 42 представляет собой Ile, а аминокислота 20 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2I, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, а аминокислота 20 представляет собой Asp. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2I, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, а аминокислота 20 представляет собой Gln. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2I, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, а аминокислота 20 представляет собой Lys. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2I, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, а аминокислота 20 представляет собой Arg. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2I, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, а аминокислота 20 представляет собой His. В некоторых случаях описанные выше варианты ИЛ-2 полипептиды с F42/D20-заменами имеют аффинность связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, от около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ. В некоторых случаях такие варианты ИЛ-2 полипептиды связывают ИЛ-2Р с аффинностью связывания, которая по меньшей мере на 5% меньше, по меньшей мере на 10% меньше, по меньшей мере на 15% меньше, по меньшей мере на 20% меньше, по меньшей мере на 30% меньше, по меньшей мере на 35% меньше, по меньшей мере на 40% меньше, по меньшей мере на 45% меньше, по меньшей мере на 50% меньше, по меньшей мере на 55% меньше, по меньшей мере на 60% меньше, по меньшей мере на 65% меньше, по меньшей мере на 70% меньше, по меньшей мере на 80% меньше, по меньшей мере на 85% меньше, по меньшей мере на 90% меньше, по меньшей мере на 95% меньше или более чем на 95% меньше, чем аффинность связывания ИЛ-2 полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2А с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, включающего альфа-, бета- и гамма-цепи, содержащие аминокислотные последовательности (зрелые формы), изображенные на фиг. 3А-3С). В некоторых случаях такой вариантный ИЛ-2 полипептид имеет длину 133 аминокислоты.

Замены F42, D20 и E15.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2J, при этом аминокислота 42 представляет собой аминокислоту, отличную от фенилаланина, например, при этом аминокислота 42 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; при этом аминокислота 20 представляет собой аминокислоту, отличную от аспарагиновой кислоты, например, при этом аминокислота 20 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His или Glu; и при этом аминокислота 15 представляет собой аминокислоту, отличную от глутаминовой кислоты, например, при этом аминокислота 15 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His или Asp. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2J, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 20 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; и при этом аминокислота 15 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному

жит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2К, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Lys, а аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2К, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Arg, а аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2К, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой His, а аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях описанные выше варианты ИЛ-2 полипептиды F42/D20/H16 имеют аффинность связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 до 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, от около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ. В некоторых случаях такие варианты ИЛ-2 полипептиды связывают ИЛ-2Р с аффинностью связывания, которая по меньшей мере на 5% меньше, по меньшей мере на 10% меньше, по меньшей мере на 15% меньше, по меньшей мере на 20% меньше, по меньшей мере на 30% меньше, по меньшей мере на 35% меньше, по меньшей мере на 40% меньше, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55% меньше, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75% меньше, по меньшей мере на 80% меньше, по меньшей мере на 85% меньше, по меньшей мере на 90% меньше, по меньшей мере на 95% меньше или более чем на 95% меньше, чем аффинность связывания ИЛ-2 полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2А с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, включающего альфа-, бета- и гамма-цепи, содержащие аминокислотные последовательности (зрелые формы), изображенные на фиг. 3А-3С). В некоторых случаях такой вариантный ИЛ-2 полипептид имеет длину 133 аминокислоты.

Замены F42, D20 и Q126.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2L, при этом аминокислота 42 является аминокислотой, отличной от фенилаланина, например, при этом аминокислота 42 является Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; при этом аминокислота 20 представляет собой аминокислоту, отличную от аспарагиновой кислоты, например, при этом аминокислота 20 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His или Glu; и при этом аминокислота 126 является аминокислотой, отличной от глутамина, например, при этом аминокислота 126 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Lys, Arg, His, Asp или Glu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2L, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 20 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; и при этом аминокислота 126 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2L, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 20 представляет собой Asn, Gln, Lys, Arg или His; и при этом аминокислота 126 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2L, при этом аминокис-

Ala. В некоторых случаях описанные выше варианты ИЛ-2 полипептиды F42/D20/Y45 имеют аффинность связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 до 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, от около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ. В некоторых случаях такие варианты ИЛ-2 полипептиды связывают ИЛ-2Р с аффинностью связывания, которая по меньшей мере на 5% меньше, по меньшей мере на 10% меньше, по меньшей мере на 15% меньше, по меньшей мере на 20% меньше, по меньшей мере на 30% меньше, по меньшей мере на 35% меньше, по меньшей мере на 40% меньше, по меньшей мере на 45% меньше, по меньшей мере на 50% меньше, по меньшей мере на 55% меньше, по меньшей мере на 60% меньше, по меньшей мере на 65% меньше, по меньшей мере на 70% меньше, по меньшей мере на 80% меньше, по меньшей мере на 85% меньше, по меньшей мере на 90% меньше, по меньшей мере на 95% меньше или более чем на 95% меньше, чем аффинность связывания ИЛ-2 полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2А, с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, включающего альфа-, бета- и гамма-цепи, содержащие аминокислотные последовательности (зрелые формы), изображенные на фиг. 3А-3С). В некоторых случаях такой вариант ИЛ-2 полипептид имеет длину 133 аминокислоты.

Замены F42, D20, Y45 и H16.

В некоторых случаях вариант ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой аминокислоту, отличную от фенилаланина, например, при этом аминокислота 42 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; при этом аминокислота 20 представляет собой аминокислоту, отличную от аспарагиновой кислоты, например, при этом аминокислота 20 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His или Glu; при этом аминокислота 45 представляет собой аминокислоту, отличную от тирозина, например, при этом аминокислота 45 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; и при этом аминокислота 16 представляет собой аминокислоту, отличную от гистидина, например, при этом аминокислота 16 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, Asp или Glu. В некоторых случаях вариант ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 20 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 45 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; и при этом аминокислота 16 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариант ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 20 представляет собой Asn, Gln, Lys, Arg или His; при этом аминокислота 45 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; и при этом аминокислота 16 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариант ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Ala, аминокислота 45 представляет собой Ala и аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариант ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Gly, аминокислота 45 представляет собой Gly и аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариант ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой Val, аминокислота 20 представляет собой Ala, аминокислота 45 представляет собой Gly и аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариант ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой Val, аминокислота 20 представляет собой Ala, аминокислота 45 представляет собой Gly и аминокислота 16 представляет собой Ala.

тельностью, изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой Leu, аминокислота 20 представляет собой Ala, аминокислота 45 представляет собой Gly и аминокислота 16 представляет собой Val. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой Ile, аминокислота 20 представляет собой Ala, аминокислота 45 представляет собой Ala и аминокислота 16 представляет собой Gly. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Asp, аминокислота 45 представляет собой Ala и аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Gln, аминокислота 45 представляет собой Ala и аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Lys, аминокислота 45 представляет собой Ala и аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Arg, аминокислота 45 представляет собой Ala и аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой His, аминокислота 45 представляет собой Ala и аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях описанные выше варианты ИЛ-2 полипептиды F42/D20/Y45/H16 имеют аффинность связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, от около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ. В некоторых случаях такие варианты ИЛ-2 полипептиды связывают ИЛ-2Р с аффинностью связывания, которая по меньшей мере на 5% меньше, на 10% меньше, по меньшей мере на 15% меньше, по меньшей мере на 20% меньше, по меньшей мере на 30% меньше, по меньшей мере на 35% меньше, по меньшей мере на 40% меньше, по меньшей мере на 45% меньше, по меньшей мере на 50% меньше, по меньшей мере на 55% меньше, по меньшей мере на 60% меньше, по меньшей мере на 65% меньше, по меньшей мере на 70% меньше, по меньшей мере на 80% меньше, по меньшей мере на 85% меньше, по меньшей мере на 90% меньше, по меньшей мере на 95% меньше или более чем на 95% меньше, чем аффинность связывания ИЛ-2 полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2А с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, включающего альфа-, бета- и гамма-цепи, содержащие аминокислотные последовательности (зрелые формы), изображенные на фиг. 3А-3С). В некоторых случаях такой вариантный ИЛ-2 полипептид имеет длину 133 аминокислоты.

Замены F42, D20, Y45 и Q126.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2О, при этом аминокислота 42 представляет собой аминокислоту, отличную от фенилаланина, например, при этом аминокислота 42 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; при этом аминокислота 20 представляет собой аминокислоту, отличную от аспарагиновой кислоты, например, при этом аминокислота 20 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His или Glu; при этом аминокислота 45 представляет собой аминокислоту, отличную от тирозина, например, при этом аминокислота 45 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или

следовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 20, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой His, аминокислота 45 представляет собой Ala и аминокислота 126 представляет собой Ala. В некоторых случаях описанные выше варианты ИЛ-2 полипептиды F42/D20/Y45/Q126 имеют аффинность связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, до около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ. В некоторых случаях такие варианты ИЛ-2 полипептиды связывают ИЛ-2Р с аффинностью связывания, которая по меньшей мере на 5% меньше, по меньшей мере на 10% меньше, по меньшей мере на 15% меньше, по меньшей мере на 20% меньше, по меньшей мере на 30% меньше, по меньшей мере на 35% меньше, по меньшей мере на 40% меньше, по меньшей мере на 45% меньше, по меньшей мере на 50% меньше, по меньшей мере на 55% меньше, по меньшей мере на 60% меньше, по меньшей мере на 65% меньше, по меньшей мере на 70% меньше, по меньшей мере на 80% меньше, по меньшей мере на 85% меньше, по меньшей мере на 90% меньше, по меньшей мере на 95% меньше или более чем на 95% меньше, чем аффинность связывания ИЛ-2 полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2А с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, включающего альфа-, бета- и гамма-цепи, содержащие аминокислотные последовательности (зрелые формы), изображенные на фиг. 3А-3С). В некоторых случаях такой вариантный ИЛ-2 полипептид имеет длину 133 аминокислоты.

Замены F42, D20, Y45, H16 и Q126.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2Р, при этом аминокислота 42 представляет собой аминокислоту, отличную от фенилаланина, например, при этом аминокислота 42 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; при этом аминокислота 20 представляет собой аминокислоту, отличную от аспарагиновой кислоты, например, при этом аминокислота 20 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His или Glu; при этом аминокислота 45 представляет собой аминокислоту, отличную от тирозина, например, при этом аминокислота 45 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; при этом аминокислота 126 представляет собой аминокислоту, отличную от глутамина, например, при этом аминокислота 126 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Arg, His, Asp или Glu; и при этом аминокислота 16 представляет собой аминокислоту, отличную от гистидина, например, при этом аминокислота 16 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, Asp или Glu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2Р, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 20 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 45 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 126 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; и при этом аминокислота 16 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2Р, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 20 представляет собой Asn, Gln, Lys, Arg или His; при этом аминокислота 45 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 126 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; и при этом аминокислота 16 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2Р, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Ala, аминокислота 45 представляет собой Ala, аминокислота 126 представляет собой Ala и аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2Р, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Gly, аминокислота 45 представляет собой Gly, аминокислота 126 представляет собой Ala и аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный

меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2Q, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 126 представляет собой Arg, а аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2Q, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 126 представляет собой His, а аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях варианты ИЛ-2 полипептиды F42/Q126/H16 имеют аффинность связывания с ИЛ-2R, которая составляет около от 100 нМ до 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, от около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около от 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ. В некоторых случаях такие варианты ИЛ-2 полипептиды связывают ИЛ-2R с аффинностью связывания, которая по меньшей мере на 5% меньше, на 10% меньше, по меньшей мере на 15% меньше, по меньшей мере на 20% меньше, по меньшей мере на 30% меньше, по меньшей мере на 35% меньше, по меньшей мере на 40% меньше, по меньшей мере на 45% меньше, по меньшей мере на 50% меньше, по меньшей мере на 55% меньше, по меньшей мере на 60% меньше, по меньшей мере на 65% меньше, по меньшей мере на 70% меньше, по меньшей мере на 75% меньше, по меньшей мере на 80% меньше, по меньшей мере на 85% меньше, по меньшей мере на 90% меньше, по меньшей мере на 95% меньше или более чем на 95% меньше, чем аффинность связывания ИЛ-2 полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2A с ИЛ-2R (например, ИЛ-2R, включающего альфа-, бета- и гамма-цепи, содержащие аминокислотные последовательности (зрелые формы), изображенные на фиг. 3A-3C). В некоторых случаях такой вариантный ИЛ-2 полипептид имеет длину 133 аминокислоты.

Слитые полипептиды.

Данное изобретение обеспечивает слитые полипептиды ИЛ-2. Слитый полипептид по данному изобретению содержит

- a) вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению; и
- b) гетерологичный партнер по слиянию.

В некоторых случаях гетерологичный партнер по слиянию слит с N-концом вариантного ИЛ-2 полипептида. В некоторых случаях гетерологичный партнер по слиянию слит с C-концом вариантного ИЛ-2 полипептида. В некоторых случаях слитый ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит первый гетерологичный партнер по слиянию, слитый с N-концом вариантного ИЛ-2 полипептида, и второй гетерологичный партнер по слиянию, слитый с C-концом вариантного ИЛ-2 полипептида.

Общая длина слитого ИЛ-2 полипептида по данному изобретению может варьироваться от 135 до 2000 аминокислот. Например, слитый ИЛ-2 полипептид по данному изобретению может быть в диапазоне от 135 до 150 аминокислот, от 150 до 175 аминокислот, от 175 до 200 аминокислот, от 200 до 225 аминокислот, от 225 до 250 аминокислот, от 250 до 275 аминокислот, от 275 до 300 аминокислот, от 300 до 350 аминокислот, от 350 до 400 аминокислот, от 400 до 450 аминокислот, от 450 до 500 аминокислот, от 500 до 600 аминокислот, от 600 до 700 аминокислот, от 700 до 800 аминокислот, от 800 до 900 аминокислот, от 900 до 1000 аминокислот, от 1000 до 1250 аминокислот, от 1250 до 1500 аминокислот, от 1500 до 1750 аминокислот или от 1750 до 2000 аминокислот.

Подходящие партнеры по слиянию включают, но не ограничиваются ими, трансмембранный домен; Fc-область антитела; антигенсвязывающая область антитела; цитокин (кроме ИЛ-2); иммуномодуляторный домен; внутриклеточный сигнальный домен и т.п.

Мультимерные полипептиды, модулирующие Т-клетки.

Данное изобретение обеспечивает мультимерные (например, гетеродимерные, гетеротримерные) полипептиды. Указанные мультимерные полипептиды являются полипептидами, модулирующими Т-клетки, а также упоминаются в данном документе как "мультимерные полипептиды, модулирующие Т-клетки" или "synTas" (от "иммунологический синапс для активации Т-клеток"). Фиг. 1A-1D демонстрирует схематические изображения мультимерных полипептидов, модулирующих Т-клетки, по данному изобретению. Мультимерный полипептид, модулирующий Т-клетки, по данному изобретению также обозначается как "ИЛ-2/synTas", "полипептид synTas" или "мультимерный полипептид".

В некоторых случаях полипептид synTas по данному изобретению содержит ИЛ-2 полипептид дикого типа. В некоторых случаях полипептид synTas по данному изобретению содержит одну копию ИЛ-2 полипептида дикого типа. В некоторых случаях полипептид synTas по данному изобретению содержит две копии ИЛ-2 полипептида дикого типа. В некоторых случаях полипептид synTas по данному изобретению содержит три копии ИЛ-2 полипептида дикого типа. В некоторых случаях ИЛ-2 полипептид дикого типа содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей

мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2А.

В некоторых случаях полипептид *supTas* по данному изобретению содержит вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению. Как отмечено выше, вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, проявляет пониженную аффинность связывания с ИЛ-2Р по сравнению с аффинностью связывания ИЛ-2 дикого типа с ИЛ-2Р. Мультимерный полипептид по данному изобретению, который содержит вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению, также проявляет пониженную аффинность связывания с ИЛ-2Р по сравнению с контрольным мультимерным полипептидом, содержащим ИЛ-2 дикого типа с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, содержащим альфа-, бета- и гамма-полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности (зрелая форма), изображенные на фиг. 3А-3С).

В некоторых случаях полипептид *supTas* по данному изобретению проявляет пониженную аффинность связывания с ИЛ-2Р по сравнению с аффинностью связывания ИЛ-2 полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2А с ИЛ-2Р. Например, в некоторых случаях полипептид *supTas* по данному изобретению связывает ИЛ-2Р с аффинностью связывания, которая меньше, чем аффинность связывания контрольного полипептида *supTas*, содержащего ИЛ-2 полипептид, содержащего аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2А с ИЛ-2Р, который содержит альфа-, бета- и гамма-полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности (зрелая форма), изображенные на фиг. 3А-3С. Например, в некоторых случаях полипептид *supTas* по данному изобретению связывает ИЛ-2Р с аффинностью связывания, которая составляет по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере на 50% меньше, по меньшей мере на 55% меньше, по меньшей мере на 60% меньше, по меньшей мере на 65% меньше, по меньшей мере на 70% меньше, по меньшей мере на 75% меньше, по меньшей мере на 80% меньше, по меньшей мере на 85% меньше, по меньшей мере на 90% меньше, по меньшей мере на 95% меньше или более чем на 95% меньше, чем аффинность связывания контрольного полипептида *supTas*, содержащего ИЛ-2 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2А с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, содержащим альфа-, бета- и гамма-полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности (зрелая форма), изображенные на фиг. 3А-3С).

В некоторых случаях полипептид *supTas* по данному изобретению имеет аффинность связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от 100 нМ до около 100 мкМ. В некоторых случаях полипептид *supTas* по данному изобретению имеет аффинность связывания с ИЛ-2Р, которая составляет около от 100 до 500 нМ. Например, в некоторых случаях полипептид *supTas* по данному изобретению обладает аффинностью связывания с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, содержащим альфа-, бета- и гамма-полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности (зрелая форма), изображенные на фиг. 3А-3С), которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 450 нМ или от около 450 нМ до около 500 нМ. В некоторых случаях полипептид *supTas* по данному изобретению обладает аффинностью связывания с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, содержащим альфа-, бета- и гамма-полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности (зрелая форма), изображенные на фиг. 3А-3С) от около 500 нМ до 1 мкМ. Например, в некоторых случаях полипептид *supTas* по данному изобретению обладает аффинностью связывания с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, содержащим альфа-, бета- и гамма-полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности (зрелая форма), изображенные на фиг. 3А-3С), которая составляет от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ или от около 900 нМ до около 1 мкМ. В некоторых случаях полипептид *supTas* по данному изобретению обладает аффинностью связывания с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, содержащим альфа-, бета- и гамма-полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности (зрелая форма), изображенные на фиг. 3А-3С.) от около 1 до 10 мкМ. Например, в некоторых случаях полипептид *supTas* по данному изобретению обладает аффинностью связывания с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, содержащим альфа-, бета- и гамма-полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности (зрелая форма), изображенные на фиг. 3А-3С), которая составляет от около 1 до 2 мкМ, от около 2 мкМ до около 3 мкМ, от около 3 мкМ до около 4 мкМ, от около 4 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 6 мкМ, от около 6 мкМ до около 7 мкМ, от около 7 мкМ до около 8 мкМ, от около 8 мкМ до около 9 мкМ или от около 9 мкМ до около 10 мкМ. В некоторых случаях полипептид *supTas* по данному изобретению обладает аффинностью связывания с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, содержащим альфа-, бета- и гамма-полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности (зрелая форма), изображенные на фиг. 3А-3С) от около 10 до 100 мкМ. Например, в некоторых случаях полипептид *supTas* по данному изобретению обладает аффинностью связывания с ИЛ-2Р (например, ИЛ-2Р, содержащим альфа-, бета- и гамма-полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности (зрелая форма), изображенные на фиг. 3А-3С), которая составляет от около 10 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 30 мкМ, от около 30 мкМ до около 40 мкМ, от около 40 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 60 мкМ,

от около 60 мкМ до около 70 мкМ, от около 70 мкМ до около 80 мкМ, от около 80 мкМ до около 90 мкМ или от около 90 до около 100 мкМ.

Определение аффинности связывания.

Аффинность связывания между иммуномодуляторным полипептидом и его когнатным коиммуномодуляторным полипептидом может быть определена с помощью биослойной интерферометрии (BLI - bio-layer interferometry) с использованием очищенного иммуномодуляторного полипептида и очищенного когнатного коиммуномодуляторного полипептида. Аффинность связывания между *supTas* по данному изобретению и его когнатным коиммуномодуляторным полипептидом также может быть определена с помощью BLI с использованием очищенного *supTas* и когнатного коиммуномодуляторного полипептида. Способы BLI хорошо известны специалистам в данной области. См, например, Lad et al. (2015), J. Biomol. Screen., 20(4):498-507; и Shah and Duncan (2014), J. Vis. Exp., 18:e51383. Специфичные и относительные аффинности связывания, описанные в этом изобретении, между иммуномодуляторным полипептидом и его когнатным коиммуномодуляторным полипептидом или между *supTas* и его родственным иммуномодуляторным полипептидом могут быть определены с использованием следующих процедур.

Чтобы определить аффинность связывания между *supTas* по данному изобретению и его когнатным коиммуномодуляторным полипептидом, анализ BLI может быть выполнен с использованием прибора Octet RED 96 (Pal FortéBio) или аналогичного прибора, как указано ниже. Для определения аффинности связывания, мультимерного полипептида, модулирующего Т-клетки, (например, *supTas* по данному изобретению или контрольного, мультимерного полипептида, модулирующего Т-клетки (причем контрольный мультимерный полипептид, модулирующий Т-клетки, содержит иммуномодуляторный полипептид дикого типа)), мультимерный полипептид, модулирующий Т-клетки, иммобилизуют на нерастворимом носителе ("биосенсор"). Иммобилизованный, мультимерный полипептид, модулирующий Т-клетки, является "мишенью/целью". Иммобилизация может быть осуществлена путем иммобилизации захватывающего антитела на нерастворимом носителе, причем захватывающее антитело иммобилизует, мультимерный полипептид, модулирующий Т-клетки. Например, иммобилизация может быть осуществлена путем иммобилизации антител против Fc (например, против Fc IgG человека) на нерастворимом носителе, причем иммобилизованные антитела против Fc связываются и иммобилизуют, мультимерный полипептид, модулирующий Т-клетки, (причем мультимерный полипептид, модулирующий Т-клетки, содержит полипептид IgFc). Коиммуномодуляторный полипептид наносят в нескольких различных концентрациях на иммобилизованный, мультимерный полипептид, модулирующий Т-клетки, и регистрируют реакцию прибора. Анализы проводят в жидкой среде, содержащей 25 мМ HEPES, pH 6,8, 5% поли(этиленгликоля) 6000, 50 мМ KCl, 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 0,02% неионогенного детергента Твин 20. Связывание коиммуномодуляторного полипептида с иммобилизованным Т-клеточным модулирующим мультимерным полипептидом проводят при 30°C. В качестве положительного контроля аффинности связывания можно использовать моноклональное антитело против ГКГС класса I. Например, можно использовать моноклональное антитело против ЧЛА класса I W6/32 (Американская коллекция типовых культур, № HB-95; Parham et al. (1979), J. Immunol., 123:342) с K_D 7 нМ. Стандартная кривая может быть получена с использованием серийных разведений моноклонального антитела против ГКГС класса I. Коиммуномодуляторный полипептид, или мАт против ГКГС класса I, является "аналитом". BLI анализирует интерференционную картину белого света, отраженного от двух поверхностей

- i) от иммобилизованного полипептида ("мишень/цель"); и
- ii) внутреннего эталонного слоя.

Изменение количества молекул ("аналит"; например, коиммуномодуляторный полипептид; антитело против ЧЛА), связанных с наконечником биосенсора, вызывает изменение интерференционной картины; этот сдвиг в интерференционной картине может быть измерен в реальном времени. Двумя кинетическими терминами, которые описывают аффинность взаимодействия мишени/цели и аналита, являются константа ассоциации (k_a) и константа диссоциации (k_d). Отношение этих двух терминов (k_a/k_d) дает константу аффинности K_D .

Как отмечено выше, определение связывающей аффинности между иммуномодуляторным полипептидом (например, ИЛ-2 или вариантом ИЛ-2) и его когнатным коиммуномодуляторным полипептидом (например, ИЛ-2Р) также может быть определено с помощью BLI. Анализ аналогичен описанному выше для мультимерного полипептида *supTas*. Анализ BLI может быть выполнен с использованием прибора Octet RED 96 (Pal FortéBio) или аналогичного прибора следующим образом. Компонентный иммуномодуляторный полипептид *supTas* по данному изобретению (например, вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению); и контрольный иммуномодуляторный полипептид (причем контрольный иммуномодуляторный полипептид содержит иммуномодуляторный полипептид дикого типа, например, ИЛ-2 дикого типа) иммобилизуют на нерастворимом носителе ("биосенсор"). Иммуномодуляторный полипептид является "мишенью/целью". Иммобилизация может быть осуществлена путем иммобилизации захватывающего антитела на нерастворимом носителе, причем захватывающее антитело иммобилизует иммуномодуляторный полипептид. Например, если мишень/цель сливают с иммуноаффинной меткой (например, FLAG, Fc IgG человека), иммобилизация может быть осуществлена путем иммобилиза-

ции с помощью соответствующего антитела к иммуноаффинной метке (например, против Fc IgG человека) на нерастворимом носителе, причем иммобилизованные антитела связываются и иммобилизуют иммуномодуляторный полипептид (причем иммуномодуляторный полипептид содержит Fc-полипептид Ig). Коиммуномодуляторный полипептид (или полипептиды) наносят в нескольких различных концентрациях на иммобилизованный иммуномодуляторный полипептид и регистрируют реакцию прибора. Альтернативно коиммуномодуляторный полипептид (или полипептиды) иммобилизуют в биосенсоре (например, для гетеротримера рецептора ИЛ-2, в качестве мономерной субъединицы, гетеродимерного подкомплекса или полного гетеротримера) и иммуномодуляторный полипептид применяют в нескольких различных концентрациях к иммобилизованному коиммуномодуляторному полипептиду(ам), и реакция прибора регистрируется. Анализы проводят в жидкой среде, содержащей 25 мМ HEPES, pH 6,8, 5% поли(этиленгликоль) 6000, 50 мМ KCl, 0,1% бычий сывороточный альбумин и 0,02% неионогенного детергента Твин 20. Связывание коиммуномодуляторного полипептида с иммобилизованным иммуномодуляторным полипептидом проводят при 30°C. В качестве положительного контроля аффинности связывания можно использовать моноклональное антитело против ГКГС класса I. Например, можно использовать моноклональное антитело против ЧЛА класса I W6/32 (Американская коллекция типовых культур, № NB-95; Parham et al. (1979), J. Immunol., 123: 342) с K_D 7 нМ. Стандартная кривая может быть получена с использованием серийных разведений моноклонального антитела против ГКГС класса I. Коиммуномодуляторный полипептид, или мАт против ГКГС класса I, является "аналитом". ВLI анализирует интерференционную картину белого света, отраженного от двух поверхностей

- i) от иммобилизованного полипептида ("мишень/цель"); и
- ii) внутреннего эталонного слоя.

Изменение количества молекул ("аналит"; например, коиммуномодуляторный полипептид; антитело против ЧЛА), связанных с наконечником биосенсора, вызывает изменение интерференционной картины; этот сдвиг в интерференционной картине может быть измерен в реальном времени. Двумя кинетическими терминами, которые описывают аффинность взаимодействия мишени/цели и аналита, являются константа ассоциации (k_a) и константа диссоциации (k_d). Отношение этих двух терминов (k_a/k_d) дает константу аффинности K_D . Определение аффинности связывания как иммуномодуляторного полипептида дикого типа (например, ИЛ-2) с его рецептором (например, ИЛ-2Р), так и вариантного иммуномодуляторного полипептида (например, вариантного ИЛ-2, как описано в данном документе) с его когнатным коиммуномодуляторным полипептидом (например, его рецептором) (например, ИЛ-2Р), таким образом, позволяет определить относительную аффинность связывания варианта коиммуномодуляторного полипептида по сравнению с коиммуномодуляторным полипептидом дикого типа с когнатным коиммуномодуляторным полипептидом. Т.е. можно определить, снижается ли аффинность связывания вариантного иммуномодуляторного полипептида с его рецептором (его родственным иммуномодуляторным полипептидом) по сравнению с аффинностью связывания иммуномодуляторного полипептида дикого типа с тем же родственным иммуномодуляторным полипептидом и, если это так, каково процентное снижение по сравнению с аффинностью связывания коиммуномодуляторного полипептида дикого типа.

Анализ ВLI проводят в многолуночном планшете. Для проведения анализа создают схему планшета, планируют этапы анализа и назначают биосенсоры в программном обеспечении Octet Data Acquisition. Биосенсорная сборка гидратируется. Сборку гидратированного биосенсора и планшет для анализа адаптируют в течение 10 мин на приборе Octet. Сразу после получения, полученные данные загружаются в программу анализа данных Octet. Данные обрабатываются в окне обработки путем указания способа вычитания эталона, выравнивания по оси Y, межшаговой коррекции и фильтрации Савицкого-Голея. Данные анализируются в окне анализа путем указания шагов для анализа (ассоциация и диссоциация), выбора модели подбора кривой (1:1), способа подгонки (глобального) и окна интереса (в секундах). Оценивается качество подгонки. Значения K_D для каждой кривой данных (концентрация аналита) могут быть усреднены, если они находятся в пределах 3-кратного диапазона. Значения ошибки K_D должны быть в пределах одного порядка значений константы сродства. Значения R^2 должны быть выше 0,95. См., например, Abdiche et al. (2008), J. Anal. Biochem., 377:209.

В некоторых случаях отношение i) аффинности связывания контрольного, мультимерного полипептида, модулирующего Т-клетки (при этом контроль включает иммуномодуляторный полипептид дикого типа, например, ИЛ-2 дикого типа) с когнатным коиммуномодуляторным полипептидом (например, ИЛ-2Р) к ii) аффинности связывания, мультимерного полипептида, модулирующего Т-клетки, по данному изобретению, содержащего вариант иммуномодуляторного полипептида дикого типа (например, вариантный ИЛ-2) с родственным иммуномодуляторным полипептидом (например, ИЛ-2Р) при измерении с помощью ВLI (как описано выше) составляет по меньшей мере 1,5:1, по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 50:1, по меньшей мере 100:1, по меньшей мере 500:1, по меньшей мере 10^2 :1, по меньшей мере 5×10^2 :1, по меньшей мере 10^3 :1, по меньшей мере 5×10^3 :1, по меньшей мере 10^4 :1, по меньшей мере 10^5 :1 или по меньшей мере 10^6 :1. В некоторых случаях отношение i) аффинности связывания контрольного, мультимерного полипептида, модулирующего Т-клетки (причем контроль включает иммуномодуляторный полипептид дикого типа) к когнатному коиммуномодуляторному полипептиду к ii) аффинно-

сильного конца (С-конца)

- a) эпитоп (например, Т-клеточный эпитоп);
- b) первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС); и
- c) иммуномодуляторный полипептид (например, вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению); и

при этом второй полипептид содержит в порядке от N-конца к С-концу

- a) второй полипептид ГКГС; и
- b) Fc-полипептид иммуноглобулина (Ig).

В других случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит первый полипептид и второй полипептид, причем первый полипептид содержит от N-конца к С-концу

- a) эпитоп (например, эпитоп Т-клеток); и
- b) первый полипептид ГКГС; и

при этом указанный второй полипептид содержит в порядке от N-конца к С-концу

a) иммуномодуляторный полипептид (например, вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению);

- b) второй полипептид ГКГС; и
- c) Fc-полипептид Ig.

В некоторых случаях первый и второй полипептиды ГКГС являются полипептидами ГКГС класса I; например, в некоторых случаях первый полипептид ГКГС представляет собой полипептид β 2-микροглобулина (B2M или β 2M) ГКГС класса I, а второй полипептид ГКГС представляет собой тяжелую цепь ГКГС класса I (H-цепь); или первый полипептид ГКГС представляет собой H-цепь ГКГС класса I, и второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид β 2M ГКГС класса I). В других случаях первый и второй полипептиды ГКГС являются полипептидами ГКГС класса II; например, в некоторых случаях первый полипептид ГКГС представляет собой полипептид α -цепи ГКГС класса II, а второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид β -цепи ГКГС класса II. В других случаях первый полипептид представляет собой полипептид β -цепи ГКГС класса II, а второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид α -цепи ГКГС класса II. В некоторых случаях мультимерный полипептид содержит два или более иммуномодуляторных полипептида, причем по меньшей мере один из иммуномодуляторных полипептидов представляет собой вариантный иммуномодуляторный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению. Когда мультимерный полипептид по данному изобретению включает два или более иммуномодуляторных полипептида, в некоторых случаях два или более иммуномодуляторных полипептида присутствуют в одной и той же полипептидной цепи и могут находиться в тандеме. Когда мультимерный полипептид по данному изобретению включает два или более иммуномодуляторных полипептида, в некоторых случаях два или более иммуномодуляторных полипептида присутствуют в отдельных полипептидах. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению представляет собой гетеродимер. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению представляет собой тримерный полипептид.

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит

- a) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к С-концу
 - i) эпитоп, и
 - ii) первый полипептид ГКГС; и
- b) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к С-концу
 - i) второй полипептид ГКГС, и
 - ii) Fc-полипептид Ig, и
 - iii) иммуномодуляторный домен (например, вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению).

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит

- a) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к С-концу
 - i) эпитоп, и
 - ii) первый полипептид ГКГС; и
- b) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к С-концу
 - i) второй полипептид ГКГС, и
 - ii) иммуномодуляторный домен (например, вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению).

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит

- a) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к С-концу
 - i) эпитоп, и
 - ii) первый полипептид ГКГС; и
- b) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к С-концу
 - i) иммуномодуляторный домен (например, вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению), и
 - ii) второй полипептид ГКГС.

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит

- a) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к С-концу

i) эпитоп,
 ii) первый полипептид ГКГС, и
 iii) иммуномодуляторный домен (например, вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению); и

b) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) второй полипептид ГКГС.

В некоторых случаях, когда мультимерный полипептид по данному изобретению содержит не-Ig-каркас, этот не-Ig-каркас представляет собой пептид ХТЕН, полипептид трансферрина, полипептид рецептора Fc, эластиноподобный полипептид, шелкоподобный полипептид, или шелкоподобный эластиноподобный полипептид.

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению является одновалентным. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению является многовалентным. В некоторых случаях многовалентный мультимерный полипептид по данному изобретению содержит Fc-полипептид иммуноглобулина на одном из первого или второго полипептида. Например, в зависимости от полипептида Fc, присутствующего в мультимерном полипептиде по данному изобретению, мультимерный полипептид может представлять собой гомодимер, причем две молекулы мультимерного полипептида присутствуют в гомодимере, причем две молекулы мультимерного полипептида могут быть дисульфидно связаны друг с другом, например, через Fc-полипептид, присутствующий в двух молекулах. В качестве другого примера, мультимерный полипептид по данному изобретению может содержать три, четыре или пять молекул мультимерного полипептида, причем молекулы мультимерного полипептида могут быть дисульфидно связаны друг с другом, например, через Fc-полипептид, присутствующий в молекулах.

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит

a) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) эпитоп,

ii) полипептид β 2M, и

iii) вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению; и

b) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) тяжелую цепь ГКГС класса I, и

ii) Fc-полипептид.

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит

a) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) эпитоп, и

ii) полипептид β 2M; и

b) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению,

ii) тяжелую цепь ГКГС класса I, и

iii) Fc-полипептид.

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит

a) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) эпитоп,

ii) полипептид β 2M,

iii) первый вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению,

iv) второй вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению, и

v) третий вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению; и

b) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) тяжелую цепь ГКГС класса I, и

ii) Fc-полипептид.

В некоторых случаях первый, второй и третий варианты ИЛ-2 полипептиды имеют одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых случаях первый, второй и третий варианты ИЛ-2 полипептиды отличаются друг от друга по аминокислотной последовательности. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит

a) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) эпитоп, и

ii) полипептид β 2M; и

b) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) первый вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению,

ii) второй вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению, и

iii) третий вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению,

iv) тяжелую цепь ГКГС класса I, и

v) Fc-полипептид.

В некоторых случаях первый, второй и третий варианты ИЛ-2 полипептиды имеют одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых случаях первый, второй и третий варианты ИЛ-2 полипептиды отличаются друг от друга по аминокислотной последовательности.

Линкеры.

Мультимерный полипептид по данному изобретению может включать линкерные пептиды, расположенные между, например, эпитопом и полипептидом ГКГС; между полипептидом ГКГС и иммуномодуляторным полипептидом; между полипептидом ГКГС и Fe-полипептидом Ig; между первым вариантом ИЛ-2 полипептидом и вторым вариантом ИЛ-2 полипептидом; или между вторым вариантом ИЛ-2 полипептидом и третьим вариантом ИЛ-2 полипептидом.

Подходящие линкеры (также называемые "спейсерами") могут быть легко выбраны и могут иметь любую из подходящих длин, таких как от 1 до 25 аминокислот, от 3 до 20 аминокислот, от 2 до 15 аминокислот, от 3 до 12 аминокислот, в том числе от 4 до 10 аминокислот, от 5 до 9 аминокислот, от 6 до 8 аминокислот или от 7 до 8 аминокислот. Подходящий линкер может быть 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот в длину.

Иллюстративные линкеры включают глициновые полимеры $(G)_n$, глицин-сериновые полимеры (включая, например, $(GS)_n$, $(GSGS)_n$ (SEQ ID NO: 89) и $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 86), причем n представляет собой целое число, по меньшей мере 1), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в данной области. Могут быть использованы глициновые и глицин-сериновые полимеры; как Gly, так и Ser относительно неструктурированы и, следовательно, могут служить нейтральными связующими между компонентами. Полимеры глицина могут быть использованы; глицин получает доступ к значительно большему пространству ϕ - ψ , чем даже аланин, и гораздо менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem., 11173-142 (1992)). Иллюстративные линкеры могут содержать аминокислотные последовательности, включая, но не ограничиваясь этим, GGSG (SEQ ID NO: 2), GSGG (SEQ ID NO: 3), GSGSG (SEQ ID NO: 4), GSGGG (SEQ ID NO: 5), GGGSG (SEQ ID NO: 6), GSSSG (SEQ ID NO: 7) и т.п. Иллюстративные линкеры могут включать, например, $Gly(Ser_4)_n$, причем n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность $(GSSSS)_n$ (SEQ ID NO: 93), причем n равно 4. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность $(GSSSS)_n$ (SEQ ID NO: 94), причем n равно 5. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 9), причем n равно 1. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 92), причем n равно 2. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 89), причем n равно 3. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 90), причем n равно 4. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 91), причем n равно 5.

В некоторых случаях линкерный полипептид, присутствующий в первом полипептиде мультимерного полипептида по данному изобретению, включает остаток цистеина, который может образовывать дисульфидную связь с остатком цистеина, присутствующим во втором полипептиде мультимерного полипептида по данному изобретению. В некоторых случаях, например, подходящий линкер содержит аминокислотную последовательность $GCGASGGGGSGGGGS$ (SEQ ID NO: 10).

Эпитопы.

Эпитоп, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, может иметь длину от около 4 аминокислот до около 25 аминокислот, например, эпитоп может иметь длину от 4 аминокислот (ак) до 10 ак, от 10 до 15 ак, от 15 до 20 ак или от 20 до 25 ак. Например, эпитоп, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, может иметь длину 4 аминокислоты (ак), 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 ак. В некоторых случаях эпитоп, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, имеет длину от 5 аминокислот до 10 аминокислот, например, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ак.

Эпитоп, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, специфически связан с Т-клеткой, т.е. эпитоп специфически связан с эпитоп-специфичной Т-клеткой. Эпитоп-специфичная Т-клетка связывает эпитоп, имеющий контрольную аминокислотную последовательность, но по существу не связывает эпитоп, который отличается от контрольной аминокислотной последовательности. Например, специфичная к эпитопу Т-клетка связывает эпитоп, имеющий контрольную аминокислотную последовательность, и связывает эпитоп, который отличается от контрольной аминокислотной последовательности, если вообще связывает, с аффинностью менее чем 10^{-6} М, менее чем 10^{-5} М или менее чем 10^{-4} М. Эпитоп специфичные Т-клетки могут связываться с эпитопом, для которого они являются специфичными с аффинностью по меньшей мере 10^{-7} М, по меньшей мере 10^{-8} М, по меньшей мере 10^{-9} М или по меньшей мере 10^{-10} М.

Подходящие эпитопы включают, но не ограничиваются ими, эпитопы, присутствующие в антигене, связанном с раком. Связанные с раком антигены включают, но не ограничиваются ими, α -фолатный рецептор; карбоангидразу IX (CAIX); CD19; CD20; CD22; CD30; CD33; CD44v7/8; карциноэмбриональный

антиген (CEA -carcinoembryonic antigen); эпителиальный гликопротеин-2 (EGP-2 - epithelial glycoprotein-2); эпителиальный гликопротеин-40 (EGP-40 - epithelial glycoprotein-40); белок, связывающий фолат (FBP - folate binding protein); фетальный ацетилхолиновый рецептор; ганглиозидный антиген GD2; HER2/Neu; ИЛ-13P-a2; легкую цепь каппа; LeY; молекулу адгезии клеток L1; ассоциированный с меланомой антиген (MAGE - melanoma-associated antigen); MAGE-A1; мезотелин; MUC1; лиганды NKG2D; онкофетальный антиген (h5T4); антиген стволовых клеток простаты (PSCA - prostate stem cell antigen); простат-специфический мембранный антиген (PSMA - prostate-specific membrane antigen); ассоциированный с опухолью гликопротеин-72 (TAG-72 - tumor-associate glycoprotein-72); и рецептор-2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-R2 - vascular endothelial growth factor receptor-2). См., например, Vigneron et al. (2013), *Cancer Immunity*, 13:15; и Vigneron (2015), *BioMed Res. Int'l Article ID 948501*. В некоторых случаях эпитоп представляет собой эпитоп антигена E7 вируса папилломы человека; см., например, Ramos et al. (2013), *J. Immunother.*, 36:66.

В некоторых случаях эпитоп представляет собой ВПЧ16Е7/82-90 (LLMGTLGIV; SEQ ID NO: 11). В некоторых случаях эпитоп представляет собой ВПЧ16Е7/86-93 (TLGIVCPI; SEQ ID NO: 12). В некоторых случаях эпитоп представляет собой ВПЧ16Е7/11-20 (YMLDLQPETT; SEQ ID NO: 13). В некоторых случаях эпитоп представляет собой ВПЧ16Е7/11-19 (YMLDLQPET; SEQ ID NO: 87). См., например, Rensing et al. ((1995) *J. Immunol.*, 154:5934) для дополнительных подходящих эпитопов ВПЧ (HPV - human papilloma virus).

Полипептиды ГКГС.

Как отмечено выше, мультимерный полипептид по данному изобретению включает полипептиды ГКГС. Для целей по данному изобретению термин "полипептиды главного комплекса гистосовместимости (ГКГС)" включает полипептиды ГКГС различных видов, в том числе полипептиды человеческого ГКГС (также называемые человеческими лейкоцитарными антигенами (ЧЛА)), полипептиды ГКГС грызунов (например, мыши, крысы и т.д.) и полипептиды ГКГС других видов млекопитающих (например, лагоморфов, приматов, отличных от человека, собачьих, кошачьих, копытных (например, лошадей, быков, овец, козлиных и т.д.) и т.п. Подразумевается, что термин "полипептид ГКГС" включает полипептиды ГКГС класса I (например, β -2-микроглобулин и тяжелую цепь ГКГС класса I) и полипептиды ГКГС класса II (например, полипептид ГКГС класса II α и полипептид ГКГС класса II β).

Как отмечено выше, в некоторых вариантах осуществления мультимерного полипептида по данному изобретению первый и второй полипептиды ГКГС являются полипептидами ГКГС класса I; например, в некоторых случаях первый полипептид ГКГС представляет собой полипептид β 2-микроглобулина (β 2М) ГКГС класса I, а второй полипептид ГКГС представляет собой тяжелую цепь ГКГС класса I (H-цепь). В других случаях первый и второй полипептиды ГКГС являются полипептидами ГКГС класса II; например, в некоторых случаях первый полипептид ГКГС представляет собой полипептид α -цепи ГКГС класса II, а второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид β -цепи ГКГС класса II. В других случаях первый полипептид представляет собой полипептид β -цепи ГКГС класса II, а второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид α -цепи ГКГС класса II.

В некоторых случаях полипептид ГКГС мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой полипептид ГКГС человека, причем полипептиды ГКГС человека также называют полипептидами лейкоцитарного антигена человека (ЧЛА). В некоторых случаях полипептид ГКГС мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой полипептид ЧЛА класса I, например полипептид β 2-микроглобулина или полипептид тяжелой цепи ЧЛА класса I. Полипептиды тяжелой цепи ЧЛА класса I включают полипептиды тяжелой цепи ЧЛА-A, полипептиды тяжелой цепи ЧЛА-B, полипептиды тяжелой цепи ЧЛА-C, полипептиды тяжелой цепи ЧЛА-E, полипептиды тяжелой цепи ЧЛА-F и полипептиды тяжелой цепи ЧЛА-G. В некоторых случаях полипептид ГКГС мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой полипептид ЧЛА класса II, например, α -цепь ЧЛА класса II или β -цепь ЧЛА класса II. Полипептиды ГКГС класса II включают полипептиды DR α и β , полипептиды DM α и β , полипептиды DOA α и β , полипептиды DOB α и β , полипептиды DQ α и β , а также полипептиды DR α и β ГКГС класса II.

В качестве примера, полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I мультимерного полипептида по данному изобретению может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99 или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотами 25-365 аминокислотной последовательности полипептида тяжелой цепи человеческого ЧЛА-A, представленного на фиг. 5A.

В качестве примера, полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I мультимерного полипептида по данному изобретению может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере на 99 или 100%, идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотами 25-365 в аминокислотной последовательности следующей аминокислотной последовательности тяжелой цепи ЧЛА-A:

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEY
 WDGETRKKVKAHSQTHRVDLGLTRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWDRFLRGYHQ
 YAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRY
 LENGKETLQRTDAPKTHMTHNAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTE
 LVETRPAGDGTQKWA AVVVPSGQEQRYTCHVQHGLPKPLTLRWEF (SEQ ID
 NO:14).

В качестве другого примера полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I мультимерного полипептида по данному изобретению может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99 или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотами 25-362 аминокислотной последовательности полипептида тяжелой цепи человеческого ЧЛА-В, представленного на фиг. 5В.

В качестве другого примера, полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I мультимерного полипептида по данному изобретению может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99 или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотами 25-362 аминокислотной последовательности полипептида тяжелой цепи человеческого ЧЛА-С, представленного на фиг. 5С.

В качестве другого примера, полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I мультимерного полипептида по данному изобретению может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99 или 100% идентичности аминокислотной последовательности со следующей аминокислотной последовательностью:

GPHSRLRYFVTAVSRPGLGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFSDADNPRFEPRAPWMEQEGPEY
 WEEQTQRAKSDEQWFRVSLRTAQRYYNQSKGGSHTFQRMFGCDVGSWDRLLRGGYQQ
 FAYDGRDYIALNEDLKTWTAADTAALITRRKWEQAGDAEYYRAYLEGECEVEWLRRLYL
 ELGNETLLRTDSPKAHVYHPRSQVDVTLRCWALGFYPADITLTWQLNGEDLTQDMEL
 VETRPAGDGTQKWA AVVVPLGKEQNYTCHVHNKGLPEPLTLRW (SEQ ID NO:15).

Полипептид β 2-микроглобулина (β 2М) мультимерного полипептида по данному изобретению может представлять собой полипептид β 2М человека, полипептид β 2М примата отличного от человека, мышинный β 2М полипептид и т.п. В некоторых случаях полипептид β 2М содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99 или 100%, идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью β 2М, изображенной на фиг. 6. В некоторых случаях полипептид β 2М содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99 или 100%, идентичность аминокислотной последовательности по аминокислотам с 21 по 119 аминокислотной последовательности β 2М, изображенной на фиг. 6.

В некоторых случаях полипептид ГКГС содержит одну аминокислотную замену относительно эталонного полипептида ГКГС (причем эталонный полипептид ГКГС может представлять собой полипептид ГКГС дикого типа), причем одиночная аминокислотная замена заменяет аминокислоту на цистеиновый (Cys) остаток. Такие остатки цистеина, когда они присутствуют в полипептиде ГКГС первого полипептида мультимерного полипептида по данному изобретению, могут образовывать дисульфидную связь с остатком цистеина, присутствующим во второй полипептидной цепи мультимерного полипептида по данному изобретению.

В некоторых случаях первый полипептид ГКГС в первом полипептиде мультимерного полипептида по данному изобретению и/или второй полипептид ГКГС во втором полипептиде мультимерного полипептида по данному изобретению включает аминокислотную замену для замены аминокислоты на цистеин, причем замещенный цистеин в первом полипептиде ГКГС образует дисульфидную связь с цистеином во втором полипептиде ГКГС, причем цистеин в первом полипептиде ГКГС образует дисульфидную связь с замещенным цистеином во втором полипептиде ГКГС, или причем замещенный цистеин в первом полипептиде ГКГС образует дисульфидную связь с замещенным цистеином во втором полипептиде ГКГС.

Например, в некоторых случаях одна из следующих пар остатков в β 2-микроглобулине ЧЛА и тяжелой цепи ЧЛА класса I замещается цистеинами (причем номера остатков соответствуют номерам остатков зрелого полипептида):

- 1) остаток β 2М 12, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I 236;

- 2) остаток β 2M 12, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I 237;
- 3) остаток β 2M 8, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I 234;
- 4) остаток β 2M 10, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I 235;
- 5) остаток β 2M 24, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I 236;
- 6) остаток β 2M 28, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I 232;
- 7) остаток β 2M 98, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I 192;
- 8) остаток β 2M 99, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I 234;
- 9) остаток β 2M 3, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I 120;
- 10) остаток β 2M 31, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I 96;
- 11) остаток β 2M 53, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I 35;
- 12) остаток β 2M 60, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I 96;
- 13) остаток β 2M 60, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I 122;
- 14) остаток β 2M 63, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I 27;
- 15) остаток β 2M Arg3, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I Gly120;
- 16) остаток β 2M His31, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I Gln96;
- 17) остаток β 2M Asp53, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I Arg35;
- 18) остаток β 2M Trp60, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I Gln96;
- 19) остаток β 2M Trp60, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I Asp122;
- 20) остаток β 2M Trp63, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I Tyr27;
- 21) остаток β 2M Lys6, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I Glu232;
- 22) остаток β 2M Gln8, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I Arg234;
- 23) остаток β 2M Tyr10, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I Pro235;
- 24) остаток β 2M Ser11, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I Gln242;
- 25) остаток β 2M Asn24, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I Ala236;
- 26) остаток β 2M Ser28, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I Glu232;
- 27) остаток β 2M Asp98, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I His192; и
- 28) остаток β 2M Met99, остаток тяжелой цепи ЧЛА класса I Arg234.

Нумерация аминокислот тяжелой цепи ГКГС/ЧЛА класса I относится к зрелой тяжелой цепи ГКГС/ЧЛА класса I без сигнального пептида. Например, в аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 5А, которая включает сигнальный пептид, Gly120 представляет собой Gly144; Gln96 представляет собой Gln120 и т.д. В некоторых случаях полипептид β 2M содержит замену R12C, а тяжелая цепь ЧЛА класса I содержит замену A236C; в таких случаях дисульфидная связь образуется между Cys-12 полипептида β 2M и Cys-236 тяжелой цепи ЧЛА класса I. Например, в некоторых случаях, остаток 236 зрелого ЧЛА-А аминокислотной последовательности (т.е. остаток 260 из аминокислотной последовательности, продемонстрированной на фиг. 5А) замещен Cys. В некоторых случаях остаток 236 аминокислотной последовательности зрелого ЧЛА-В (т.е. остаток 260 аминокислотной последовательности, продемонстрированной на фиг. 5В) замещен Cys. В некоторых случаях остаток 236 аминокислотной последовательности зрелого ЧЛА-С (т.е. остаток 260 аминокислотной последовательности, продемонстрированной на фиг. 5С) замещен Cys. В некоторых случаях остаток 32 (соответствующий Arg-12 зрелого β 2M) аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 6 замещен Cys.

В некоторых случаях, полипептид β 2M включает в себя аминокислотную последовательность

IQRTPKIQVY SRHPAENGKS NFLNCYVSGF
 HPSDIEVDLLKNGERIEKVE HSDLSFSKDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC
 RVNHVTLSPQ KIVKWDRDM (SEQ ID NO:16).

В некоторых случаях полипептид β 2M включает в себя аминокислотную последовательность

IQRTPKIQVY SCHPAENGKS
 NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGERIEKVE HSDLSFSKDW SFYLLYYTEF
 TPTEKDEYAC RVNHVTLSPQ KIVKWDRDM (SEQ ID NO:17).

В некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ЧЛА класса I содержит аминокислотную последовательность

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGVYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEY
 WDGTRKVKANSQTHRVDLGLTRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWDRFLRGYNQ
 YAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLLRRY
 LENGKETLQRTDAPKTHMTNNAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTE
 LVETRPAGDGTFQKWA AVVVPSGQEQRVTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID
 NO:14).

В некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ЧЛА класса I содержит аминокислотную последо-

вательность

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAVGYYDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEY
 WDGETRKKVKAHSQTHRVDLGLTRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWDRFLRGYHQ
 YAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRY
 LENGKETLQRTDAPKTHMTNHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTE
 LVETRPCGDGTFQKWA AVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID
 NO:18).

В некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ЧЛА класса I включает в себя аминокислотную последовательность

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAVGYYDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEY
 WDGETRKKVKAHSQTHRVDLGLTRGAYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWDRFLRGYHQ
 YAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRY
 LENGKETLQRTDAPKTHMTNHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTE
 LVETRPCGDGTFQKWA AVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:19).

В некоторых случаях полипептид β 2M содержит следующую аминокислотную последовательность

IQRTPKIQVY SCHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGERIEKVE
 HSDLSFSKDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVNHVTLSPKIVKWDRDM (SEQ ID NO: 17);

и полипептид тяжелой цепи ЧЛА класса I мультимерного полипептида по данному изобретению содержит следующую аминокислотную последовательность:

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAVGYYDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEY
 WDGETRKKVKAHSQTHRVDLGLTRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWDRFLRGYHQ
 YAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRY
 LENGKETLQRTDAPKTHMTNHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTE
 LVETRPCGDGTFQKWA AVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO: 18),

причем остатки Cys, которые подчеркнуты и выделены жирным шрифтом формируют дисульфидную связь друг с другом в мультимерном полипептиде.

В некоторых случаях полипептид β 2M содержит аминокислотную последовательность

IQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDW

SFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDM (SEQ ID NO:17)

Иммунотенулирующие полипептиды.

Мультимерный полипептид по данному изобретению содержит вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению, как описано выше, который представляет собой вариант встречающегося в природе костимуляторного белка, при этом указанный вариант проявляет пониженную аффинность к своему партнерскому (когнатному) костимуляторному белку на Т-клетке (например, ИЛ-2Р) по сравнению с аффинностью встречающегося в природе ИЛ-2 полипептида к партнерскому костимуляторному белку (ИЛ-2Р). Таким образом, мультимерный полипептид по данному изобретению содержит вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2Е, при этом аминокислота 16 представляет собой аминокислоту, отличную от гистидина, например, при этом аминокислота 16 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, Asp или Glu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2Е, при этом аминокислота 16 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2Е, при этом аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной

рых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид обладает аффинностью связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 до около 800 нМ, от около 800 до около 900 нМ, от около 900 до около 1 мкМ, от около 1 до около 5 мкМ, от около 5 до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид имеет длину 133 аминокислоты.

Замена F42.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2В, при этом аминокислота 42 представляет собой аминокислоту, отличную от фенилаланина, например, при этом аминокислота 42 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2В, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2В, причем аминокислотой 42 является Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2В, при этом аминокислота 42 представляет собой Gly. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2В, при этом аминокислота 42 представляет собой Val. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2В, при этом аминокислота 42 представляет собой Leu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2В, при этом аминокислота 42 представляет собой Ile. В некоторых случаях единственная копия вариантного ИЛ-2 полипептида присутствует в мультимерном полипептиде по данному изобретению. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит две копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда две копии находятся тандемно без линкера между двумя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит три копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда три копии находятся тандемно без линкера между тремя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTас по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2М, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей тяжелую цепь ЧЛА класса I. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTас по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2М, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей полипептид β 2М. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид или synTас, содержащий его, обладает аффинностью связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 до 700 нМ, от 700 до 800 нМ, от 800 до 900 нМ, от 900 нМ до 1 мкМ, от 1 до 5 мкМ, от 5 до 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 до 100 мкМ. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 по-

липептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, имеет длину 133 аминокислоты.

Замена Y45.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2F, при этом аминокислота 45 представляет собой аминокислоту, отличную от тирозина, например, при этом аминокислота 45 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2F, при этом аминокислота 45 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2F, при этом аминокислота 45 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2F, при этом аминокислота 45 представляет собой Gly. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2F, при этом аминокислота 45 представляет собой Val. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2F, при этом аминокислота 45 представляет собой Leu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2F, при этом аминокислота 45 представляет собой Ile. В некоторых случаях единственная копия вариантного ИЛ-2 полипептида присутствует в мультимерном полипептиде по данному изобретению. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит две копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда две копии находятся тандемно без линкера между двумя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит три копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда три копии находятся тандемно без линкера между тремя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2M, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей тяжелую цепь ЧЛА класса I. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2M, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей полипептид β 2M. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид или synTas, содержащий его, обладает аффинностью связывания с ИЛ-2R, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 до 700 нМ, от 700 до 800 нМ, от 800 до 900 нМ, от 900 нМ до 1 мкМ, от 1 до 5 мкМ, от 5 до 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 до 100 мкМ. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, имеет длину 133 аминокислоты.

Замена Q126.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2G, при

этом аминокислота 126 представляет собой аминокислоту, отличную от глутамина, например, при этом аминокислота 126 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Lys, Arg, His, Asp или Glu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2G, при этом аминокислота 126 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2G, при этом аминокислота 126 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2G, при этом аминокислота 126 представляет собой Gly. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2G, при этом аминокислота 126 представляет собой Val. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2G, при этом аминокислота 126 представляет собой Leu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2G, при этом аминокислота 126 представляет собой Ile. В некоторых случаях единственная копия вариантного ИЛ-2 полипептида присутствует в мультимерном полипептиде по данному изобретению. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит две копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда две копии находятся тандемно без линкера между двумя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит три копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда три копии находятся тандемно без линкера между тремя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2M, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей тяжелую цепь ЧЛА класса I. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2M, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей полипептид β 2M. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид или synTas, содержащий его, обладает аффинностью связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 до 700 нМ, от 700 до 800 нМ, от 800 до 900 нМ, от 900 до 1 мкМ, от 1 до 5 мкМ, от 5 до 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 до 100 мкМ. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, имеет длину 133 аминокислоты.

Замены F42 и H16.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2H, при этом аминокислота 42 представляет собой аминокислоту, отличную от фенилаланина, например, при этом аминокислота 42 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; и при этом аминокислота 16 представляет собой аминокислоту, отличную от гистидина, например, при этом аминокислота 16 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, Asp или Glu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по мень-

шей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2Н, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; и при этом аминокислота 16 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2Н, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, а аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2Н, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, а аминокислота 16 представляет собой Gly. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2Н, при этом аминокислота 42 представляет собой Val, а аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2Н, при этом аминокислота 42 представляет собой Leu, а аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2Н, при этом аминокислота 42 представляет собой Ile, а аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях в мультимерном полипептиде по данному изобретению присутствует единственная копия вариантного ИЛ-2 полипептида. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит две копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда две копии находятся тандемно без линкера между двумя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит три копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда три копии находятся тандемно без линкера между тремя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2М, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей тяжелую цепь ЧЛА класса I. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2М, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей полипептид β 2М. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит 2 копии вариантного ИЛ-2, содержащего замены F42A и H16A, при этом мультимерный полипептид содержит полипептиды тяжелой цепи ЧЛА класса I и β 2М, и причем 2 копии ИЛ-2 (F42A, H16A) находятся на полипептидной цепи, содержащей тяжелую цепь ЧЛА класса I. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид или synTas, содержащий его, обладает аффинностью связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 до 700 нМ, от 700 до 800 нМ, от 800 до 900 нМ, от 900 нМ до 1 мкМ, от 1 до 5 мкМ, от 5 до 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 до 100 мкМ. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, имеет длину 133 аминокислоты. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34В (содержащий замены H16A и F42A).

Замены F42 и D20.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2I, при этом аминокислота 42 представляет собой аминокислоту, отличную от фенилаланина, например, при этом аминокислота 42 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; и при этом аминокислота 20 представляет собой аминокислоту, отличную от аспарагиновой кислоты, например, при этом аминокислота 20 представляет собой Gly, Ala, Val,

да, например, когда две копии находятся тандемно без линкера между двумя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит три копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда три копии находятся тандемно без линкера между тремя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2M, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей тяжелую цепь ЧЛА класса I. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2M, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей полипептид β 2M. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид или synTas, содержащий его, обладает аффинностью связывания с ИЛ-2R, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 до 700 нМ, от 700 до 800 нМ, от 800 до 900 нМ, от 900 нМ до 1 мкМ, от 1 до 5 мкМ, от 5 до 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 до 100 мкМ. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, имеет длину 133 аминокислоты.

Замены F42, D20 и E15.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2J, при этом аминокислота 42 представляет собой аминокислоту, отличную от фенилаланина, например, при этом аминокислота 42 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; при этом аминокислота 20 представляет собой аминокислоту, отличную от аспарагиновой кислоты, например, при этом аминокислота 20 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His или Glu; и при этом аминокислота 15 представляет собой аминокислоту, отличную от глутаминовой кислоты, например, при этом аминокислота 15 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His или Asp. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% изображенной на фиг. 2J, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 20 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; и при этом аминокислота 15 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2J, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 20 представляет собой Asn, Gln, Lys, Arg или His; и при этом аминокислота 15 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2J, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Ala, а аминокислота 15 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2J, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Gly, а аминокислота 15 представляет собой Gly. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2J, при этом аминокислота 42 представляет собой Val, аминокислота 20 представляет собой Ala, а аминокислота 15 представляет собой Gly. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2J, при этом аминокислота 42 представляет собой Leu, аминокислота 20 представляет собой Ala, а аминокислота 15 представляет собой Gly.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2J, при этом аминокислота 42 представляет собой Ile, аминокислота 20 представляет собой Ala, а аминокислота 15 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2J, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Asn, а аминокислота 15 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2I, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Gln, а аминокислота 15 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2J, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Lys, а аминокислота 15 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2J, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Arg, а аминокислота 15 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2I, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой His, а аминокислота 15 представляет собой Ala. В некоторых случаях единственная копия вариантного ИЛ-2 полипептида присутствует в мультимерном полипептиде по данному изобретению. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит две копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда две копии находятся тандемно без линкера между двумя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2M, ИЛ-2 полипептид(ы) находится на полипептидной цепи, содержащей тяжелую цепь ЧЛА класса I. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2M, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей полипептид β 2M. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит три копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда три копии находятся тандемно без линкера между тремя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид или synTas, содержащий его, обладает аффинностью связывания с ИЛ-2R, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 до 700 нМ, от 700 до 800 нМ, от 800 до 900 нМ, от 900 нМ до 1 мкМ, от 1 до 5 мкМ, от 5 до 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 до 100 мкМ. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, имеет длину 133 аминокислоты.

Замены F42, D20 и H16.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2K, при этом аминокислота 42 представляет собой аминокислоту, отличную от фенилаланина, например, при этом аминокислота 42 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; при этом аминокислота 20 представляет собой аминокислоту, отличную от аспарагиновой кислоты, например, при этом аминокислота 20 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His или Glu; и при этом аминокислота 16

ном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2К, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой His, а аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях единственная копия вариантного ИЛ-2 полипептида присутствует в мультимерном полипептиде по данному изобретению. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит две копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда две копии находятся тандемно без линкера между двумя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит три копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда три копии находятся тандемно без линкера между тремя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2М, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей тяжелую цепь ЧЛА класса I. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2М, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей полипептид β 2М. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид или synTas, содержащий его, обладает аффинностью связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 до 700 нМ, от 700 до 800 нМ, от 800 до 900 нМ, от 900 нМ до 1 мкМ, от 1 до 5 мкМ, от 5 до 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 до 100 мкМ. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, имеет длину 133 аминокислоты.

Замены F42, D20 и Q126.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2L, при этом аминокислота 42 является аминокислотой, отличной от фенилаланина, например, при этом аминокислота 42 является Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; при этом аминокислота 20 представляет собой аминокислоту, отличную от аспарагиновой кислоты, например, при этом аминокислота 20 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His или Glu; и при этом аминокислота 126 представляет собой аминокислоту, отличную от глутамина, например, при этом аминокислота 126 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Lys, Arg, His, Asp или Glu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2L, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 20 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; и при этом аминокислота 126 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2L, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 20 представляет собой Asn, Gln, Lys, Arg или His; и при этом аминокислота 126 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2L, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Gly, а аминокислота 126 представляет собой Gly. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2L, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Gly, а аминокислота 126 представляет собой Gly. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2L, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Gly, а аминокислота 126 представляет собой Gly.

аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2М, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Lys, а аминокислота 45 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2М, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Arg, а аминокислота 45 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2М, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой His, а аминокислота 45 представляет собой Ala. В некоторых случаях в мультимерном полипептиде по данному изобретению присутствует одна копия вариантного ИЛ-2 полипептида. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит две копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда две копии находятся тандемно без линкера между двумя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит три копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда три копии находятся тандемно без линкера между тремя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2М, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей тяжелую цепь ЧЛА класса I. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2М, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей полипептид β 2М. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид или synTas, содержащий его, обладает аффинностью связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 до 700 нМ, от 700 до 800 нМ, от 800 до 900 нМ, от 900 нМ до 1 мкМ, от 1 до 5 мкМ, от 5 до 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 до 100 мкМ. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, имеет длину 133 аминокислоты.

Замены F42, D20, Y45 и H16.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой аминокислоту, отличную от фенилаланина, например, при этом аминокислота 42 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; при этом аминокислота 20 представляет собой аминокислоту, отличную от аспарагиновой кислоты, например, при этом аминокислота 20 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His или Glu; при этом аминокислота 45 представляет собой аминокислоту, отличную от тирозина, например, при этом аминокислота 45 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; и при этом аминокислота 16 представляет собой аминокислоту, отличную от гистидина, например, при этом аминокислота 16 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, Asp или Glu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 20 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 45 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; и при этом аминокислота 16 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2N, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 20 представляет собой Asn, Gln, Lys, Arg или His; при этом аминокислота 45 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; и при этом аминокислота 16 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит

мере 99% по отношению к аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 20, при этом аминокислота 42 представляет собой Leu, аминокислота 20 представляет собой Ala, аминокислота 45 представляет собой Gly и аминокислота 126 представляет собой Val. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 20, при этом аминокислота 42 представляет собой Ile, аминокислота 20 представляет собой Ala, аминокислота 45 представляет собой Ala и аминокислота 126 представляет собой Gly. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 20, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Asp, аминокислота 45 представляет собой Ala и аминокислота 126 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% по отношению к аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 20, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Gln, аминокислота 45 представляет собой Ala и аминокислота 126 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% по отношению к аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 20, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Lys, аминокислота 45 представляет собой Ala и аминокислота 126 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% по отношению к аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 20, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Arg, аминокислота 45 представляет собой Ala и аминокислота 126 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% по отношению к аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 20, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой His, аминокислота 45 представляет собой Ala и аминокислота 126 представляет собой Ala. В некоторых случаях одна копия вариантного ИЛ-2 полипептида присутствует в мультимерном полипептиде данное изобретение. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит две копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда две копии находятся тандемно без линкера между двумя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит три копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда три копии находятся тандемно без линкера между тремя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2M, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей тяжелую цепь ЧЛА класса I. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2M, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей полипептид β 2M. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид или synTas, содержащий его, обладает аффинностью связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 до 700 нМ, от 700 до 800 нМ, от 800 до 900 нМ, от 900 нМ до 1 мкМ, от 1 до 5 мкМ, от 5 до 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 до 100 мкМ. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, имеет длину 133 аминокислоты.

Замены F42, D20, Y45, H16 и Q126.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере

20 представляет собой Asn, аминокислота 45 представляет собой Ala, аминокислота 126 представляет собой Ala и аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид присутствует в мультимерном полипептиде данное изобретение включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% по отношению к аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 2P, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Gln, аминокислота 45 представляет собой Ala, аминокислота 126 представляет собой Ala и аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид присутствует в мультимерном полипептиде данное изобретение включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, продемонстрированной на фиг. 2P, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Lys, аминокислота 45 представляет собой Ala, аминокислота 126 представляет собой Ala и аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид присутствует в мультимерном полипептиде данное изобретение включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, продемонстрированной на фиг. 2P, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой Arg, аминокислота 45 представляет собой Ala, аминокислота 126 представляет собой Ala и аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид присутствует в мультимерном полипептиде данное изобретение включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% по отношению к аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 2P, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, аминокислота 20 представляет собой His, аминокислота 45 представляет собой Ala, аминокислота 126 представляет собой Ala и аминокислота 16 представляет собой Ala. В некоторых случаях присутствует одна копия вариантного ИЛ-2 полипептида, в мультимерном полипептиде по данному изобретению. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит две копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда две копии находятся тандемно без линкера между двумя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит три копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда три копии находятся тандемно без линкера между тремя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2M, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей тяжелую цепь ЧЛА класса I. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTas по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2M, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находится на полипептидной цепи, содержащей полипептид β 2M. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид или synTas, содержащий его, обладает аффинностью связывания с ИЛ-2P, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 до 700 нМ, от 700 до 800 нМ, от 800 до 900 нМ, от 900 нМ до 1 мкМ, от 1 до 5 мкМ, от 5 до 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 до 100 мкМ. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, имеет длину 133 аминокислоты.

Замены F42, Q126 и H16.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, идентичности аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 2Q, при этом аминокислота 42 представляет собой аминокислоту, отличную от фенилаланина, например, при этом аминокислота 42 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp или Glu; при этом аминокислота 126 представляет собой аминокислоту, отличную от глутамина, например, при этом аминокислота 126 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Lys, Arg, His, Asp или Glu; и при этом аминокислота 16 представляет собой аминокислоту, отличную от гистидина, например, при этом аминокислота 16 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Lys, Arg, Asp или Glu. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2Q, при этом аминокислота 42 представляет собой Ala, Gly, Val, Leu или Ile; при этом аминокислота 126 представляет собой Ala, Gly,

когда две копии находятся тандемно без линкера между двумя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит три копии вариантного ИЛ-2 полипептида, например, когда три копии находятся тандемно без линкера между тремя копиями или тандемно и разделены линкерным пептидом. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTас по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2М, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей тяжелую цепь ЧЛА класса I. В некоторых случаях, когда ИЛ-2/synTас по данному изобретению содержит тяжелую цепь ЧЛА класса I и β 2М, ИЛ-2 полипептид(ы) находится/находятся на полипептидной цепи, содержащей полипептид β 2М. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид или synTас, включающий вариантный ИЛ-2 полипептид, имеет аффинность связывания с ИЛ-2Р, которая составляет от около 100 нМ до около 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, от около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ. В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид имеет длину 133 аминокислоты.

Множественные иммуномодуляторные домены.

Как отмечено выше, в некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит два или более иммуномодуляторных полипептида, причем по меньшей мере один из указанных двух или более иммуномодуляторных полипептидов представляет собой вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению.

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит две или более копии вариантного ИЛ-2 полипептида по данному изобретению. В некоторых случаях два или более вариантных ИЛ-2 полипептидов находятся в одной и той же полипептидной цепи мультимерного полипептида по данному изобретению. В некоторых случаях два или более вариантных ИЛ-2 полипептида находятся на отдельных полипептидных цепях мультимерного полипептида по данному изобретению.

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит первый иммуномодуляторный полипептид и по меньшей мере второй иммуномодуляторный полипептид, причем первый иммуномодуляторный полипептид представляет собой вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению, а второй иммуномодуляторный полипептид не является ИЛ-2 полипептидом. Например, в некоторых случаях второй иммуномодуляторный полипептид является членом суперсемейства фактора некроза опухоли (ФНО); например, полипептид FasL, полипептид 4-1BBL, полипептид CD40, полипептид OX40L, полипептид CD30L, полипептид CD70 и т.д. В некоторых случаях второй иммуномодуляторный полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой Т-клеточный костимуляторный полипептид и является членом суперсемейства иммуноглобулинов (Ig); например, полипептид CD7, полипептид CD86, полипептид ICAM и т.д. В некоторых случаях вторым иммуномодуляторным полипептидом является 4-1BBL, OX40L, ICOS-L, ICAM, PD-L1, CD86, FasL и PD-L2. Подходящие иммуномодулирующие полипептиды мультимерного полипептида по данному изобретению включают, например, CD7, CD30L, CD40, CD70, CD83, ЧЛА-G, MICA, MICB, HVEM, бета-рецептор лимфотоксина, 3/TR6, ILT3, ILT4 или HVEM. В некоторых случаях второй иммуномодуляторный полипептид представляет собой вариант (например, вариант встречающегося в природе 4-1BBL), который проявляет аффинность (определенную, как описано выше) к его партнерскому костимуляторному белку, обнаруженному в Т-клетке, который снижается по сравнению с аффинностью природного костимуляторного белка (иммуномодуляторного полипептида) к его партнерскому (когнатному) костимуляторному белку. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит первый иммуномодуляторный полипептид и по меньшей мере второй иммуномодуляторный полипептид, причем ни один из них не является вариантным ИЛ-2 полипептидом. Следует понимать, что это изобретение в целом относится к применению иммуномодуляторных полипептидов, которые представляют собой варианты встречающихся в природе иммуномодуляторных полипептидов, причем эти варианты проявляют аффинность (определенную, как описано выше) к аналогам костимулирующих белков, которая снижена по сравнению с аффинностью встречающегося в природе костимуляторного белка (иммуномодуляторного полипептида) для партнерского (когнатного) костимуляторного белка.

Дополнительные, модулирующие Т-клетки, домены (MOD - modulatory domains), которые могут быть включены в мультимерный полипептид по данному изобретению, включают встречающиеся в природе или синтетические генные продукты человека (белок), аффинные реагенты (например, антитело, фрагмент антитела, одноцепочечные Fv, аптамеры, нанотела) нацеленные на генный продукт человека, включая, но не ограничиваясь этим, все секретируемые белки, появляющиеся в результате классических и неклассических (например, FGF2, IL1, S100A4) механизмов секреции, и экто-домены всех белков клеточной поверхности, закрепленных естественными генетически кодированными белковыми сегментами

(одиночные или множественные мембранные сегменты) или посттрансляционные модификации, такие как связи GPI). Любой природный или синтетический аффинный реагент (например, антитело, фрагмент антитела, одноцепочечные Fv, аптамер, нанотело, лектин и т.д.), нацеленный на гликан клеточной поверхности или другую посттрансляционную модификацию (например, сульфатирование). Примеры включают, но не ограничиваются ими, члены семейства ФНО/ФНОР (OX40L, ICOSL, FASL, LTA, LTB, TRAIL, CD153, ФНОSF9, RANKL, TWEAK, ФНОSF13, ФНОSF13b, ФНОSF14, ФНОSF15, ФНОSF18, CD40LG, CD70) или аффинные реагенты, направленные на членов семейства ФНО/ФНОР; члены суперсемейства иммуноглобулинов (VISTA, PD1, PD-L1, PD-L2, B71, B72, CTLA4, CD28, TIM3, CD4, CD8, CD19), цепи рецепторов Т-клеток, ICOS, лиганд ICOS, НЧЛА2, бутирофилины, BTLA, B7-H3, B7-H4, CD3, CD79a, CD79b, IgSF CAMS (включая CD2, CD58, CD48, CD150, CD229, CD244, ICAM-1), лейкоцитарные иммуноглобулиноподобные рецепторы (LILR - Leukocyte immunoglobulin like receptor), рецепторы, подобные иммуноглобулинам клеток киллеров (KIR - killer cell immunoglobulin like receptor), члены суперсемейства лектинов, селектины, цитокины/хемокины и рецепторы цитокинов/хемокинов, факторы роста и рецепторы факторов роста), молекулы адгезии (интегрины, фибронектины, кадгеринины) или эктодомены многопролетного интегрального мембранного белка или аффинные реагенты, направленные на суперсемейство иммуноглобулинов и перечисленные генные продукты. Кроме того, активные гомологи/ортологи этих генных продуктов, включая, но не ограничиваясь этим, вирусные последовательности (например, CMV, EBV), бактериальные последовательности, грибковые последовательности, эукариотические патогены (например, Schistosoma, Plasmodium, Babesia, Eimeria, Theileria, Toxoplasma), Entamoeba, Leishmania и Trypanosoma) и кодирующие области, происходящие от млекопитающих. К тому же. MOD может содержать лекарственное средство с малыми молекулами, нацеленное на продукт гена человека.

Каркасные полипептиды.

Мультимерный полипептид, модулирующий Т-клетки, по данному изобретению содержит Fc-полипептид или другой подходящий каркасный полипептид.

Подходящие каркасные полипептиды включают в себя каркасные полипептиды на основе антител и каркасы не на основе антител. Не основанные на антителах каркасы включают, например, альбумин, полипептид XTEN (удлиненный рекомбинантный), трансферрин, полипептид рецептора Fc, эластиноподобный полипептид (см., например, Hassouneh et al. (2012), *Methods Enzymol.*, 502:215; например, полипептид, содержащий пентапептидную повторяющуюся единицу (Val-Pro-Gly-X-Gly; SEQ ID NO: 100), причем X представляет собой любую аминокислоту, отличную от пролина), альбумин-связывающий полипептид, шелкоподобный полипептид (см., например, Valluzzi et al. (2002), *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 357:165) шелкоподобно-эластиноподобный полипептид (SELP; см., например, Megeed et al. (2002), *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 54:1075) и т.п. Подходящие полипептиды XTEN включают, например, полипептиды, раскрытые в WO 2009/023270, WO 2010/091122, WO 2007/103515, US 2010/0189682; и US 2009/0092582; см. также Schellenberger et al. (2009), *Nat. Biotechnol.*, 27:1186). Подходящие полипептиды альбумина включают, например, человеческий сывороточный альбумин.

Подходящие каркасные полипептиды в некоторых случаях представляют собой полипептиды, увеличивающие время полужизни. Таким образом, в некоторых случаях подходящий каркасный полипептид увеличивает период полувыведения *in vivo* (например, период полужизни в сыворотке) мультимерного полипептида по сравнению с контрольным мультимерным полипептидом, в котором отсутствует каркасный полипептид. Например, в некоторых случаях каркасный полипептид увеличивает время полужизни *in vivo* (например, время полужизни в сыворотке) мультимерного полипептида по сравнению с контрольным мультимерным полипептидом, в котором отсутствует каркасный полипептид, по меньшей мере на около 10%, при по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере в около 2 раза, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 25 раз, по меньшей мере в около 50 раз, по меньшей мере в около 100 раз или более чем в 100 раз. Например, в некоторых случаях Fc-полипептид увеличивает период полужизни *in vivo* (например, период полужизни в сыворотке) мультимерного полипептида по сравнению с контрольным мультимерным полипептидом, в котором отсутствует Fc-полипептид, по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере в около 2 раза, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 25 раз, по меньшей мере в около 50 раз, по меньшей мере в около 100 раз или более чем в 100 раз.

Fc-полипептиды.

В некоторых случаях первая и/или вторая полипептидные цепи мультимерного полипептида по данному изобретению содержат Fc-полипептид. Fc-полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению может представлять собой Fc IgG1 человека, Fc IgG2 человека, Fc IgG3 человека, Fc IgG4 человека и т.д. В некоторых случаях Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99 или 100%, идентичность аминокислотной последовательности с

случаях Fc-полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33А (Fc IgG1 человека), за исключением замены P331 аминокислотой, отличной от пролина; в некоторых случаях замена представляет собой замену P331S. В некоторых случаях Fc-полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33А (Fc IgG1 человека), за исключением замен в L234 и L235 аминокислотами, отличными от лейцина. В некоторых случаях Fc-полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33А (Fc IgG1 человека), за исключением замен в L234 и L235 аминокислотами, отличными от лейцина, и замены P331 аминокислотой, отличной от пролина. В некоторых случаях Fc-полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде по данному изобретению, содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33В (Fc IgG1 человека, содержащий замены L234F, L235E и P331S).

Дополнительные полипептиды.

Полипептидная цепь мультимерного полипептида по данному изобретению может включать один или несколько полипептидов в дополнение к тем, которые описаны выше. Подходящие дополнительные полипептиды включают эпитопные метки и аффинные домены. Один или несколько дополнительных полипептидов могут быть включены на N-конце полипептидной цепи мультимерного полипептида по данному изобретению, на C-конце полипептидной цепи мультимерного полипептида по данному изобретению или внутри полипептидной цепи мультимерного полипептида по данному изобретению.

Эпитопный тэг.

Подходящие эпитопные тэги включают, но не ограничиваются ими, гемагглютинин (HA; например, YPYDVPDYA (SEQ ID NO: 20); FLAG (например, DYKDDDDK (SEQ ID NO: 21); c-мус (например, EQKLISEEDL; SEQ ID NO) 22) и т.п.

Аффинный домен.

Аффинные домены включают пептидные последовательности, которые могут взаимодействовать с партнером по связыванию, например, такой как иммобилизованный на твердой подложке, полезный для идентификации или очистки. Последовательности ДНК, кодирующие несколько последовательных отдельных аминокислот, таких как гистидин, при слиянии с экспрессированным белком, могут быть использованы для одностадийной очистки рекомбинантного белка путем связывания с высоким сродством с колонкой со смолой, такой как никель-сефароза. Иллюстративные аффинные домены включают His5 (ННННН) (SEQ ID NO: 23), HisX6 (НННННН) (SEQ ID NO: 24), С-мус (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO: 22), FLAG (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 21), StrepTag (WSHPQFEK) (SEQ ID NO: 25), гемагглютинин, например HA тэг (YPYDVPDYA) (SEQ ID NO: 20), глутатион-S-трансферазу (GST), тиоредоксин, целлюлозосвязывающий домен, RYIRS (SEQ ID NO: 26), Phe-His-His-Thr (SEQ ID NO: 88), хитин-связывающий домен, S-пептид, T7-пептид, домен SH2, C-концевую РНК-метку, WEAAAREACCRECCARA (SEQ ID NO: 27), металлосвязывающие домены, например, цинк-связывающие домены или кальций-связывающие домены, такие как домены из кальций-связывающих белков, например, кальмодулин, тропонин С, кальциневрин В, легкая цепь миозина, рекурейн, S-модулин, визинин, VILIP, нейрокальцин, гиппокальцин, фриквентин, кальтрактин, большую субъединицу кальпаина, белки S100, парвальбумин, кальбиндин D9K, кальбиндин D28K и кальретинин, интеины, биотин, стрептавидин, MyoD, Id, последовательности лейцинового zipper и белка, связывающего мальтозу.

Примеры мультимерных полипептидов данного изобретения.

Далее приведены неограничивающие варианты осуществления мультимерного ИЛ-2 полипептида/synTас по данному изобретению.

В некоторых случаях мультимерный ИЛ-2 полипептид/synTас по данному изобретению содержит

- a) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу
 - i) эпитоп,
 - ii) полипептид β 2-микроглобулина (β 2M), содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34А; и
 - b) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу
 - i) вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению,
 - ii) полипептид тяжелой цепи главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34С, и
 - iii) Fc-полипептид IgG1, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из N297A, L234A, L235A, L234F, L235E и P331S.

В некоторых случаях вариантный ИЛ-2 полипептид содержит замену Н16А и F42А. В некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит замену N297А. В некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит замену L234А и замену L235А. В некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит замену L234F и замену L235E. В некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит замену L234F, замену L235E и замену P331S. В некоторых случаях второй полипептид содержит две копии вариантного ИЛ-2 полипептида. В некоторых случаях первый полипептид содержит пептидный линкер между эпитопом и β 2M-полипептидом. В неко-

торых случаях второй полипептид содержит пептидный линкер между одним или несколькими из

- a) первой копией вариантного ИЛ-2 полипептида и второй копией вариантного ИЛ-2 полипептида;
- b) вариантным ИЛ-2 полипептидом и полипептидом тяжелой цепи ГКГС; и
- c) между полипептидом тяжелой цепи ГКГС и Fc-полипептидом IgG1.

В некоторых случаях пептидный линкер выбран из (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 89), (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 90) и AAAGG (SEQ ID NO: 28). В некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33B некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33C. В некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33D.

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит

- a) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу
 - i) эпитоп,
 - ii) полипептид β2-микроглобулина, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34A; и
 - b) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу
 - i) вариантный ИЛ-2 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34B,
 - ii) полипептид тяжелой цепи главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34C, и
 - iii) Fc-полипептид IgG1, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из N297A, L234A, L235A, L234F, L235E и P331S.

В некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит замену N297A. В некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит замену L234A и замену L235A. В некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит замену L234F и замену L235E. В некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит замену L234F, замену L235E и замену P331S. В некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33B некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33C. В некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33D. В некоторых случаях во второй полипептид входят две копии вариантного ИЛ-2 полипептида. В некоторых случаях первый полипептид содержит пептидный линкер между эпитопом и β2M-полипептидом. В некоторых случаях второй полипептид содержит пептидный линкер между одним или несколькими из

- a) первой копией вариантного ИЛ-2 полипептида и второй копией вариантного ИЛ-2 полипептида;
- b) вариантным ИЛ-2 полипептидом и полипептидом тяжелой цепи ГКГС; и
- c) между полипептидом тяжелой цепи ГКГС и Fc-полипептидом IgG1.

В некоторых случаях пептидный линкер выбран из (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 89), (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 90) и AAAGG (SEQ ID NO: 28).

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит

- a) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу
 - i) эпитоп, содержащий аминокислотную последовательность YMLDLQPETT (SEQ ID NO: 13),
 - ii) полипептид β2-микроглобулина, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34A; и
 - b) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу
 - i) вариантный ИЛ-2 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34B,
 - ii) полипептид тяжелой цепи главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34C, и
 - iii) Fc-полипептид IgG1, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33A, 33B, 33C или 33D.

В некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33B некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33C. В некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33D. В некоторых случаях второй полипептид содержит две копии вариантного ИЛ-2 полипептида. В некоторых случаях первый полипептид содержит пептидный линкер между эпитопом и β2M-полипептидом. В некоторых случаях второй полипептид содержит пептидный линкер между одним или несколькими из

- a) первой копией вариантного ИЛ-2 полипептида и второй копией вариантного ИЛ-2 полипептида;
- b) вариантным ИЛ-2 полипептидом и полипептидом тяжелой цепи ГКГС; и
- c) между полипептидом тяжелой цепи ГКГС и Fc-полипептидом IgG1.

В некоторых случаях пептидный линкер выбран из (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 89), (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 90) и AAAGG (SEQ ID NO: 28). В некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33B некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 со-

держит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33С. В некоторых случаях Fc-полипептид IgG1 содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33D.

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит

a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 31; и

b) второй полипептид, содержащий аминокислотный эквивалент, изображенной на фиг. 22.

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит

a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 31; и

b) второй полипептид, содержащий аминокислотный эквивалент, изображенной на фиг. 25.

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению содержит

a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 31; и

b) второй полипептид, содержащий аминокислотный эквивалент, изображенный на фиг. 28.

Нуклеиновые кислоты.

Данное изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению. Данное изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый ИЛ-2 полипептид по данному изобретению.

Данное изобретение относится к нуклеиновым кислотам, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид по данному изобретению. В некоторых случаях отдельные полипептидные цепи мультимерного полипептида по данному изобретению кодируются отдельными нуклеиновыми кислотами. В некоторых случаях все полипептидные цепи мультимерного полипептида по данному изобретению кодируются одной нуклеиновой кислотой. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению; и вторая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению. В некоторых случаях одиночная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению и второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению.

Неограничивающие примеры нуклеиновых кислот данного изобретения изображены на фиг. 23А, 26А, 29А и 32.

Отдельные нуклеиновые кислоты кодирующие отдельные полипептидные цепи мультимерного полипептида.

Данное изобретение относится к нуклеиновым кислотам, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид по данному изобретению. Как отмечено выше, в некоторых случаях отдельные полипептидные цепи мультимерного полипептида по данному изобретению кодируются в отдельных нуклеиновых кислотах. В некоторых случаях нуклеотидные последовательности, кодирующие отдельные полипептидные цепи мультимерного полипептида по данному изобретению, функционально связаны с элементами контроля транскрипции, например промоторами, такими как промоторы, которые функционируют в эукариотической клетке, причем промотор может быть конститутивным промотором или индуцибельным промотором.

Данное изобретение относится к первой нуклеиновой кислоте и второй нуклеиновой кислоте, причем первая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению, причем первый полипептид содержит в порядке от N-конца к С-концу

a) эпитоп (например, Т-клеточный эпитоп);

b) первый полипептид ГКГС; и

c) иммуномодуляторный полипептид (например, вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению); и

причем вторая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению,

причем второй полипептид содержит, в порядке от N-конца к С-концу

a) второй полипептид ГКГС; и

b) Fc-полипептид Ig.

Подходящие Т-клеточные эпитопы, полипептиды ГКГС, иммуномодулирующие полипептиды и Fc-полипептиды Ig описаны выше. В некоторых случаях нуклеотидные последовательности, кодирующие первый и второй полипептиды, функционально связаны с элементами контроля транскрипции. В некоторых случаях элемент контроля транскрипции является промотором, который функционирует в эукариотической клетке. В некоторых случаях нуклеиновые кислоты присутствуют в отдельных векторах экспрессии.

Данное изобретение относится к первой нуклеиновой кислоте и второй нуклеиновой кислоте, при-

чем первая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению, причем первый полипептид содержит в порядке от N-конца к С-концу

- а) эпитоп (например, Т-клеточный эпитоп); и
- б) первый полипептид ГКГС; и

причем вторая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению, причем второй полипептид содержит в порядке от N-конца к С-концу

- а) иммуномодуляторный полипептид (например, вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению);
- б) второй полипептид ГКГС; и
- с) Fc-полипептид Ig.

Подходящие Т-клеточные эпитопы, полипептиды ГКГС, иммуномодулирующие полипептиды и Fc-полипептиды Ig описаны выше. В некоторых случаях нуклеотидные последовательности, кодирующие первый и второй полипептиды, функционально связаны с элементами контроля транскрипции. В некоторых случаях элемент контроля транскрипции является промотором, который функционирует в эукариотической клетке. В некоторых случаях нуклеиновые кислоты присутствуют в отдельных векторах экспрессии.

Нуклеиновая кислота кодирующая два или более полипептидов, присутствующих в мультимерном полипептиде.

Данное изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидные последовательности, кодирующие по меньшей мере первый полипептид и второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению. В некоторых случаях, когда мультимерный полипептид по данному изобретению включает первый, второй и третий полипептид, нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность, кодирующую первый, второй и третий полипептиды. В некоторых случаях нуклеотидные последовательности, кодирующие первый полипептид и второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению, включают протеолитически расщепляемый линкер, вставленный между нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый полипептид, и нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй полипептид. В некоторых случаях нуклеотидные последовательности, кодирующие первый полипептид и второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению, включают внутренний сайт входа в рибосому (IRES - internal ribosome entry site), расположенный между нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый полипептид, и нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй полипептид. В некоторых случаях нуклеотидные последовательности, кодирующие первый полипептид и второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению, включают сигнал пропуска рибосомы (или цис-действующий элемент гидролазы, CHYSEL - cis-acting hydrolase element), расположенный между нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый полипептид, и нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй полипептид. Примеры нуклеиновых кислот описаны ниже, причем протеолитически расщепляемый линкер представляется между нуклеотидными последовательностями, кодирующими первый полипептид и второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению; в любом из этих вариантов осуществления вместо нуклеотидной последовательности, кодирующей протеолитически расщепляемый линкер, можно использовать IRES или сигнал пропуска рибосомы.

В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота (например, рекомбинантный вектор экспрессии, мРНК, вирусная РНК и т.д.) содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первую полипептидную цепь мультимерного полипептида по данному изобретению; и вторая нуклеиновая кислота (например, рекомбинантный вектор экспрессии, мРНК, вирусная РНК и т.д.) содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую вторую полипептидную цепь мультимерного полипептида по данному изобретению. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая первый полипептид, и вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая второй полипептид, каждая функционально связаны с элементами контроля транскрипции, например, с промоторами, такими как промоторы, которые функционируют в эукариотической клетке, причем промотор может быть конститутивным промотором или индуцибельным промотором.

Данное изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный полипептид, причем рекомбинантный полипептид содержит в порядке от N-конца к С-концу

- а) эпитоп (например, эпитоп Т-клеток);
- б) первый полипептид ГКГС;
- с) иммуномодуляторный полипептид (например, вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению);
- д) протеолитически расщепляемый линкер;
- е) второй полипептид ГКГС; и
- ф) Fc-полипептид иммуноглобулина (Ig).

Данное изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный полипептид, причем рекомбинантный полипептид содержит в порядке от N-конца к С-концу

- a) первый лидерный пептид;
- b) эпитоп;
- c) первый полипептид ГКГС;
- d) иммуномодуляторный полипептид (например, вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению);
- e) протеолитически расщепляемый линкер;
- f) второй лидерный пептид;
- g) второй полипептид ГКГС; и
- h) Fc-полипептид Ig.

Данное изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный полипептид, причем рекомбинантный полипептид содержит в порядке от N-конца к С-концу

- a) эпитоп;
- b) первый полипептид ГКГС;
- c) протеолитически расщепляемый линкер;
- d) иммуномодуляторный полипептид (например, вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению);
- e) второй полипептид ГКГС; и
- f) Fc-полипептид Ig.

В некоторых случаях первый лидерный пептид и второй лидерный пептид представляют собой лидерный пептид β 2-М. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность функционально связана с элементом контроля транскрипции. В некоторых случаях элемент контроля транскрипции является промотором, который функционирует в эукариотической клетке.

Подходящие полипептиды ГКГС описаны выше. В некоторых случаях первый полипептид ГКГС представляет собой полипептид β 2-микроглобулина; и причем второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I. В некоторых случаях полипептид β 2-микроглобулина содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность аминокислотной последовательности с одной из аминокислотных последовательностей, представленных на фиг. 6. В некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I представляет собой тяжелую цепь ЧЛА-А, ЧЛА-В, ЧЛА-С, ЧЛА-Е, ЧЛА-Ф, ЧЛА-Г, ЧЛА-К или ЧЛА-Л. В некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной на одной из фиг. 5А-5С. В некоторых случаях первый полипептид ГКГС представляет собой полипептид альфа-цепи ГКГС класса II; и причем второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид бета-цепи ГКГС класса II.

Подходящие Fc-полипептиды описаны выше. В некоторых случаях Fc-полипептид Ig представляет собой Fc-полипептид IgG1, Fc-полипептид IgG2, Fc-полипептид IgG3, Fc-полипептид IgG4, Fc-полипептид IgA или Fc-полипептид IgM. В некоторых случаях Fc-полипептид Ig содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 4А-4С.

Подходящие иммуномодулирующие полипептиды описаны выше.

Подходящие протеолитически расщепляемые линкеры описаны выше. В некоторых случаях протеолитически расщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из

- a) LEVLFQGP (SEQ ID NO: 29);
- b) ENLYTQS (SEQ ID NO: 30);
- c) DDDDK (SEQ ID NO: 31);
- d) LVPR (SEQ ID NO: 32); и
- e) GSGATNFSLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 33).

В некоторых случаях линкер между эпитопом и первым полипептидом ГКГС содержит первый остаток Cys, а второй полипептид ГКГС содержит аминокислотную замену для получения второго остатка Cys, так что первый и второй остатки Cys обеспечивают дисульфидную связь между линкером и вторым полипептидом ГКГС. В некоторых случаях первый полипептид ГКГС содержит аминокислотную замену для получения первого остатка Cys, а второй полипептид ГКГС содержит аминокислотную замену для получения второго остатка Cys, так что первый остаток Cys и второй остаток Cys обеспечивают дисульфидную связь между первым полипептидом ГКГС и вторым полипептидом ГКГС.

Рекомбинантные векторы экспрессии.

Данное изобретение обеспечивает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие нуклеиновые кислоты по данному изобретению. В некоторых случаях рекомбинантный вектор экспрессии является

невирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор экспрессии представляет собой вирусную конструкцию, например, рекомбинантную аденоассоциированную вирусную конструкцию (см., например, патент США № 7078387), рекомбинантную аденовирусную конструкцию, рекомбинантную лентивирусную конструкцию, рекомбинантную ретровирусную конструкцию, неинтегрирующийся вирусный вектор и др.

Подходящие векторы экспрессии включают, но не ограничиваются ими, вирусные векторы (например, вирусные векторы на основе вируса коровьей оспы; полиовируса; аденовируса (см., например, Li et al., *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35:2543-2549, 1994; Borrás et al., *Gene Ther.*, 6:515-524, 1999; Li and Davidson, *PNAS*, 92:7700-7704, 1995; Sakamoto et al., *Hum. Gene Ther.*, 5:1088-1097, 1999; WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984; и WO 95/00655); аденоассоциированного вируса (см., например, Ali et al., *Hum. Gene Ther.*, 9:81-86, 1998; Flannery et al., *PNAS*, 94:6916-6921, 1997; Bennett et al., *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38:2857-2863, 1997; Jomary et al., *Gene Ther.*, 4:683-690, 1997; Rolling et al., *Hum. Gene Ther.*, 10:641-648, 1999; Ali et al., *Hum. Mol. Genet.*, 5:591-594, 1996; Srivastava in WO 93/09239, Samulski et al., *J. Vir.* (1989), 63:3822-3828; Mendelson et al., *Virology* (1988), 166:154-165; и Flotte et al., *PNAS* (1993), 90:10613-10617); SV40; вируса простого герпеса; вируса иммунодефицита человека (см., например, Miyoshi et al., *PNAS*, 94:10319-23, 1997; Takahashi et al., *J. Virology*, 73:7812-7816, 1999); ретровирусные векторы (например, вируса мышинной лейкемии, вируса некроза селезенки и векторов, полученных из ретровирусов, таких как вирус саркомы Рауса, вирус саркомы Харви, вирус лейкоза птиц, лентивирус, вирус иммунодефицита человека, вирус миелопролиферативной саркомы и вирус опухоли молочной железы) и т.п.

Специалистам в данной области известны многочисленные подходящие векторы экспрессии, и многие из них коммерчески доступны. Следующие векторы приведены в качестве примера; для эукариотических клеток-хозяев: pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG и pSVLSV40 (Pharmacia). Однако может использоваться любой другой вектор, если он совместим с клеткой-хозяином.

В зависимости от используемой системы хозяин/вектор, любой из подходящих элементов управления транскрипцией и трансляцией, включая конститутивные и индуцибельные промоторы, элементы энхансера транскрипции, терминаторы транскрипции и т.д., может использоваться в векторе экспрессии (см., например, Bitter et al. (1987), *Methods in Enzymology*, 153:516-544).

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая РНК, нацеленную на ДНК, и/или сайт-направленный модифицирующий полипептид, функционально связана с контрольным элементом, например, с транскрипционным контрольным элементом, таким как промотор. Элемент контроля транскрипции может быть функциональным либо в эукариотической клетке, например в клетке млекопитающего; или прокариотической клетке (например, клетке бактерий или архей). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая РНК, нацеленную на ДНК, и/или сайт-направленный модифицирующий полипептид, функционально связана с несколькими контрольными элементами, которые позволяют экспрессию нуклеотидной последовательности, кодирующей РНК, нацеленную на ДНК, и/или сайт-направленную модифицирующий полипептид как в прокариотических, так и в эукариотических клетках.

Неограничивающие примеры подходящих эукариотических промоторов (промоторов, функционирующих в эукариотической клетке) включают промоторы цитомегаловируса (CMV) (ранние), тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV), SV40 (ранние и поздние), длинных концевых повторов (LTR) из ретровируса и металлопротеин-1 мыши. Выбор подходящего вектора и промотора находится в пределах обычного уровня техники в данной области. Вектор экспрессии также может содержать сайт связывания рибосомы для инициации трансляции и терминатор транскрипции. Вектор экспрессии может также включать соответствующие последовательности для усиления экспрессии.

Генетически модифицированные клетки-хозяева.

Данное изобретение обеспечивает генетически модифицированную клетку-хозяин, причем указанная клетка-хозяин генетически модифицирована нуклеиновой кислотой по данному изобретению.

Подходящие клетки-хозяева включают эукариотические клетки, такие как дрожжевые клетки, клетки насекомых и клетки млекопитающих. В некоторых случаях клетка-хозяин является клеткой линии клеток млекопитающих. Подходящие клеточные линии млекопитающих включают клеточные линии человека, клеточные линии приматов, отличных от человека, клеточные линии грызунов (например, мыши, крысы) и т.п. Подходящие клеточные линии млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, клетки HeLa (например, Американская коллекция типовых культур (ATCC) № CCL-2), клетки CHO (например, ATCC № CRL9618, CCL61, CRL9096), клетки 293 (например, ATCC № CRL-1573), клетки Vero, клетки NIH 3T3 (например, ATCC № CRL-1658), клетки Huh-7, клетки ВНК (например, ATCC № CCL10), клетки PC12 (ATCC № CRL1721) Клетки COS, клетки COS-7 (ATCC № CRL1651), клетки RAT1, L-клетки мыши (ATCC № CCL1. 3), клетки эмбриональной почки человека (HEK) (ATCC № CRL1573), клетки HLHerG2 и т.п.

В некоторых случаях клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, которая была генетически модифицирована таким образом, что она не синтезирует эндогенный β2-М ГКГС.

Способы получения мультимерного полипептида.

Данное изобретение обеспечивает способы получения мультимерного полипептида по данному изобретению. Указанные способы обычно включают культивирование в культуральной среде клетки-хозяина, которая генетически модифицирована рекомбинантным вектором экспрессии, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую мультимерный полипептид; и выделение мультимерного полипептида из генетически модифицированной клетки-хозяина и/или культуральной среды. Клетка-хозяин, которая генетически модифицирована рекомбинантным экспрессирующим вектором, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую мультимерный полипептид, также называется "экспрессирующим хозяином". Как отмечено выше, в некоторых случаях отдельные полипептидные цепи мультимерного полипептида по данному изобретению кодируются в отдельных рекомбинантных векторах экспрессии. В некоторых случаях все полипептидные цепи мультимерного полипептида по данному изобретению кодируются в одном рекомбинантном векторе экспрессии.

Выделение мультимерного полипептида из экспрессирующей клетки-хозяина (например, из лизата экспрессирующей клетки-хозяина) и/или культуральной среды, в которой культивируется клетка-хозяин, может быть осуществлено с использованием стандартных способов очистки белка.

Например, лизат может быть получен из экспрессирующего хозяина и указанный лизат очищен с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), эксклюзионной хроматографии, гель-электрофореза, аффинной хроматографии или другого способа очистки. Альтернативно, когда мультимерный полипептид секретируется из экспрессирующей клетки-хозяина в культуральную среду, мультимерный полипептид может быть очищен из культуральной среды с использованием ВЭЖХ, эксклюзионной хроматографии, гель-электрофореза, аффинной хроматографии или другой методики очистки. В некоторых случаях композиции, которые используются, будут включать по меньшей мере 80 мас.%, по меньшей мере около 85 мас.%, по меньшей мере около 95 мас.% или по меньшей мере около 99,5 мас.% желаемого продукта по отношению к загрязнениям, связанным со способом приготовления продукта и его очистки. Проценты могут быть основаны на общем содержании белка.

В некоторых случаях, например, когда мультимерный полипептид содержит аффинный тэг, этот мультимерный полипептид может быть очищен с использованием иммобилизованного связывающего партнера аффинного тэга.

Композиции.

Данное изобретение обеспечивает композиции, включая фармацевтические композиции, содержащие вариант ИЛ-2 полипептид по данному изобретению. Данное изобретение относится к композициям, включая фармацевтические композиции, содержащие мультимерный полипептид по данному изобретению. Данное изобретение обеспечивает композиции, включая фармацевтические композиции, содержащие нуклеиновую кислоту или рекомбинантный вектор экспрессии данного изобретения.

Композиции, содержащие мультимерный полипептид.

Композиция по данному изобретению может содержать, помимо мультимерного полипептида по данному изобретению, один или несколько из следующих компонентов: соль, например, NaCl, MgCl₂, KCl, MgSO₄ и т.д.; буферный агент, например трис-буфер, N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновая кислота) (HEPES), 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), соль 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), 3-(N-морфолино)пропансульфоновую кислоту (MOPS), N-трис [гидроксиметил]метил-3-аминопропансульфоновую кислоту (TAPS) и т.д.; солиобилизирующий агент; детергент, например неионный детергент, такой как Твин-20 и т.д.; ингибитор протеазы; глицерин и т.п.

Композиция может содержать фармацевтически приемлемый эксципиент, разнообразие которых известно в данной области и не нуждается в подробном обсуждении в данном документе. Фармацевтически приемлемые наполнители были подробно описаны в различных публикациях, включая, например, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 19th ed. (1995), or latest edition, Mack Publishing Co; A. Gennaro (2000), "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999), H.C. Ansel et al., eds 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; и Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000), A.H. Kibbe et al., eds., 3rd ed., Amer. Pharmaceutical Assoc.

Фармацевтическая композиция может содержать мультимерный полипептид по данному изобретению и фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых случаях рассматриваемая фармацевтическая композиция будет подходящей для введения субъекту, например, будет стерильной. Например, в некоторых вариантах осуществления рассматриваемая фармацевтическая композиция будет подходящей для введения человеку, например, если композиция является стерильной и не содержит обнаруживаемых пирогенов и/или других токсинов.

Белковые композиции могут содержать другие компоненты, такие как фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала, стеарата магния, сахарина натрия, талька, целлюлозы, глюкозы, сахарозы, магния, карбоната и т.п. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH и буферные агенты, регулирующие токсичность агенты и т.п., например ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, лактат натрия, бромурид натрия, сульфатные соли, сольваты (например, смешанные ионные соли, вода, органика), гидраты (например, вода) и т.п.

Например, композиции могут включать водный раствор, порошковую форму, гранулы, таблетки, пилюли, суппозитории, капсулы, суспензии, спреи и т.п. Композиция может быть составлена в соответствии с различными путями введения, описанными ниже.

Когда мультимерный полипептид по данному изобретению вводят в виде инъекций (например, подкожно, внутривенно, внутримышечно и/или внутримышечно) непосредственно в ткань, препарат может быть предоставлен в виде готовой к употреблению лекарственной формы или в виде не водной формы (например, восстанавливаемый стабильный при хранении порошок) или водной формы, такой как жидкость, состоящая из фармацевтически приемлемых носителей и наполнителей. Также могут быть предоставлены белоксодержащие препараты для увеличения периода полужизни в сыворотке предметного белка после введения. Например, белок может быть представлен в виде липосомной композиции, приготовленной в виде коллоида, или другими общепринятыми способами для увеличения периода полужизни в сыворотке. Для получения липосом доступно множество способов, как описано, например, в Szoka et al., 1980, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9:467; патенты США № 4235871, 4501728 и 4837028. Препараты могут также предоставляться в формах с контролируемым высвобождением или в форме с медленным высвобождением.

Другие примеры составов, подходящих для парентерального введения, включают изотонические стерильные инъекционные растворы, антиоксиданты, бактериостаты и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. Например, рассматриваемая фармацевтическая композиция может присутствовать в контейнере, например стерильном контейнере, таком как шприц. Композиции могут быть предоставлены в герметичных контейнерах с единичными или многократными дозами, таких как ампулы и пузырьки, и могут храниться в высушенном замораживании (лиофилизированном) состоянии, требуя только добавления стерильного жидкого эксципиента, например воды, для инъекций, непосредственно перед использованием. Инъекционные растворы и суспензии для немедленного введения могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

Концентрация мультимерного полипептида по данному изобретению в композиции может широко варьироваться (например, от менее чем около 0,1%, обычно от или по меньшей мере от около 2% до от около 20 до 50% или более по массе) и будет обычно выбираться в основном на основе объемов жидкости, вязкости и факторов, связанных с пациентом, в соответствии с выбранным конкретным способом введения и потребностями пациента.

Данное изобретение обеспечивает контейнер, содержащий композицию данного изобретения, например, жидкую композицию. Контейнер может представлять собой, например, шприц, ампулу и т.п. В некоторых случаях контейнер стерильен. В некоторых случаях как контейнер, так и композиция являются стерильными.

Данное изобретение обеспечивает композиции, включая фармацевтические композиции, содержащие вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению. Композиция может содержать

- a) вариантный ИЛ-2 полипептид по данному изобретению; и
- b) эксципиент, как описано выше для мультимерных полипептидов.

В некоторых случаях эксципиент представляет собой фармацевтически приемлемый эксципиент.

Композиции, содержащие нуклеиновую кислоту или рекомбинантный вектор экспрессии.

Данное изобретение обеспечивает композиции, например, фармацевтические композиции, содержащие нуклеиновую кислоту или рекомбинантный вектор экспрессии данного изобретения. В данной области техники известно широкое разнообразие фармацевтически приемлемых эксципиентов, и нет необходимости подробно обсуждать их в данном документе. Фармацевтически приемлемые наполнители подробно описаны в различных публикациях, включая, например, A. Gennaro (2000), "Remington: the Science and Practice of Pharmacy", 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins; *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (1999), H.C. Ansel et al., eds 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; и *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (2000), A.H. Kibbe et al., eds., 3rd ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.

Композиция по данному изобретению может включать

- a) указанную нуклеиновую кислоту или вектор рекомбинантной экспрессии; и
- b) один или несколько из буфера, поверхностно-активного вещества, антиоксиданта, гидрофильного полимера, декстрина, хелатирующего агента, суспендирующего агента, солюбилизатора, загустителя, стабилизатора, бактериостатического агента, смачивающего агента, и консервант.

Подходящие буферы включают, но не ограничиваются ими (такие как N,N-бис(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновая кислота (BES), бис (2-гидроксиэтил) amino-трис (гидроксиметил) метан (BIS-трис), N-(2-гидроксиэтил) пиперазин-N'3-пропансульфоновая кислота (EPPS или HEPPS), глицилглицин, N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (HEPES), 3-(N-морфолино) пропан сульфокислота (MOPS), пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфокислота) (PIPES), бикарбонат натрия, 3-(N-трис(гидроксиметил)метиламино)-2-гидроксипропансульфокислота) TAPSO, (N-трис(гидроксиметил)метил)-2-аминоэтансульфокислота (TES), N-трис(гидроксиметил)метилглицин(трицин), трис (гидроксиметил)аминометан (трис) и др.). Подходящие соли включают, например, NaCl, MgCl₂, KCl, MgSO₄ и т.д.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может включать нуклеиновую кислоту

или вектор рекомбинантной экспрессии по данному изобретению в количестве от около 0,001% до около 90% (вес/вес). В описании составов ниже "рассматриваемая нуклеиновая кислота или рекомбинантный вектор экспрессии" будет пониматься как включающая нуклеиновую кислоту или вектор рекомбинантной экспрессии по данному изобретению. Например, в некоторых вариантах осуществления композиция по данному изобретению содержит нуклеиновую кислоту или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению.

Целевая нуклеиновая кислота или рекомбинантный вектор экспрессии могут быть смешаны, инкапсулированы, конъюгированы или иным образом связаны с другими соединениями или смесями соединений; такие соединения могут включать, например, липосомы или направленные на рецепторы молекулы. Целевая нуклеиновая кислота или рекомбинантный вектор экспрессии могут быть объединены в препарате с одним или несколькими компонентами, которые способствуют поглощению, распределению и/или абсорбции.

Целевая композиция нуклеиновой кислоты или рекомбинантного вектора экспрессии может быть приготовлена в виде любой из множества возможных лекарственных форм, таких как, но не ограничиваясь ими, таблетки, капсулы, гелевые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Целевая композиция нуклеиновой кислоты или рекомбинантного вектора экспрессии также может быть составлена в виде суспензии в водной, неводной или смешанной среде. Водные суспензии могут дополнительно содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, включая, например, натрий карбоксиметилцеллюлозу, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

Состав, содержащий нуклеиновую кислоту или рекомбинантный вектор экспрессии, может представлять собой липосомальный состав. Используемый в данном документе термин "липосома" означает везикулу, состоящую из амфифильных липидов, упорядоченных в виде сферического бислоя или бислоев. Липосомы представляют собой однослойные или многослойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю часть, которая содержит композицию для доставки. Катионные липосомы представляют собой положительно заряженные липосомы, которые могут взаимодействовать с отрицательно заряженными молекулами ДНК с образованием стабильного комплекса. Считается, что липосомы, чувствительные к рН или отрицательно заряженные, захватывают ДНК, а не образуют с ней комплексы. Как катионные, так и некатионные липосомы могут быть использованы для доставки рассматриваемой нуклеиновой кислоты или рекомбинантного вектора экспрессии.

Липосомы также включают в себя "стерически стабилизированные" липосомы, термин, который в контексте данного описания относится к липосомам, содержащим один или несколько специализированных липидов, которые при включении в липосомы приводят к увеличению продолжительности циркуляции по сравнению с липосомами, в которых отсутствуют такие специализированные липиды. Примерами стерически стабилизированных липосом являются те, в которых часть образующей пузырьки липидной части липосомы содержит один или несколько гликолипидов или дериватизирована одним или несколькими гидрофильными полимерами, такими как фрагмент полиэтиленгликоля (PEG). Липосомы и их применение дополнительно описаны в патенте США 6287860, который полностью включен в данное описание посредством ссылки.

Препараты и композиции по данному изобретению могут также включать поверхностно-активные вещества. Использование поверхностно-активных веществ в лекарственных продуктах, составах и эмульсиях хорошо известно в данной области. Поверхностно-активные вещества и их применение дополнительно описаны в патенте США 6287860.

В одном варианте осуществления включены различные усилители проникновения для эффективной доставки нуклеиновых кислот. Помимо содействия диффузии нелипофильных лекарств через клеточные мембраны, усилители проникновения также увеличивают проницаемость липофильных лекарств. Усилители проникновения могут быть классифицированы как принадлежащие к одной из пяти широких категорий, т.е. поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, желчные соли, хелатообразующие агенты и нехелатообразующие несурфактанты. Усилители проникновения и их применение дополнительно описаны в патенте США № 6287860, который полностью включен в данное описание посредством ссылки.

Композиции и препараты для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводной среде, капсулы, гелевые капсулы, саше, таблетки или минитаблетки. Загустители, ароматизаторы, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие добавки или связующие вещества могут быть желательны. Подходящие пероральные препараты включают препараты, в которых указанную бессмысловую нуклеиновую кислоту вводят в сочетании с одним или несколькими усилителями проникновения, поверхностно-активными веществами и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваются ими, жирные кислоты и/или сложные эфиры или их соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли и жирные кислоты и их применение дополнительно описаны в патенте США №. 6287860. Также подходящими являются комбинации усилителей проникновения, например, жирных кислот/солей в сочетании с желчными кислотами/солями. Примером подходящей комбинации является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA (ursodeoxycholic acid). Другие усилители проникновения включают, но не ограничиваются ими, полнокислотный 9-лауриловый эфир и пол-

ноксиэтилен-20-цетиловый эфир. Подходящие усилители проникновения также включают пропиленгликоль, диметилсульфоксид, триэтаноамин, N,N-диметилацетамид, N,N-диметилформамид, 2-пирролидон и его производные, тетрагидрофуруриловый спирт и AZONE™.

Способы модуляции активности Т-клеток.

Данное изобретение обеспечивает способ избирательной модуляции активности эпитоп-специфичной Т-клетки, включающий контакт Т-клетки с мультимерным полипептидом по данному изобретению, причем контакт Т-клетки с мультимерным полипептидом по данному изобретению избирательно модулирует активность эпитоп-специфичной Т-клетки. В некоторых случаях контактирование происходит *in vitro*. В некоторых случаях контактирование происходит *in vivo*. В некоторых случаях контактирование происходит *ex vivo*.

В некоторых случаях, например, когда целевой Т-клеткой является CD8⁺ Т-клетка, мультимерный полипептид содержит полипептиды ГКГС класса I (например, β2-микроглобулин и тяжелую цепь ГКГС класса I). В некоторых случаях, например, когда целевой Т-клеткой является CD4⁺ Т-клетка, мультимерный полипептид содержит полипептиды ГКГС класса II (например, α-цепь ГКГС класса II; β-цепь ГКГС класса II).

Когда мультимерный полипептид по данному изобретению включает иммуномодуляторный полипептид, который является активирующим полипептидом, контакт Т-клетки с мультимерным полипептидом активирует эпитоп-специфичную Т-клетку. В некоторых случаях эпитоп-специфичная Т-клетка представляет собой Т-клетку, которая специфична к эпитопу, присутствующему в раковой клетке, и контакт эпитоп-специфичной Т-клетки с мультимерным полипептидом увеличивает цитотоксическую активность Т-клетки по отношению к раковой клетке. В некоторых случаях эпитоп-специфичная Т-клетка представляет собой Т-клетку, которая специфична к эпитопу, присутствующему на раковой клетке, и контакт эпитоп-специфичной Т-клетки с мультимерным полипептидом увеличивает количество эпитоп-специфичных Т-клеток.

В некоторых случаях эпитоп-специфичная Т-клетка представляет собой Т-клетку, которая специфична к эпитопу, присутствующему на зараженной вирусом клетке, и контакт эпитоп-специфичной Т-клетки с мультимерным полипептидом увеличивает цитотоксическую активность Т-клетки в отношении клетки, инфицированной вирусом. В некоторых случаях эпитоп-специфичная Т-клетка представляет собой Т-клетку, которая специфична к эпитопу, присутствующему на зараженной вирусом клетке, и контакт эпитоп-специфичной Т-клетки с мультимерным полипептидом увеличивает количество эпитоп-специфичных Т-клеток.

Когда мультимерный полипептид по данному изобретению включает иммуномодуляторный полипептид, который является ингибирующим полипептидом, контакт Т-клетки с мультимером ингибирует эпитоп-специфичную Т-клетку. В некоторых случаях эпитоп-специфичная Т-клетка представляет собой автореактивную Т-клетку, которая специфична к эпитопу, присутствующему в собственном(авто) антигене, и указанное контактирование уменьшает количество автореактивных Т-клеток.

Способы избирательной доставки костимуляторного полипептида (например, ил-2).

В данном изобретении представлен способ доставки костимуляторного полипептида, такого как ИЛ-2, или варианта с пониженной аффинностью встречающегося в природе костимуляторного полипептида, такого как вариантный ИЛ-2, раскрытого в данном документе, в выбранную Т-клетку или в выбранную популяцию Т-клеток. например, таким образом, что ТКР специфичен для данного эпитопа. В данном изобретении представлен способ доставки костимуляторного полипептида, такого как ИЛ-2, или варианта с пониженной аффинностью встречающегося в природе компостимулирующего полипептида, такого как вариантный ИЛ-2, раскрытый в данном документе, избирательно к целевой Т-клетке, несущей ТКР, специфичный к эпитопу, присутствующему в мультимерном полипептиде по данному изобретению. Указанный способ включает контактирование популяции Т-клеток с мультимерным полипептидом по данному изобретению. Популяция Т-клеток может представлять собой смешанную популяцию, которая включает

- i) целевую Т-клетку, и
- ii) нецелевые Т-клетки, которые не являются специфичными к эпитопу (например, Т-клетки, которые специфичны к эпитопу(ов), отличного от эпитопа, с которым связывается специфичная к эпитопу Т-клетка).

Эпитоп-специфичная Т-клетка специфична к эпитоп-презентирующему пептиду, присутствующему в мультимерном полипептиде, и связывается с пептидным комплексом ЧЛА или пептидным комплексом ГКГС, обеспечиваемым мультимерным полипептидом. Контактирование популяции Т-клеток с мультимерным полипептидом доставляет костимуляторный полипептид (например, ИЛ-2 или вариантный ИЛ-2 с пониженной аффинностью), присутствующий в мультимерном полипептиде, избирательно к Т-клеткам, которые специфичны к эпитопу, присутствующему в мультимерном полипептиде.

Таким образом, данное изобретение обеспечивает способ доставки костимуляторного полипептида, такого как ИЛ-2, или варианта с пониженной аффинностью встречающегося в природе костимуляторного полипептида, такого как вариантный ИЛ-2, раскрытого в данном документе, или их комбинации, из-

бирательно к целевой Т-клетке, при этом указанный способ, включает контактирование смешанной популяции Т-клеток с мультимерным полипептидом по данному изобретению. Смешанная популяция Т-клеток включает целевые Т-клетки и нецелевые Т-клетки. целевая Т-клетка специфична к эпитопу, присутствующему в мультимерном полипептиде. Контактное взаимодействие смешанной популяции Т-клеток с мультимерным полипептидом по данному изобретению доставляет костимуляторный полипептид(ы), присутствующий в мультимерном полипептиде, к целевой Т-клетке.

Например, мультимерный полипептид по данному изобретению приводится в контакт с популяцией Т-клеток, включающей

i) целевую(ые) Т-клетку(и), которая является специфичной к эпитопу, присутствующему в мультимерном полипептиде, и

ii) нецелевую(ые) Т-клетку(и), например Т-клетку(и), которая специфична для второго эпитопа(ов), который не является эпитопом, присутствующим в мультимерном полипептиде.

Контакт с указанной популяцией приводит к избирательной доставке костимуляторного полипептида(ов) (например, встречающегося в природе костимуляторного полипептида (например, встречающегося в природе ИЛ-2) или варианта с пониженной аффинностью встречающегося в природе костимуляторного полипептида (например, вариантного ИЛ-2), раскрытого в данном документе)), который присутствует в мультимерном полипептиде, к целевой Т-клетке. Таким образом, например, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5% или менее 4, 3, 2 или 1% нецелевых Т-клеток связывают мультимерный полипептид, и в результате костимуляторный полипептид (например, ИЛ-2 или вариантный ИЛ-2) не доставляется к нецелевой Т-клетке.

В некоторых случаях популяция Т-клеток находится в пробирке. В некоторых случаях популяция Т-клеток находится *in vitro*, и биологический ответ (например, активация и/или экспансия Т-клеток и/или фенотипическая дифференциация) популяции целевых Т-клеток на мультимерный полипептид по данному изобретению вызывается в контексте культуры *in vitro*. Например, смешанная популяция Т-клеток может быть получена от индивидуума и может контактировать с мультимерным полипептидом *in vitro*. Такое контактирование может включать однократное или многократное облучение популяции Т-клеток определенной дозой(ами) и/или схемой(ами) воздействия. В некоторых случаях указанное контактирование приводит к избирательному связыванию/активации и/или размножению целевых Т-клеток в популяции Т-клеток и приводит к образованию популяции активированных и/или расширенных целевых Т-клеток. В качестве примера, смешанная популяция Т-клеток может представлять собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК). Например, МКПК от пациента можно получить стандартными способами взятия крови и обогащения МКПК перед воздействием 0,1-1000 нМ мультимерного полипептида по данному изобретению в стандартных условиях культивирования лимфоцитов. В моменты времени до, во время и после воздействия смешанной популяции Т-клеток при определенной дозе и графике, избытке целевых Т-клеток в культуре *in vitro* можно отслеживать с помощью специфичных пептид-ГКГС мультимеров и/или фенотипических маркеров и/или функциональной активности (например, анализы ELISpot на цитокины). В некоторых случаях, после достижения оптимального количества и/или фенотипа антигенспецифичных клеток *in vitro*, вся или часть популяции активированных и/или размноженных целевых Т-клеток вводится индивидууму (индивидууму, от которого указанная смешанная популяция Т-клеток была получена).

В некоторых случаях популяция Т-клеток находится в пробирке. Например, смешанная популяция Т-клеток получается от индивидуума и контактирует с мультимерным полипептидом по данному изобретению *in vitro*. Такое контактирование, которое может включать однократное или многократное воздействие Т-клеток определенной дозой(ами) и/или схемой(ами) воздействия в контексте культуры клеток *in vitro*, может использоваться для определения того, включает ли смешанная популяция Т-клеток Т-клетки, которые специфичны к эпитопу, презентуемому мультимерным полипептидом. Присутствие Т-клеток, которые специфичны к эпитопу мультимерного полипептида, можно определить путем анализа образца, содержащего смешанную популяцию Т-клеток, причем эта популяция Т-клеток содержит Т-клетки, которые не являются специфичными к эпитопу (нецелевые Т-клетки) и может содержать Т-клетки, специфичные к эпитопу (целевой Т-клетки). Известные анализы могут быть использованы для обнаружения активации и/или пролиферации целевых Т-клеток, тем самым обеспечивая анализ *ex vivo*, который может определить, обладает ли конкретный мультимерный полипептид (*synTas*) эпитопом, который связывается с Т-клетками, присутствующими у индивидуума, и, таким образом, будет ли иметь мультимерный полипептид потенциальное применение в качестве терапевтической композиции для этого индивидуума. Подходящие известные анализы для выявления активации и/или пролиферации целевых Т-клеток включают, например, проточно-цитометрическую характеристику Т-клеточного фенотипа и/или специфичности антигена и/или пролиферации. Такой анализ для обнаружения присутствия эпитоп-специфичных Т-клеток, например, сопутствующая диагностика, может дополнительно включать дополнительные анализы (например, анализы ELISpot на эффекторные цитокины) и/или соответствующие контроли (например, окрашивающие реагенты на антигенспецифический и антигеннеспецифический мультимерный пептид-ЧЛА) для определения того, является ли указанный мультимерный полипептид избирательно связывающим/активирующим и/или вызывающим пролиферацию целевых Т-клеток. Та-

ким образом, например, данное изобретение обеспечивает способ обнаружения в смешанной популяции Т-клеток, полученных от индивидуума, присутствия целевой Т-клетки, которая связывает эпитоп, представляющий интерес, причем способ включает

а) контактирование *in vitro* смешанной популяции Т-клеток с мультимерным полипептидом по данному изобретению, при этом мультимерный полипептид содержит эпитоп, представляющий интерес; и

б) обнаружение активации и/или пролиферации Т-клеток в ответ на упомянутое контактирование, причем активированные и/или пролиферированные Т-клетки указывают на присутствие целевой Т-клетки.

Альтернативно и/или дополнительно, если активация и/или экспансия (пролиферация) желаемой популяции Т-клеток получена с использованием мультимерного полипептида, тогда вся или часть популяции Т-клеток, включающая активированные/экспансированные Т-клетки, может быть введена обратно человеку в качестве терапии.

В некоторых случаях популяция Т-клеток находится *in vivo* у индивидуума. В таких случаях способ по данному изобретению для избирательной доставки костимуляторного полипептида (например, ИЛ-2 или ИЛ-2 с пониженной аффинностью) к эпитоп-специфичной Т-клетке включает введение индивидуального мультимерного полипептида.

Эпитоп-специфичная Т-клетка, к которой избирательно доставляется костимуляторный полипептид (например, ИЛ-2 или ИЛ-2 с пониженной аффинностью), также называется в данном документе "целевой Т-клеткой". В некоторых случаях целевой Т-клеткой является регуляторная Т-клетка (Трег). В некоторых случаях Трег ингибирует или подавляет активность аутореактивной Т-клетки.

В некоторых случаях целевой Т-клеткой является цитотоксическая Т-клетка. Например, целевая Т-клетка может быть цитотоксической Т-клеткой, специфичной к эпитопу рака (например, эпитопа, представленного раковой клеткой).

Способы лечения.

Данное изобретение обеспечивает способ избирательной модуляции активности эпитоп-специфичной Т-клетки у индивидуума, причем способ включает введение индивидууму количества мультимерного полипептида по данному изобретению или одной или нескольких нуклеиновых кислот, кодирующих мультимерный полипептид, эффективное для избирательной модуляции активности эпитоп-специфичной Т-клетки у индивидуума. В некоторых случаях способ лечения по данному изобретению включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, одного или нескольких рекомбинантных экспрессирующих векторов, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид по данному изобретению. В некоторых случаях способ лечения по данному изобретению включает введение индивидууму одной или нескольких молекул мРНК, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид по данному изобретению. В некоторых случаях способ лечения по данному изобретению включает введение индивидууму в этом индивидууму мультимерного полипептида по данному изобретению.

Данное изобретение обеспечивает способ избирательной модуляции активности эпитоп-специфичной Т-клетки у индивидуума, причем способ включает введение индивидууму эффективного количества мультимерного полипептида по данному изобретению или одной или нескольких нуклеиновых кислот (например, векторы экспрессии; мРНК и т.д.), содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид, при этом мультимерный полипептид избирательно модулирует активность эпитоп-специфичной Т-клетки у индивидуума. Избирательно модулируя активность эпитоп-специфичной Т-клетки можно лечить заболевание или расстройство у индивидуума. Таким образом, данное изобретение обеспечивает способ лечения, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества мультимерного полипептида по данному изобретению.

В некоторых случаях иммуномодуляторный полипептид является активирующим полипептидом, а мультимерный полипептид активирует эпитоп-специфичную Т-клетку. В некоторых случаях эпитоп представляет собой эпитоп, ассоциированный с раком, и мультимерный полипептид увеличивает активность Т-клетки, специфичной к эпитопу, ассоциированного с раком.

Данное изобретение обеспечивает способ лечения рака у индивидуума, причем способ включает введение индивидууму эффективного количества мультимерного полипептида по данному изобретению или одной или нескольких нуклеиновых кислот (например, векторов экспрессии; мРНК и т.д.), содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид, при этом мультимерный полипептид содержит эпитоп Т-клеток, который является эпитопом рака, и при этом мультимерный полипептид содержит один или несколько стимулирующих иммуномодуляторных полипептидов, как описано в данном документе. В некоторых случаях "эффективное количество" мультимерного полипептида представляет собой количество, которое при введении в одной или нескольких дозах нуждающемуся в этом индивидууму уменьшает количество раковых клеток у индивидуума. Например, в некоторых случаях "эффективное количество" мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или нескольких дозах индивидууму, нуждающемуся в этом, уменьшает количество раковых клеток у индивидуума, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере

на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% по сравнению с количеством раковых клеток у индивидуума перед введением мультимерного полипептида или в отсутствие введения мультимерного полипептида. В некоторых случаях "эффективное количество" мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении одной или нескольких доз индивидууму, нуждающемуся в этом, уменьшает количество раковых клеток у индивидуума до уровней не поддающихся детекции. В некоторых случаях "эффективное количество" мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или нескольких дозах индивидууму, нуждающемуся в этом, уменьшает массу опухоли у индивидуума. Например, в некоторых случаях "эффективное количество" мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или нескольких дозах индивидууму уменьшает массу опухоли у индивидуума, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% по сравнению с опухолью массой у индивидуума перед введением мультимерного полипептида или в отсутствие введения мультимерного полипептида. В некоторых случаях "эффективное количество" мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или нескольких дозах индивидууму увеличивает время выживания индивидуума. Например, в некоторых случаях "эффективное количество" мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или нескольких дозах индивидууму увеличивает время выживания индивидуума по меньшей мере на 1 месяц, по меньшей мере на 2 месяца, по меньшей мере на 3 месяца, от 3 до 6 месяцев, на срок от 6 месяцев до 1 года, на срок от 1 года до 2 ак, на срок от 2 до 5 ак, на срок от 5 до 10 ак или на срок более 10 ак по сравнению с ожидаемым временем выживания индивидуума при отсутствии введения мультимерного полипептида.

В некоторых случаях эпитоп-специфичная Т-клетка представляет собой Т-клетку, которая специфична к эпитопу, присутствующему на зараженной вирусом клетке, и контакт эпитоп-специфичной Т-клетки с мультимерным полипептидом увеличивает цитотоксическую активность Т-клетки в отношении инфицированной вирусом клетки. В некоторых случаях эпитоп-специфичная Т-клетка представляет собой Т-клетку, которая специфична к эпитопу, присутствующему на зараженной вирусом клетке, и контакт эпитоп-специфичной Т-клетки с мультимерным полипептидом увеличивает количество эпитоп-специфичных Т-клеток.

Таким образом в данном изобретении представлен способ лечения вирусной инфекции у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества мультимерного полипептида по данному изобретению или одной или нескольких нуклеиновых кислот, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид, при этом мультимерный полипептид содержит эпитоп Т-клеток, который представляет собой вирусный эпитоп, и при этом мультимерный полипептид содержит один или несколько стимулирующих иммуномодуляторных полипептидов, как описано в данном документе. В некоторых случаях "эффективное количество" мультимерного полипептида представляет собой количество, которое при введении в одной или нескольких дозах индивидууму, нуждающемуся в этом, уменьшает количество инфицированных вирусом клеток у индивидуума. Например, в некоторых случаях "эффективное количество" мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или нескольких дозах индивидууму, нуждающемуся в этом, уменьшает количество инфицированных вирусом клеток у индивидуума, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% по сравнению с количеством инфицированных вирусом клеток у индивидуума перед введением мультимерного полипептида или в отсутствие введения с мультимерного полипептида. В некоторых случаях "эффективное количество" мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или нескольких дозах индивидууму, нуждающемуся в этом, уменьшает количество инфицированных вирусом клеток у индивидуума до уровней не поддающихся детекции.

Таким образом в данном изобретении представлен способ лечения инфекции у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества мультимерного полипептида по данному изобретению или одной или нескольких нуклеиновых кислот, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид, при этом мультимерный полипептид содержит эпитоп Т-клеток, который представляет собой ассоциированный с патогеном эпитоп, и при этом мультимерный полипептид содержит один или несколько стимулирующих иммуномодуляторных полипептидов, как описано в данном документе. В некоторых случаях "эффективное количество" мультимерного полипептида представляет собой количество, которое при введении в одной или нескольких дозах индивидууму, нуждающемуся в этом, уменьшает количество патогенов у индивидуума. Например, в некоторых случаях "эффективное количество" мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой

количество, которое при введении в одной или нескольких дозах индивидууму, нуждающемуся в этом, уменьшает количество патогенов у индивидуума по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% по сравнению с количеством патогенов у индивидуума перед введением мультимерного полипептида или в отсутствие введения мультимерного полипептида. В некоторых случаях "эффективное количество" мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или нескольких дозах индивидууму, нуждающемуся в этом, уменьшает количество патогенов у индивидуума до уровней не поддающихся детекции. Патогены включают вирусы, бактерии, простейшие и т.п.

В некоторых случаях иммуномодуляторный полипептид представляет собой ингибирующий полипептид, и мультимерный полипептид и ингибирует активность эпитоп-специфичной Т-клетки. В некоторых случаях эпитоп является собственным эпитопом, и мультимерный полипептид избирательно ингибирует активность Т-клеток, специфичных для этого эпитопа.

Данное изобретение обеспечивает способ лечения аутоиммунного расстройства у индивидуума, причем способ включает введение индивидууму эффективного количества мультимерного полипептида по данному изобретению или одной или нескольких нуклеиновых кислот, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид, при этом мультимерный полипептид содержит эпитоп Т-клеток, который является собственным эпитопом, и при этом мультимерный полипептид содержит ингибирующий иммуномодуляторный полипептид. В некоторых случаях "эффективное количество" мультимерного полипептида представляет собой количество, которое при введении в одной или нескольких дозах нуждающемуся в этом индивидууму уменьшает число автореактивных Т-клеток по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% по сравнению с числом автореактивных Т-клеток у индивидуума до введения мультимерного полипептида или в отсутствие введения мультимерного полипептида. В некоторых случаях "эффективное количество" мультимерного полипептида представляет собой количество, которое при введении в одной или нескольких дозах индивидууму, нуждающемуся в этом, снижает выработку цитокинов Th2 у индивидуума. В некоторых случаях "эффективное количество" мультимерного полипептида представляет собой количество, которое при введении в одной или нескольких дозах нуждающемуся в этом индивидууму ослабляет один или несколько симптомов, связанных с аутоиммунным заболеванием у индивидуума.

Как отмечено выше, в некоторых случаях при осуществлении способа лечения субъекта мультимерный полипептид по данному изобретению вводят нуждающемуся в этом индивидууму как полипептид сам по себе. В других случаях при осуществлении способа лечения субъекта одну или несколько нуклеиновых кислот, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид по данному изобретению, вводят индивидууму, нуждающемуся в этом. Таким образом, в других случаях одну или несколько нуклеиновых кислот по данному изобретению, например, один или несколько рекомбинантных экспрессирующих векторов по данному изобретению, вводят индивидууму, нуждающемуся в этом.

Препараты.

Подходящие препараты описаны выше, причем подходящие препараты включают фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых случаях подходящая композиция содержит

- a) мультимерный полипептид по данному изобретению; и
- b) фармацевтически приемлемый наполнитель.

В некоторых случаях подходящая композиция содержит

- a) нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую мультимерный полипептид по данному изобретению; и
- b) фармацевтически приемлемый наполнитель; в некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

В некоторых случаях подходящая композиция содержит

- a) первую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению;
- b) вторую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению; и
- c) фармацевтически приемлемый наполнитель.

В некоторых случаях подходящая композиция содержит

- a) рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую мультимерный полипептид по данному изобретению; и
- b) фармацевтически приемлемый наполнитель.

В некоторых случаях подходящая композиция содержит

- a) первый рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеотидную последовательность, ко-

дирующую первый полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению;

b) второй рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению; и

c) фармацевтически приемлемый наполнитель.

Подходящие фармацевтически приемлемые наполнители описаны выше.

Дозы.

Подходящая дозировка может быть определена лечащим врачом или другим квалифицированным медицинским персоналом, основываясь на различных клинических факторах. Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого одного пациента зависят от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретный полипептид или нуклеиновую кислоту, которые следует вводить, пол пациента, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарства, вводимые совместно с дозируемым. Мультимерный полипептид по данному изобретению может вводиться в количествах от 1 нг/кг массы тела до 20 мг/кг массы тела на дозу, например от 0,1 до 10 мг/кг массы тела, например от 0,5 до 5 мг/кг массы тела; однако предполагаются дозы ниже или выше этого примерного диапазона, особенно с учетом вышеупомянутых факторов. Если режим представляет собой непрерывную инфузию, она также может составлять от 1 мкг до 10 мг на килограмм массы тела в минуту. Мультимерный полипептид по данному изобретению можно вводить в количестве от около 1 до 50 мг/кг массы тела, например от около 1 мг/кг массы тела до около 5 мг/кг массы тела, от около 5 мг/кг массы тела до около 10 мг/кг массы тела, от около 10 мг/кг массы тела до около 15 мг/кг массы тела, от около 15 мг/кг массы тела до около 20 мг/кг массы тела, от около 20 мг/кг массы тела до около 25 мг/кг массы тела, от около 25 мг/кг массы тела до около 30 мг/кг массы тела, от около 30 мг/кг массы тела до около 35 мг/кг массы тела от около 35 мг/кг массы тела до около 40 мг/кг массы тела или от около 40 мг/кг массы тела до около 50 мг/кг массы тела.

В некоторых случаях подходящая доза мультимерного полипептида по данному изобретению составляет от 0,01 мкг до 100 г на кг массы тела, от 0,1 мкг до 10 г на кг массы тела, от 1 мкг до 1 г на кг массы тела, масса от 10 мкг до 100 мг на кг массы тела, от 100 мкг до 10 мг на кг массы тела или от 100 мкг до 1 мг на кг массы тела. Специалисты в данной области могут легко оценить частоту повторения для дозирования на основе измеренных времен пребывания и концентраций введенного агента в жидкостях или тканях организма. После успешного лечения может оказаться желательным, чтобы пациент проходил поддерживающую терапию для предотвращения рецидива болезненного состояния, при котором мультимерный полипептид по данному изобретению вводят в поддерживающих дозах в диапазоне от 0,01 мкг до 100 г на кг тела, масса от 0,1 мкг до 10 г на кг массы тела, от 1 мкг до 1 г на кг массы тела, от 10 мкг до 100 мг на кг массы тела, от 100 мкг до 10 мг на кг массы тела, или от 100 мкг до 1 мг на кг массы тела.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что уровни доз могут варьироваться в зависимости от конкретного мультимерного полипептида, степени выраженности симптомов и подверженности субъекта побочным эффектам. Предпочтительные дозировки для данного соединения могут быть легко определены специалистами в данной области с помощью различных средств.

В некоторых вариантах осуществления вводят множественные дозы мультимерного полипептида по данному изобретению, нуклеиновой кислоты по данному изобретению или рекомбинантного вектора экспрессии по данному изобретению. Частота введения мультимерного полипептида по данному изобретению, нуклеиновой кислоты по данному изобретению или рекомбинантного вектора экспрессии по данному изобретению может варьироваться в зависимости от любого из множества факторов, например, серьезности симптомов и т.д. Например, в некоторых вариантах осуществления мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению вводят один раз в месяц, два раза в месяц, три раза в месяц, каждую вторую неделю (qow), один раз в неделю (qw), два раза в неделю (biw), три раза в неделю (tiw), четыре раза в неделю, пять раз в неделю, шесть раз в неделю, через день (qod), ежедневно (qd), два раза в день (qid) или три раза в день (tid).

Продолжительность введения мультимерного полипептида по данному изобретению, нуклеиновой кислоты по данному изобретению или рекомбинантного вектора экспрессии по данному изобретению, например период времени, в течение которого мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновая кислота по данному изобретению, или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению вводятся может варьировать в зависимости от любого из множества факторов, например реакции пациента и т.д. Например, мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению можно вводить в течение периода времени, составляющего от около одного дня до около одной недели, от около двух недель до четырех недель, от одного месяца до двух месяцев, от двух месяцев до четырех месяцев, от четырех месяцев до шести месяцев, от шести месяцев до восьми месяцев, от восьми месяцев до 1 года, от около 1 года до около 2 лет или от около 2 лет до около 4 лет или более.

Пути введения.

Активный агент (мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по

данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению) вводят индивидууму с использованием любого доступного способа и пути, подходящих для доставки лекарственного средства, включая *in vivo* и *ex vivo* способы, а также системные и локализованные пути введения.

Обычные и фармацевтически приемлемые пути введения включают внутриопухолевое, перитуморальное, внутримышечное, внутритрахеальное, внутричерепное, подкожное, внутрикожное, местное применение, внутривенное, внутриартериальное, ректальное, назальное, оральное и другие энтеральные и парентеральные пути введения. Пути введения могут быть объединены, если это желательно, или скорректированы в зависимости от мультимерного полипептида и/или желаемого эффекта. Мультимерный полипептид по данному изобретению или нуклеиновая кислота или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению могут быть введены в одной дозе или в нескольких дозах.

В некоторых вариантах осуществления мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению вводят внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению вводят локально. В некоторых вариантах осуществления мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению вводят перитуморально. В некоторых вариантах осуществления мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению вводят внутритрахеально. В некоторых вариантах осуществления мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению вводят внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению вводят подкожно.

В некоторых вариантах осуществления мультимерный полипептид по данному изобретению вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления мультимерный полипептид по данному изобретению вводят внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления мультимерный полипептид по данному изобретению вводится локально. В некоторых вариантах осуществления мультимерный полипептид по данному изобретению вводят внутритрахеально. В некоторых вариантах осуществления мультимерный полипептид по данному изобретению вводят перитуморально. В некоторых вариантах осуществления мультимерный полипептид по данному изобретению вводят внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления мультимерный полипептид по данному изобретению вводят подкожно.

Мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению могут быть введены хозяину с использованием любых доступных общепринятых способов и путей, подходящих для доставки обычных лекарств, включая системные или локализованные пути. В общем, пути введения, предполагаемые для использования в способе по данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, энтеральный, парентеральный и ингаляционный пути.

Парентеральные пути введения, отличные от ингаляционного введения, включают, но не ограничиваются этим, местный, трансдермальный, подкожный, внутримышечный, внутриорбитальный, внутрикапсулярный, внутриспинальный, интрастернальный, внутриопухолевый, перитуморальный и внутривенный, т.е. любой путь введения, отличный от пути введения через пищеварительный канал. Парентеральное введение может быть осуществлено для осуществления системной или локальной доставки мультимерного полипептида по данному изобретению, нуклеиновой кислоты по данному изобретению или рекомбинантного вектора экспрессии по данному изобретению. В случае, когда желательна системная доставка, введение обычно включает инвазивное или системно всасываемое местное или слизистое введение фармацевтических препаратов.

Подходящие для лечения субъекты.

Субъекты, подходящие для лечения способом по данному изобретению, включают индивидуумов, которые больны раком, включая индивидуумов, у которых был диагностирован рак, индивидуумов, которых лечили от рака, но которые не ответили на лечение, и индивидуумов, у которых лечили рак и которые первоначально ответили, но впоследствии стали невосприимчивыми к лечению. Субъекты, подходящие для лечения способом по данному изобретению, включают индивидуумов, у которых есть инфекция (например, инфекция патогеном, таким как бактерия, вирус, простейшее и т.д.). Включая индивидуумов, у которых была диагностирована инфекция и лиц, которые прошли лечение от инфекции, но не смогли ответить на лечение. Субъекты, подходящие для лечения способом по данному изобретению, включают индивидуумов, у которых есть бактериальная инфекция, включая индивидуумов, у которых была диагностирована бактериальная инфекция, и индивидуумов, которых лечили от бактериальной инфекции, но которые не смогли ответить на лечение. Субъекты, подходящие для лечения способом по данному изобретению, включают индивидуумов, у которых есть вирусная инфекция, включая индиви-

дуумов, у которых была диагностирована вирусная инфекция, и индивидуумов, которых лечили от вирусной инфекции, но которые не смогли ответить на лечение. Субъекты, подходящие для лечения способом по данному изобретению, включают индивидуумов, у которых есть аутоиммунное заболевание, включая индивидуумов, у которых диагностировали аутоиммунное заболевание, и индивидуумов, которые лечились от аутоиммунного заболевания, но не смогли ответить на лечение.

В некоторых случаях, например, когда эпитоп представляет собой эпитоп ВПЧ (HPV), субъектом, подходящим для лечения способом по данному изобретению, является индивидуум, у которого был диагностирован рак, ассоциированный с ВПЧ, или рак, ВПЧ. ВПЧ-ассоциированные и ВПЧ-обусловленные раковые заболевания включают, например, рак головы и шеи; рак шейки матки; и рак мочевого пузыря.

Примеры неограничивающих аспектов изобретения.

Аспекты, включая варианты осуществления данного предмета изобретения, описанные выше, могут быть полезны отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими аспектами или вариантами осуществления. Не ограничивая вышеприведенное описание, некоторые неограничивающие аспекты изобретения, пронумерованные 1-132, продемонстрированы ниже. Как будет понятно специалистам в данной области техники после прочтения этого изобретения, каждый из отдельно пронумерованных аспектов может использоваться или комбинироваться с любым из предшествующих или следующих отдельно пронумерованных аспектов. Это предназначено для обеспечения поддержки всех таких комбинаций аспектов и не ограничивается комбинациями аспектов, явно предоставленными ниже.

Аспект 1. Вариантный ИЛ-2 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере 85%, указанной в SEQ ID NO: 1, причем указанный вариант ИЛ-2 полипептид имеет одну или несколько аминокислотных замен относительно последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, и причем указанный вариант ИЛ-2 полипептид проявляет пониженную аффинность связывания с рецептором ИЛ-2 (ИЛ-2Р), содержащим полипептиды альфа, бета и гамма, имеющие аминокислотные последовательности, изображенные на фиг. 3А-3С, по сравнению с аффинностью связывания аминокислотной последовательности ИЛ-2, указанной в одной из SEQ ID NO: 1 с ИЛ-2Р.

Аспект 2. Вариантный ИЛ-2 полипептид по аспекту 1, причем указанный вариант включает замену одной или нескольких из E15, H16, D20, F42, Y45 и Q126.

Аспект 3. Вариантный ИЛ-2 полипептид по аспекту 1 или аспекту 2, причем указанный вариант иммуномодуляторный полипептид проявляет от менее чем 10% до менее чем 50% аффинности связывания, проявляемой аминокислотной последовательностью ИЛ-2, указанной в SEQ ID NO: 1 с ИЛ-2Р.

Аспект 4. Вариантный ИЛ-2 полипептид по любому из аспектов 1-3, причем указанный вариант включает замены F42 на Ala, Gly, Val, Ile или Leu.

Аспект 5. Вариантный ИЛ-2 полипептид по любому из аспектов 1-3, причем указанный вариант включает замены F42 и D20 или замены F42 и H16.

Аспект 6. Вариантный ИЛ-2 полипептид по любому из аспектов 1-3, причем указанный вариант включает замены F42, D20 и Y45; или причем указанный вариант включает замены F42, H16 и Q126.

Аспект 7. Мультимерный полипептид, содержащий

а) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) эпитоп,

ii) первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС); а также

б) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) второй полипептид ГКГС, а также

ii) необязательно Fc-полипептид иммуноглобулина (Ig) или не-Ig каркас,

при этом мультимерный полипептид содержит один или несколько иммуномодулирующих доменов, причем один или несколько иммуномодулирующих доменов находятся на

A) C-конце первого полипептида;

B) N-конце второго полипептида;

C) C-конце второго полипептида; или же

D) C-конце первого полипептида и на N-конце второго полипептида,

причем по меньшей мере один из иммуномодулирующих доменов находится вариант встречающегося в природе костимуляторного белка, и причем этот указанный вариант проявляет пониженную аффинность к своему партнерскому костимуляторному белку по сравнению с аффинностью встречающегося в природе костимуляторного белка к партнерскому костимуляторному белку.

Аспект 8. Мультимерный полипептид, содержащий

а) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) эпитоп,

ii) первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС); а также

б) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) второй полипептид ГКГС, а также

ii) необязательно Fc-полипептид иммуноглобулина (Ig) или не-Ig каркас,

при этом мультимерный полипептид содержит один или несколько иммуномодулирующих доменов, причем один или несколько иммуномодулирующих доменов находятся на

- A) С-конце первого полипептида;
- B) N-конце второго полипептида;
- C) С-конце второго полипептида; или же
- D) С-конце первого полипептида и на N-конце второго полипептида,

причем по меньшей мере один из одного или нескольких иммуномодулирующих доменов представляют собой вариантный ИЛ-2 полипептид по любому из аспектов 1-6, и

при этом мультимерный полипептид проявляет пониженную аффинность связывания с рецептором ИЛ-2 (ИЛ-2R), содержащим полипептиды альфа, бета и гамма, имеющие аминокислотные последовательности, изображенные на фиг. 3А-3С, по сравнению с аффинностью связывания контрольного мультимерного полипептида, содержащего аминокислотную последовательность ИЛ-2, приведенную в SEQ ID NO: 1 для ИЛ-2R полипептида.

Аспект 9. Мультимерный полипептид по аспекту 8, в котором

- a) первый полипептид содержит в направлении от N-конца к С-концу
 - i) эпитоп,
 - ii) первый полипептид ГКГС; а также iii) вариантный ИЛ-2 полипептид; а также
- b) второй полипептид содержит в направлении от N-конца к С-концу
 - i) второй полипептид ГКГС, а также
 - ii) Fc-полипептид Ig.

Аспект 10. Мультимерный полипептид по аспекту 8, в котором

- a) первый полипептид содержит в направлении от N-конца к С-концу
 - i) эпитоп, а также
 - ii) первый полипептид ГКГС; а также
- b) второй полипептид содержит в направлении от N-конца к С-концу
 - i) вариантный ИЛ-2 полипептид,
 - ii) второй полипептид ГКГС, а также
 - iii) Fc-полипептид Ig.

Аспект 11. Мультимерный полипептид по аспекту 8, в котором

- a) первый полипептид содержит в направлении от N-конца к С-концу
 - i) эпитоп, а также
 - ii) первый полипептид ГКГС; а также
- b) второй полипептид содержит в направлении от N-конца к С-концу
 - i) второй полипептид ГКГС, а также
 - ii) вариантный ИЛ-2 полипептид.

Аспект 12. Мультимерный полипептид по аспекту 8, в котором

- a) первый полипептид содержит в направлении от N-конца к С-концу
 - i) эпитоп, а также
 - ii) первый полипептид ГКГС; а также
- b) второй полипептид, содержащий, в порядке от N-конца к С-концу
 - i) вариантный ИЛ-2 полипептид, а также
 - ii) второй полипептид ГКГС.

Аспект 13. Мультимерный полипептид по аспекту 8, в котором

- a) первый полипептид содержит в направлении от N-конца к С-концу
 - i) эпитоп,
 - ii) первый полипептид ГКГС, а также
 - iii) вариантный ИЛ-2 полипептид; а также
- b) второй полипептид содержит второй полипептид ГКГС.

Аспект 14. Мультимерный полипептид по аспекту 7 или 8, причем не-Ig каркас представляет собой полипептид ХТЕН, полипептид трансферрина, эластиноподобный полипептид, шелкоподобный полипептид или шелкоподобно-эластиноподобный полипептид.

Аспект 15. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 7-14, причем первый полипептид ГКГС представляет собой полипептид β 2-микроглобулина; и причем второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I.

Аспект 16. Мультимерный полипептид по аспекту 15, причем полипептид β 2-микроглобулина содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 85% идентичностью аминокислотной последовательности с одной из аминокислотных последовательностей, представленных на фиг. 6.

Аспект 17. Мультимерный полипептид по аспекту 15, причем полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I представляет собой тяжелую цепь ЧЛА-А, ЧЛА-В или ЧЛА-С.

Аспект 18. Мультимерный полипептид по аспекту 15, причем полипептид тяжелой цепи ГКГС

класса I содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной на одной из фиг. 5A-5C.

Аспект 19. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 7-14, причем первый полипептид ГКГС представляет собой полипептид альфа-цепи ГКГС класса II; и причем второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид бета-цепи ГКГС класса II.

Аспект 20. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 7-19, причем эпитоп представляет собой Т-клеточный эпитоп.

Аспект 21. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 7-13 и 15-20, при этом мультимерный полипептид содержит Fc-полипептид, и причем Fc-полипептид Ig представляет собой Fc-полипептид IgG1, Fc-полипептид IgG2, Fc-полипептид IgG3, Fc-полипептид IgG4 Fc-полипептид IgA или Fc-полипептид IgM.

Аспект 22. Мультимерный полипептид по аспекту 21, причем Fc-полипептид Ig содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 4A-4C.

Аспект 23. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 7-22, причем первый полипептид и второй полипептид нековалентно связаны.

Аспект 24. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 7-22, причем первый полипептид и второй полипептид ковалентно связаны друг с другом.

Аспект 25. Мультимерный полипептид по аспекту 24, причем ковалентная связь осуществляется через дисульфидную связь.

Аспект 26. Мультимерный полипептид по аспекту 25, причем первый полипептид ГКГС или линкер между эпитопом и первым полипептидом ГКГС содержит аминокислотную замену для обеспечения первого остатка Cys, и второй полипептид ГКГС содержит аминокислотную замену для обеспечения второго остатка Cys и причем дисульфидная связь находится между первым и вторым остатками Cys.

Аспект 27. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 7-26, содержащий линкер, вставленный между эпитопом и первым полипептидом ГКГС.

Аспект 28. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 7-26, включающий линкер, вставленный между полипептидом ГКГС и иммуномодуляторным полипептидом.

Аспект 29. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 7-28, включающий 2 вариантных ИЛ-2 полипептида.

Аспект 30. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 8-28, включающий 3 вариантных ИЛ-2 полипептида.

Аспект 31. Мультимерный полипептид по аспекту 29 или аспекту 30, причем 2 или 3 вариантных ИЛ-2 полипептида находятся в тандеме, при этом мультимерный полипептид содержит линкер между указанными вариантными ИЛ-2 полипептидами.

Аспект 32. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 8-31, причем указанный вариантный ИЛ-2 содержит замену одной или нескольких из E15, H16, D20, F42, Y45 и Q126.

Аспект 33. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 8-32, причем указанный вариантный ИЛ-2 содержит замену F42 на Ala, Gly, Val, Ile или Leu.

Аспект 34. Мультимерный полипептид по аспекту 33, причем указанный вариантный ИЛ-2 содержит замены F42 и D20 или замены F42 и H16.

Аспект 35. Мультимерный полипептид по аспекту 33, причем указанный вариантный ИЛ-2 содержит замены F42, D20 и Y45; или причем указанный вариантный ИЛ-2 содержит замены F42, H16 и Q126.

Аспект 36. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный полипептид,

i) причем рекомбинантный полипептид содержит в порядке от N-конца к C-концу

- a) эпитоп,
- b) первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС),
- c) иммуномодуляторный полипептид,
- d) протеолитически расщепляемый линкер или сигнал пропуска рибосомы,
- e) второй полипептид ГКГС, а также
- f) Fc-полипептид иммуноглобулина (Ig),

причем иммуномодуляторный полипептид представляет собой вариант встречающегося в природе костимуляторного белка, и при этом указанный вариант проявляет пониженную аффинность к своему партнерскому костимуляторному белку по сравнению с аффинностью встречающегося в природе костимуляторного белка к партнерскому костимуляторному белку; или же

ii) причем рекомбинантный полипептид содержит в порядке от N-конца к C-концу

- a) эпитоп,
- b) первый полипептид ГКГС,
- c) протеолитически расщепляемый линкер или сигнал пропуска рибосомы,
- d) иммуномодуляторный полипептид,

- e) второй полипептид ГКГС, а также
- f) Fc-полипептид Ig,

причем иммуномодуляторный полипептид представляет собой вариант встречающегося в природе костимуляторного белка, и при этом указанный вариант проявляет пониженную аффинность к своему партнерскому костимуляторному белку по сравнению с аффинностью встречающегося в природе костимуляторного белка к партнерскому костимуляторному белку.

Аспект 37. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный полипептид,

- i) причем рекомбинантный полипептид содержит в порядке от N-конца к C-концу
 - a) эпитоп,
 - b) первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС),
 - c) иммуномодуляторный полипептид,
 - d) протеолитически расщепляемый линкер или сигнал пропуска рибосомы,
 - e) второй полипептид ГКГС, а также
 - f) Fc-полипептид иммуноглобулина (Ig),

причем иммуномодуляторный полипептид представляет собой вариант иммуномодуляторного полипептида по любому из аспектов 1-6; или же

- ii) причем рекомбинантный полипептид содержит в порядке от N-конца к C-концу
 - a) эпитоп,
 - b) первый полипептид ГКГС,
 - c) протеолитически расщепляемый линкер или сигнал пропуска рибосомы,
 - d) иммуномодуляторный полипептид,
 - e) второй полипептид ГКГС, а также
 - f) Fc-полипептид Ig,

причем иммуномодуляторный полипептид представляет собой вариант иммуномодуляторного полипептида по любому из аспектов 1-6.

Аспект 38. Нуклеиновая кислота по аспекту 36 или 37, причем первый полипептид ГКГС представляет собой полипептид β 2-микроглобулина; и причем второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I.

Аспект 39. Нуклеиновая кислота по аспекту 38, причем полипептид β 2-микроглобулина содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность аминокислотной последовательности с одной из аминокислотных последовательностей, представленных на фиг. 6.

Аспект 40. Нуклеиновая кислота по аспекту 38, причем полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I представляет собой тяжелую цепь ЧЛА-А, ЧЛА-В или ЧЛА-С.

Аспект 41. Нуклеиновая кислота по аспекту 40, причем полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной на любой из фиг. 5A-5C.

Аспект 42. Нуклеиновая кислота по аспекту 36 или 37, причем первый полипептид ГКГС представляет собой полипептид альфа-цепи ГКГС класса II и причем второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид бета-цепи ГКГС класса II.

Аспект 43. Нуклеиновая кислота по любому из аспектов 36-42, причем эпитоп представляет собой Т-клеточный эпитоп.

Аспект 44. Нуклеиновая кислота по любому из аспектов 36-43, причем Fc-полипептид Ig представляет собой Fc-полипептид IgG1, Fc-полипептид IgG2, Fc-полипептид IgG3, Fc-полипептид IgG4, Fc-полипептид IgA или Fc-полипептид IgM.

Аспект 45. Нуклеиновая кислота по аспекту 44, причем Fc-полипептид Ig содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 4A-4C.

Аспект 46. Нуклеиновая кислота по любому из аспектов 37-45, причем указанный вариантный иммуномодуляторный ИЛ-2 полипептид содержит замену одной или нескольких из E15, H16, D20, F42, Y45 и Q126.

Аспект 47. Нуклеиновая кислота по любому из аспектов 36-46, при этом мультимерный полипептид содержит второй иммуномодуляторный полипептид, выбранный из CD7, CD30L, CD40, CD70, CD83, ЧЛА-G, MICA, MICB, HVEM, рецептора лимфотоксина-бета 3/TR6, ILT3, ILT4 и HVEM.

Аспект 48. Нуклеиновая кислота по любому из аспектов 36-47, в которой протеолитически расщепляемый линкер или сигнал пропуска рибосомы содержит аминокислотную последовательность, выбранную из

- a) LEVLFQGP (SEQ ID NO: 29);
- b) ENLYTQS (SEQ ID NO: 30);
- c) сайт расщепления фурином; d) LVPR (SEQ ID NO:32);

- e) GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 33);
- f) GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 34);
- g) GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 35); а также
- h) GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 36).

Аспект 49. Нуклеиновая кислота по аспекту 36-48, причем рекомбинантный полипептид содержит в порядке от N-конца к C-концу

- a) первый лидерный пептид;
- b) эпитоп;
- c) первый полипептид ГКГС;
- d) иммуномодуляторный полипептид;
- e) протеолитически расщепляемый линкер или сигнал пропуска рибосомы;
- f) второй лидерный пептид;
- g) второй полипептид ГКГС; а также
- h) Fc-полипептид иммуноглобулина (Ig).

Аспект 50. Нуклеиновая кислота по аспекту 49, причем первый лидерный пептид и второй лидерный пептид представляют собой лидерный пептид β 2-М.

Аспект 51. Нуклеиновая кислота по любому из аспектов 36-50, причем нуклеотидная последовательность функционально связана с элементом контроля транскрипции.

Аспект 52. Нуклеиновая кислота по аспекту 51, в которой элемент контроля транскрипции представляет собой промотор, который функционирует в эукариотической клетке.

Аспект 53. Нуклеиновая кислота по любому из аспектов 36-52, причем первый полипептид ГКГС или линкер между эпитопом и первым полипептидом ГКГС содержит аминокислотную замену для получения первого остатка Cys, а второй полипептид ГКГС содержит аминокислотную замену чтобы получить второй остаток Cys, и причем первый и второй остатки Cys обеспечивают дисульфидную связь между первым полипептидом ГКГС и вторым полипептидом ГКГС.

Аспект 54. Рекомбинантный экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из аспектов 36-52, и причем вектор необязательно является вирусным вектором или невирусным вектором.

Аспект 55. Клетка-хозяин, генетически модифицированная рекомбинантным вектором экспрессии по аспекту 54.

Аспект 56. Клетка-хозяин по аспекту 55, причем клетка-хозяин находится *in vitro* и причем клетка-хозяин необязательно генетически модифицирована так, что клетка не продуцирует эндогенный полипептид β 2-микроглобулина ГКГС.

Аспект 57. Композиция, содержащая

a) первую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

- i) эпитоп,
- ii) первый полипептид ГКГС, а также
- iii) иммуномодуляторный домен,

причем иммуномодуляторный полипептид представляет собой вариант встречающегося в природе костимуляторного белка, и при этом указанный вариант проявляет пониженную аффинность к своему партнерскому костимуляторному белку по сравнению с аффинностью встречающегося в природе костимуляторного белка к партнерскому костимуляторному белку; а также

b) первую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид, содержащий, в порядке от N-конца к C-концу

- i) второй полипептид ГКГС, а также
- ii) Fc-полипептид Ig.

Аспект 58. Композиция, содержащая

a) первую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

- i) эпитоп, а также
- ii) первый полипептид ГКГС; а также

b) первую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) иммуномодуляторный домен, причем иммуномодуляторный домен представляет собой вариант встречающегося в природе костимуляторного белка, и при этом указанный вариант проявляет пониженную аффинность к своему партнерскому костимуляторному белку по сравнению с аффинностью встречающегося в природе костимуляторного белка к партнерскому костимуляторному белку,

- ii) второй полипептид ГКГС, а также
- iii) Fc-полипептид Ig.

Аспект 59. Композиция, содержащая

а) первую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид, содержащий, в порядке от N-конца к С-концу

- i) эпитоп,
- ii) первый полипептид ГКГС, а также
- iii) иммуномодуляторный домен,

причем иммуномодуляторный домен представляет собой вариантный ИЛ-2 полипептид по любому из аспектов 1-6; а также

б) первую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к С-концу

- i) второй полипептид ГКГС, а также
- ii) Fc-полипептид Ig.

Аспект 60. Композиция, содержащая

а) первую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к С-концу

- i) эпитоп, а также
- ii) первый полипептид ГКГС; а также

б) первую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к С-концу

- i) иммуномодуляторный домен, причем иммуномодуляторный домен представляет собой вариантный ИЛ-2 полипептид по любому из аспектов 1-6,
- ii) второй полипептид ГКГС, а также
- iii) Fc-полипептид Ig.

Аспект 61. Композиция по любому из аспектов 57-60, причем первая и/или вторая нуклеиновая кислота присутствует в рекомбинантном векторе экспрессии.

Аспект 62. Клетка-хозяин генетически модифицированная композицией по любому из аспектов 57-61.

Аспект 63. Способ получения мультимерного полипептида по любому из аспектов 7-36, включающий

а) культивирование клетки-хозяина по любому из аспектов 55, 56 и 62 *in vitro* в культуральной среде в условиях, при которых клетка-хозяин синтезирует мультимерный полипептид; а также

б) выделение мультимерного полипептида из клетки-хозяина и/или из культуральной среды.

Аспект 64. Способ по аспекту 63, в котором второй полипептид содержит аффинную метку и причем указанное выделение включает контактирование мультимерного полипептида, продуцируемого клеткой, с партнером по связыванию для аффинной метки, причем партнер по связыванию иммобилизован, тем самым иммобилизуя мультимерный полипептид.

Аспект 65. Способ по аспекту 64, включающий элюирование иммобилизованного мультимерного полипептида.

Аспект 66. Способ избирательной активации эпитоп-специфичной Т-клетки, включающий контакт Т-клетки с мультимерным полипептидом по любому из аспектов 7-35, причем указанное контактирование избирательно активирует эпитоп-специфичную Т-клетку.

Аспект 67. Способ по аспекту 66, причем указанное контактирование происходит *in vitro*.

Аспект 68. Способ по аспекту 66, причем указанное контактирование происходит *in vivo*.

Аспект 69. Способ по аспекту 66, причем эпитоп представляет собой эпитоп, ассоциированный с раком и причем указанное введение избирательно увеличивает активность Т-клетки, специфичной к эпитопу, ассоциированного с раком.

Аспект 70. Способ лечения рака у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества

а) мультимерного полипептида по любому из аспектов 7-35; или же

б) одного или нескольких рекомбинантных экспрессирующих векторов, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид по любому из аспектов 7-35; или же

с) одной или нескольких мРНК, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид по любому из аспектов 7-35,

причем указанный эпитоп представляет собой связанный с раком эпитоп, и причем указанное введение эффективно для избирательной активации специфичной к эпитопу раковой Т-клетки у индивидуума.

Аспект 71. Способ по аспекту 70, в котором указанное введение является подкожным.

Аспект 72. Способ по аспекту 70, в котором указанное введение является внутривенным.

Аспект 73. Способ по аспекту 70, в котором указанное введение является перитуморальным.

Аспект 74. Способ по аспекту 70, в котором указанное введение является системным.

Аспект 75. Способ по аспекту 70, в котором указанное введение является дистальным по отношению к месту лечения.

Аспект 76. Способ по аспекту 70, в котором указанное введение является локальным.

Аспект 77. Способ по аспекту 70, в котором указанное введение происходит в месте лечения или около места лечения.

Аспект 78. Композиция, содержащая

- a) мультимерный полипептид по любому из аспектов 7-35; а также
- b) фармацевтически приемлемый наполнитель.

Аспект 79. Композиция, содержащая

a) нуклеиновую кислоту по любому из аспектов 36-53 или рекомбинантный вектор экспрессии по аспекту 54; а также

- b) фармацевтически приемлемый наполнитель.

Аспект 80. Мультимерный полипептид, содержащий

- a) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

- i) эпитоп,

ii) полипептид β 2-микроглобулина (β 2М), содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34А; а также

- b) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) вариант встречающегося в природе костимуляторного белка и при этом указанный вариант проявляет пониженную аффинность к своему партнерскому костимуляторному белку по сравнению с аффинностью встречающегося в природе костимуляторного белка к партнерскому костимуляторному белку, который необязательно может представлять собой вариантный ИЛ-2 полипептид по любому из аспектов 1-6,

ii) полипептид тяжелой цепи с главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34С, а также

iii) Fc-полипептид IgG1, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из N297A, L234A, L235A, L234F, L235E и P331S (N77A, L14A, L15A, L14F, L15E и P111S, соответственно, на основании нумерации аминокислот продемонстрированной на фиг. 33А).

Аспект 81. Мультимерный полипептид по аспекту 80, причем Fc-полипептид IgG1 содержит замену N297A (N77A на основе аминокислотной нумерации, изображенной на фиг. 33А).

Аспект 82. Мультимерный полипептид по аспекту 80, причем Fc-полипептид IgG1 содержит замену L234A и замену L235A (L14A и L15A на основе аминокислотной нумерации, изображенной на фиг. 33А).

Аспект 83. Мультимерный полипептид по аспекту 80, причем Fc-полипептид IgG1 содержит замену L234F и замену L235E (L14F и L15E на основе аминокислотной нумерации, изображенной на фиг. 33А).

Аспект 84. Мультимерный полипептид по аспекту 80, причем Fc-полипептид IgG1 содержит замену L234F, замену L235E и замены P331S (замены L14F, L15E и P111S на основе аминокислотной нумерации, изображенной на фиг. 33А).

Аспект 85. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 80-84, причем второй полипептид содержит две копии вариантного ИЛ-2 полипептида.

Аспект 86. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 80-85, причем первый полипептид содержит пептидный линкер между эпитопом и β 2М-полипептидом.

Аспект 87. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 80-86, причем второй полипептид содержит пептидный линкер между одним или несколькими из

- a) первой копией вариантного ИЛ-2 полипептида и второй копией вариантного ИЛ-2 полипептида;
- b) вариантным ИЛ-2 полипептидом и полипептидом тяжелой цепи ГКГС; а также
- c) между полипептидом тяжелой цепи ГКГС и Fc-полипептидом IgG1.

Аспект 88. Мультимерный полипептид согласно аспекту 86 или 87, причем пептидный линкер выбран из (GGGGS)₃, (GGGGS)₄ и AAAGG.

Аспект 89. Мультимерный полипептид, содержащий

- a) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

- i) эпитоп,

ii) полипептид β 2-микроглобулина, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34А; а также

- b) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) вариантный ИЛ-2 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34В,

ii) полипептид тяжелой цепи главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34С, а также

iii) Fc-полипептид IgG1, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из N297A, L234A, L235A, L234F, L235E и P331S (N77A, L14A, L15A, L14F, L15E и P111S, соответственно, на основании нумерации аминокислот изображенной на фиг. 33А).

Аспект 90. Мультимерный полипептид по аспекту 89, причем Fc-полипептид IgG1 содержит замену N297A (N77A на основе аминокислотной нумерации, изображенной на фиг. 33А).

Аспект 91. Мультимерный полипептид по аспекту 89, причем Fc-полипептид IgG1 содержит замену L234A и замену L235A (L14A и L15A на основе аминокислотной нумерации, изображенной на фиг. 33А).

Аспект 92. Мультимерный полипептид по аспекту 89, причем Fc-полипептид IgG1 содержит замену L234F и замену L235E (L14F и L15E на основе аминокислотной нумерации, изображенной на фиг. 33A).

Аспект 93. Мультимерный полипептид по аспекту 89, причем Fc-полипептид IgG1 содержит замену L234F, замену L235E и замену P331S (L14F, L15E и P111S на основе аминокислотной нумерации, изображенной на фиг. 33A).

Аспект 94. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 89-93, причем второй полипептид содержит две копии вариантного ИЛ-2 полипептида.

Аспект 95. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 89-94, причем первый полипептид содержит пептидный линкер между эпитопом и β 2М-полипептидом.

Аспект 96. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 89-95, причем второй полипептид содержит пептидный линкер между одним или несколькими из

- a) первой копией вариантного ИЛ-2 полипептида и второй копией вариантного ИЛ-2 полипептида;
- b) вариантным ИЛ-2 полипептидом и полипептидом тяжелой цепи ГКГС; а также
- c) полипептидом тяжелой цепи ГКГС и Fc-полипептидом IgG1.

Аспект 97. Мультимерный полипептид по аспекту 95 или 96, причем пептидный линкер выбран из (GGGGGS)₃, (GGGGGS)₄ и AAAGG.

Аспект 98. Мультимерный полипептид, содержащий

- a) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу:
 - i) эпитоп, содержащий аминокислотную последовательность YMLDLQPETT (SEQ ID NO: 13),
 - ii) полипептид β 2-микроглобулина, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34A; а также
- b) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу
 - i) вариантный ИЛ-2 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34B,
 - ii) полипептид тяжелой цепи главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 34C, а также
 - iii) Fc-полипептид IgG1, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33A, 33B, 33C или 33D.

Аспект 99. Мультимерный полипептид по аспекту 98, причем Fc-полипептид IgG1 содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33B.

Аспект 100. Мультимерный полипептид по аспекту 98, причем Fc-полипептид IgG1 содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33C.

Аспект 101. Мультимерный полипептид по аспекту 98, причем Fc-полипептид IgG1 содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 33D.

Аспект 102. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 98-101, причем второй полипептид содержит две копии вариантного ИЛ-2 полипептида.

Аспект 103. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 98-102, причем первый полипептид содержит пептидный линкер между эпитопом и β 2М полипептидом.

Аспект 104. Мультимерный полипептид по любому из аспектов 98-103, причем второй полипептид содержит пептидный линкер между одним или несколькими из

- a) первой копией вариантного ИЛ-2 полипептида и второй копией вариантного ИЛ-2 полипептида;
- b) вариантным ИЛ-2 полипептидом и полипептидом тяжелой цепи ГКГС; а также
- c) полипептидом тяжелой цепи ГКГС и Fc-полипептидом IgG1.

Аспект 105. Мультимерный полипептид по аспекту 103 или аспекту 104, причем пептидный линкер выбран из (GGGGGS)₃, (GGGGGS)₄ и AAAGG. Аспект 106. Мультимерный полипептид, содержащий

- a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 31;
- b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 22.

Аспект 107. Мультимерный полипептид, содержащий

- a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 31;
- b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 25.

Аспект 108. Мультимерный полипептид, содержащий

- a) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 31;
- b) второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 28.

Аспект 109. Фармацевтическая композиция, содержащая:

- a) мультимерный полипептид по любому из аспектов 80-108; а также
- b) фармацевтически приемлемый наполнитель.

Аспект 110. Одна или несколько нуклеиновых кислот, включающих нуклеотидные последовательности, кодирующие первый и/или второй полипептид мультимерного полипептида, согласно любому из аспектов 80-108.

Аспект 111. Одна или несколько нуклеиновых кислот по аспекту 110, причем нуклеиновая кислота (кислоты) присутствует/присутствуют в рекомбинантных векторах экспрессии.

Аспект 112. Способ избирательной активации эпителио-специфичной Т-клетки, включающий контакт Т-клетки с мультимерным полипептидом по любому из аспектов 80-108, причем указанное контактирование избирательно активирует эпителио-специфичную Т-клетку.

Аспект 113. Способ по аспекту 112, в котором указанное контактирование происходит *in vitro*.

Аспект 114. Способ по аспекту 112, причем указанное контактирование происходит *in vivo*.

Аспект 115. Способ, включающий введение индивидууму эффективного количества

а) мультимерного полипептида по любому из аспектов 80-108; или же

б) одного или нескольких рекомбинантных векторов экспрессии, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид по любому из аспектов 80-108; или же

с) одной или нескольких мРНК, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид по любому из аспектов 80-108, причем указанное введение индуцирует ответ Т-клеток на эпителио у индивидуума.

Аспект 116. Способ по аспекту 115, причем указанное введение является подкожным.

Аспект 117. Способ по аспекту 115, причем указанное введение является внутривенным.

Аспект 118. Способ по аспекту 115, в котором указанное введение является системным.

Аспект 119. Способ по аспекту 115, причем указанное введение является внутримышечным.

Аспект 120. Способ по аспекту 115, причем указанное введение является дистальным по отношению к месту лечения.

Аспект 121. Способ по аспекту 115, в котором указанное введение является локальным.

Аспект 122. Способ по аспекту 115, причем указанное введение находится в месте или вблизи места лечения.

Аспект 123. Способ доставки костимуляторного полипептида избирательно к целевой Т-клетке, включающий контактирование смешанной популяции Т-клеток с мультимерным полипептидом по любому из аспектов 7-35 и 80-108, причем смешанная популяция Т-клеток содержит целевые Т-клетки и нецелевые Т-клетки, причем целевая Т-клетка специфична к эпителио, присутствующему в мультимерном полипептиде, и причем указанное контактирование доставляет костимуляторный полипептид, присутствующий в мультимерном полипептиде, к целевой Т-клетке.

Аспект 124. Способ доставки ИЛ-2 или вариантного ИЛ-2 избирательно к целевой Т-клетке, включающий контакт смешанной популяции Т-клеток с мультимерным полипептидом по любому из аспектов 8-35 и 80-108, причем смешанная популяция Т-клеток включает целевые Т-клетки и нецелевые Т-клетки, причем целевые Т-клетки специфичны к эпителио, присутствующему в мультимерном полипептиде, и причем указанное контактирование доставляет вариантный ИЛ-2 или ИЛ-2, присутствующий в мультимерном полипептиде к целевой Т-клетке.

Аспект 125. Способ по аспекту 123 или 124, причем популяция Т-клеток находится *in vitro*.

Аспект 126. Способ по аспекту 123 или 124, причем популяция Т-клеток находится *in vivo* у индивидуума.

Аспект 127. Способ по аспекту 126, включающий введение мультимерного полипептида индивидууму.

Аспект 128. Способ по любому из аспектов 123-127, в котором целевой Т-клеткой является регуляторная Т-клетка.

Аспект 129. Способ по любому из аспектов 123-127, в котором целевая Т-клетка представляет собой цитотоксическую Т-клетку.

Аспект 130. Способ по аспекту 123 или 124, причем смешанная популяция Т-клеток представляет собой смешанную популяцию Т-клеток, полученную от индивидуума *in vitro*, и причем указанное контактирование приводит к активации и/или пролиферации целевых Т-клеток, генерируя популяцию активированных и/или пролиферированных целевых Т-клеток.

Аспект 131. Способ по п.130, дополнительно включающий введение популяции активированных и/или пролиферированных целевых Т-клеток индивидууму.

Аспект 132. Способ обнаружения в смешанной популяции Т-клеток, полученных от индивидуума, наличия целевой Т-клетки, которая связывает эпителио, представляющий интерес, причем способ включает

а) контактирование смешанной популяции Т-клеток *in vitro* с мультимерным полипептидом по любому из пп.7-35 и 80-108, при этом мультимерный полипептид содержит представляющий интерес эпителио; и

б) обнаружение активации и/или пролиферации Т-клеток в ответ на упомянутое контактирование, причем активированные и/или пролиферированные Т-клетки указывают на присутствие целевой Т-клетки.

Примеры

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области полное раскрытие и описание того, как создать и использовать данное изобретение, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения рассматривают как свое изобретение, так и они не предназначены для обеспечения того, что приведенные ниже эксперименты являются всеми или единственными проведенными экспериментами. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые

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

по - пара(ы) оснований;
кб - килобаза(ы);
пл - пиколитр(ы);
с - секунда(ы);
мин - минута(ы);
ч - час(ы);
ак - аминокислота(ы);
кб - килобаза(ы);
нт - нуклеотид(ы);
кДа - килодальтон(ы);
в/м - внутримышечно(ый);
в/б - внутрибрюшинно(ый);
п/к - подкожно(ый) и т.п.

Пример 1. Производство(продукция) ИЛ-2/synTас.

Была проанализирована продукция ИЛ-2/synTас транзистентно трансфицированными клетками млекопитающих. Как продемонстрировано на фиг. 7А, уровни продукции (в мг/л культуральной среды) двух разных ИЛ-2/synTас через 6-7 дней после транзистентной трансфекции клеток были выше 90 мг/л.

ИЛ-2/synTас, продуцируемые клетками млекопитающих, очищали и подвергали электрофорезу в восстанавливающем и невосстанавливающем полиакриламидном геле. Результаты продемонстрированы на фиг. 7В. Размеры указаны в кДа.

Был получен ИЛ-2/synTас, в котором ИЛ-2 полипептид находился в "легкой цепи" (т.е. в полипептиде, содержащем легкую цепь ГКГС класса I; например, $\beta 2M$) или в "тяжелой цепи" (т.е. в полипептиде, содержащем тяжелую цепь ГКГС класса I). Анализировали уровни экспрессии и стабильность ИЛ-2/synTас.

SynTас продуцировали в клетках млекопитающих. Как продемонстрировано на фиг. 8А, ИЛ-2/synTас, содержащий ИЛ-2 на тяжелой цепи, продуцировался на уровнях, в около 25 раз превышающих уровень ИЛ-2/synTас, содержащий ИЛ-2 на легкой цепи.

ИЛ-2/synTас, продуцируемые клетками млекопитающих, подвергали восстанавливающему и невосстанавливающему электрофорезу в полиакриламидном геле; и гели окрашивали кумасси синим. Как продемонстрировано на фиг. 8В, ИЛ-2/synTас, содержащий ИЛ-2 на тяжелой цепи, был более стабильным, чем ИЛ-2/synTас, содержащий ИЛ-2 на легкой цепи. Размеры указаны в кДа.

Были оценены уровни экспрессии ИЛ-2/synTас, включающего вариантный ИЛ-2. На фиг. 9 продемонстрирован уровень экспрессии ИЛ-2/syn-Tас, в котором ИЛ-2 относится к дикому типу (дт) или содержит различные комбинации F42A, D20K, Q126A, E15A, Y45A и H16A. Уровни экспрессии выражены как процентное изменение относительно уровней экспрессии synTас с ИЛ-2 дикого типа.

Было оценено влияние количества копий ИЛ-2 в ИЛ-2/synTас на уровни экспрессии. ИЛ-2/synTас содержали одну копию (1X), две копии (2X) или три копии (3X) в synTас. Различные ИЛ-2/synTас продуцировались в клетках млекопитающих и анализировались уровни экспрессии. Указанные данные продемонстрированы на фиг. 10. ИЛ-2/synTас с одной или двумя копиями ИЛ-2 демонстрируют сходные уровни экспрессии, тогда как ИЛ-2/synTас с тремя копиями ИЛ-2 демонстрируют более низкие уровни экспрессии. Уровни экспрессии выражены как кратное изменение относительно уровня экспрессии ИЛ-2/synTас с одной копией ИЛ-2.

Пример 2. Активность ИЛ-2/synTас *in vitro*.

Для достижения максимальной специфичности нацеливания через Т-клеточный рецептор аффинность костимуляторного полипептида к его лиганду должна быть ниже, чем аффинность ГКГС к ТКР. Аффинность пептид/ГКГС к ТКР может составлять около 10 мкМ.

Был создан ИЛ-2/synTас, содержащий две копии вариантного ИЛ-2, содержащего замены F42A и H16A. Костимуляторная передача сигналов, индуцированная ИЛ-2/synTас, была протестирована на антигенспецифичных CD8⁺ Т-клетках и неспецифичных CD8⁺ Т-клетках. Антигенспецифичные CD8⁺ Т-клетки и неспецифичные CD8⁺ Т-клетки приводили в контакт с различными концентрациями ИЛ-2/synTас.

Как продемонстрировано на фиг. 11, ИЛ-2/synTас индуцировал костимуляторную передачу сигналов в антигенспецифичных CD8⁺ Т-клетках в значительно более низкой концентрации, чем в неспецифичных CD8⁺ Т-клетках.

Избирательность связывания ИЛ-2/synTас была протестирована. CD8⁺ Т-клетки выделяли из селезенки мышей LCMV или OT1. Т-клетки CD8⁺ инкубировали с ИЛ-2/synTас в различных концентрациях и оставляли связываться в течение 20 мин. ИЛ-2/synTас содержат Fc IgG2a. Связывание ИЛ-2/synTас с CD8⁺ Т-клетками детектировали с использованием меченого фикоэритрином (PE) антитела против IgG2a. Флуоресценцию PE определяли с использованием проточной цитометрии для определения процента клеток, связанных с ИЛ-2/synTас.

Как продемонстрировано на фиг. 12, ИЛ-2/synTас связывается антигенспецифичным образом с CD8⁺ Т-клетками LCMV, но не проявляет значительного связывания с OT1 CD8⁺ Т-клетками. Таким образом, ИЛ-2/synTас избирательно связывается с CD8⁺ Т-клетками, специфичными к эпитопу, присутствующему в ИЛ-2/synTас.

Было определено, избирательно ли ИЛ-2/synTас активирует целевые Т-клетки. CD8⁺ Т-клетки выделяли из селезенки мышей LCMV или OT1. Используемые ИЛ-2/synTас содержали либо замену одной аминокислоты F42A, либо замены F42A и H16A. CD8⁺ Т-клетки стимулировали ИЛ-2/synTас в различных концентрациях в течение 20 мин. Затем клетки окрашивали PE-меченным анти-фосфо-STAT5-антителом. Флуоресценцию PE определяли с помощью проточной цитометрии для определения процента клеток, которые являются фосфо-STAT5-позитивными, причем фосфо-STAT5 является маркером активации.

Как продемонстрировано на фиг. 13, ИЛ-2/synTас индуцировал CD8⁺ стимуляцию (на что указывает % фосфо-STAT5-позитивных клеток) в антигенспецифичных (LCMV) CD8⁺ Т-клетках при значительно более низких концентрациях, чем в неспецифичных (BL6) CD8⁺ Т-клетках.

Специфическая активность различных ИЛ-2/synTас была проанализирована. ИЛ-2/synTас, содержащие одну копию ИЛ-2, две копии ИЛ-2 или три копии ИЛ-2, причем ИЛ-2 содержал различные комбинации F42A, D20K, Q126A, E15A, H16A и Y45A субстраты были протестированы в различных концентрациях на стимуляцию CD8⁺ антигенспецифичных (LCMV) или неспецифичных (BL6) клеток. Определяли процентное содержание клеток позитивных по фосфо-проводнику сигнала и активатору транскрипции 5 (pSTAT5 - phospho-signal transducer and activator of transcription 5). Данные изображены на фиг. 14A-14F.

Пример 3. Активность ИЛ-2/synTас *in vivo*.

Была протестирована активность ИЛ-2/synTас *in vivo*. Тестировали кратность изменения *in vivo* в антигенспецифичных CD8⁺ Т-клетках, после введения забуференного фосфатом физиологического раствора (ФСБ), рекомбинантного ИЛ-2 (pИЛ-2) или ИЛ-2/synTас по данному изобретению. Данные продемонстрированы на фиг. 15, левая панель. Указанные данные показывают, что ИЛ-2/synTас в 10 раз более эффективен, чем pИЛ-2.

Была испытана специфичность ИЛ-2/synTас *in vivo*. После введения ФСБ, pИЛ-2 или ИЛ-2/synTас оценивали антигенспецифичные и антиген-неспецифичные ответы. Данные выражены в процентах клеток лимфатических узлов, которые были антигенспецифичными или антигеннеспецифичными после введения ФСБ, pИЛ-2 или ИЛ-2/synTас. Как продемонстрировано на фиг. 15, правая панель, ИЛ-2/synTас индуцировал антигенспецифичский ответ (выраженный в % максимального разведения сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE - carboxyfluorescein succinimidyl ester), индекса пролиферации Т-клеток). Напротив, ответ, индуцированный pИЛ-2, не был антигенспецифичным.

Был проведен анализ доза-ответ. ИЛ-2/synTас (F42A, H16A) вводили внутривенно в концентрациях 4, 8 и 16 мг/кг. Результаты продемонстрированы на фиг. 16A. Как продемонстрировано на фиг. 16A, ИЛ-2/synTас, введенный в дозе 4 или 8 мг/кг, дал аналогичные результаты; ИЛ-2/synTас, введенный в дозе 16 мг/кг, вызывал наиболее сильную иммуностимулирующую активность.

Эффект пути введения ИЛ-2/synTас был протестирован. ИЛ-2/synTас (F42A, H16A) вводили в дозе 4 мг/кг либо подкожно (SubQ - subcutaneously), либо внутривенно (IP - intraperitoneally). Как продемонстрировано на фиг. 16B, подкожное введение приводило к более сильной иммуностимуляторной активности, чем IP введение.

Было установлено влияние количества копий ИЛ-2 на эффективность. ИЛ-2/synTас, содержащие одну копию ИЛ-2 (F42A, H16A) или две копии ИЛ-2 (F42A, H16A), инъецировали мышам с опухолями, несущими эпитоп E7 ВПЧ. Эпитопом, включенным в ИЛ-2/synTас, был эпитоп E7 ВПЧ. Как продемонстрировано на фиг. 17A и 17B, ИЛ-2/synTас, содержащий две копии ИЛ-2 (F42A, H16A), были более эффективными при уменьшении размера опухоли, чем ИЛ-2/synTас, содержащий только одну копию ИЛ-2 (F42A, H16A).

Пример 4. ФК/ФД (PK/PD) и исследования стабильности ИЛ-2/synTас.

Был проведен фармакокинетический (PK - pharmacokinetic) анализ ИЛ-2/synTас. ИЛ-2/synTас (F42A, D20K, H16A) вводили IP в дозе 10 мг/кг. В различные моменты времени после введения были получены образцы сыворотки и в образцах сыворотки был измерен уровень ИЛ-2/synTас. Как продемонстрировано на фиг. 18, период полужизни в сыворотке ИЛ-2/synTас составлял около 4 ч.

ИЛ-2/synTас вводили внутривенно мышам C57BL/6 в дозе 10 мг/кг и сыворотку собирали через 2 ч после инъекций. ИЛ-2/synTас включал метку His₆. 100 нг введенного белка или эквивалента 40 мкл сыворотки подвергали электрофорезу в додецилсульфат-полиакриламидном геле (SDS-PAGE) в додецилсульфате натрия и исследовали с помощью антитела против (His)₆ или антитела против β-2M. Результаты, изображенные на фиг. 19, показывают, что ИЛ-2/synTас остается стабильным и интактным в течение по меньшей мере 2 ч *in vivo*.

ИЛ-2/synTас хранили при 4°C или 37°C в течение 5 дней. 0,5 мг каждого образца (при 10 мг/мл) анализировали способом эксклюзионной хроматографии. Как продемонстрировано на фиг. 20, ИЛ-2/synTас является стабильным и интактным в течение по меньшей мере 5 дней при 4 или 37°C.

Пример 5. ИЛ-2/synTас-опосредованная экспансия человеческих CMV-специфичных CD8⁺ Т-клеток.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) от доноров-людей были подвергнуты скринингу на реактивность в отношении пула цитомегаловирусных (CMV) пептидов с использованием точечного иммуноферментного анализа (ELISPOT) на ИФН-гамма. МКПК были классифицированы по количеству образованных точек (SFC - spot forming count) как группы CMV-предшественников высокого, среднего, низкого уровня или не являющиеся таковыми. МКПК из каждой группы стимулировали дозами ИЛ-2/synTас ("CUE: ИЛ-2"; synTас, включающий 2 копии вариантного ИЛ-2 MOD, содержащего замены Н16А и F42А) в диапазоне от 30 до 2 нМ. Пятьдесят процентов кондиционированной среды было заменено свежей средой в день 5. На 7-й день, образцы окрашивали панелью антител и анализировали с помощью проточной цитометрии. Окрашивание пентамером, нацеленное на пептид CMV NLVPMVATV (SEQ ID NO: 37), использовали для определения частоты антигенспецифичных клеток CD8⁺. Данные продемонстрированы на фиг. 35. Было определено, что EC₅₀ ИЛ-2/synTас находится в диапазоне от около 1 нМ до около 5 нМ. Фиг. 35 демонстрирует кратность увеличения количества антигенспецифичных CD8⁺ клеток по сравнению с необработанными контролями. Числовые значения на оси X представляют количество SFC каждой донорной МКПК. Столбики ошибок представляют средние +/- значения СО из технических копий каждой точки данных.

Данные, продемонстрированные на фиг. 35 указывают на то, что ИЛ-2/synTас эффективен для увеличения числа эпитоп-специфичных CD8⁺ Т-клеток, в случае когда существует поддающаяся измерению (например, окрашиванием пентамером или SFC) популяция предшественников таких эпитоп-специфичных CD8⁺ Т-клеток.

Пример 6. ИЛ-2/synTас с аминокислотными заменами в Н16.

Варианты ИЛ-2/synTас были получены с заменами в Н16. Были определены уровни экспрессии и аффинность с ИЛ-2Р. Аффинность с ИЛ-2Р определяли с использованием ВY. Данные продемонстрированы на фиг. 36.

Пример 7. Эффекты ИЛ-2/synTас на первичные антигенспецифичные CD8⁺ Т-клетки человека.

Вариант ИЛ-2/synTас связывался с первичными CD8⁺ Т-клетками человека. Вариант ИЛ-2/synTас включает в себя

i) E7 ВПЧ16 (11-20) (YMLDLQPETT; SEQ ID NO: 13) в качестве эпитоп-презентирующего пептида; и
ii) 2 копии вариантного ИЛ-2 MOD, содержащего замены Н16А и F42А). Оценивали связывание вариантного ИЛ-2/synTас с CD8⁺ Т-клетками, специфичными к E7 ВПЧ16 (11-20), или с объемными CD8⁺ Т-клетками. Данные продемонстрированы на фиг. 37.

Фиг. 37 демонстрирует связывание вариантного ИЛ-2/synTас по данному изобретению с первичными человеческими E7 ВПЧ16 (11-20)-специфичными CD8⁺ Т-клетками, как обнаружено с помощью проточной цитометрии. EC₅₀ для связывания с CD8⁺ Т-клетками, специфичными к E7 ВПЧ16 (11-20), составляла 2,6 нМ. Таким образом, вариантный ИЛ-2/synTас проявлял высокоаффинное взаимодействие с опухолевыми антигенспецифичными первичными Т-клетками человека. Связывание было высокоселективным для антигенспецифичных Т-клеток по сравнению со связыванием с нецелевыми (общей популяцией) CD8⁺ Т-клетками.

Оценивали влияние связывания вариантного ИЛ-2/synTас с первичными E7 ВПЧ16 (11-20)-специфичными CD8⁺ Т-клетками человека на фосфорилирование проксимального маркера Т-клеточного рецептора (ТКР) SLP76. Данные продемонстрированы на фиг. 38.

Фиг. 38 демонстрирует влияние связывания вариантного ИЛ-2/synTас с первичными E7 ВПЧ16 (11-20)-специфичными CD8⁺ Т-клетками человека на фосфорилирование SLP76. Связывание вариантного ИЛ-2/synTас с первичными E7 ВПЧ16 (11-20)-специфичными CD8⁺ Т-клетками человека приводило к быстрому увеличению фосфорилирования SLP76. Эффект был сильным (EC₅₀=65 нМ). Эффект был также избирательным, так как контрольный ИЛ-2/synTас, который содержит пептид CMV вместо E7 ВПЧ16 (11-20), приводил только к низким уровням фосфорилирования SLP76.

Были оценены ключевые маркеры активации Т-клеток и цитолитической активности. Первичные E7 ВПЧ16 (11-20)-специфичные Т-клетки человека инкубировали в течение 2 дней с 0 или 100 нМ вариантного ИЛ-2/synTас. Вариант ИЛ-2/synTас включает в себя

i) E7 ВПЧ16 (11-20) в качестве эпитоп-презентирующего пептида; и
ii) 2 копии вариантного ИЛ-2 MOD, содержащего замены Н16А и F42А.

Оценивали продукцию

i) CD25, маркера активации CD8⁺ Т-клеток;
ii) гранзима В, ключевого медиатора гибели целевых клеток через гранул-опосредованный путь; и
iii) CD107α, маркера дегрануляции на CD8⁺ Т-клетках.

Данные продемонстрированы на фиг. 39.

Фиг. 39 демонстрирует влияние связывания вариантного ИЛ-2/synTас с первичными E7 ВПЧ16 (11-20)-специфичными Т-клетками человека на продукцию CD25, гранзима В и CD107α. Данные показывают, что связывание вариантного ИЛ-2/synTас с первичными E7 ВПЧ16 (11-20)-специфичными Т-клетками человека индуцирует дифференцировку Т-клеток в цитолитические эффекторные клетки, о

чем свидетельствует повышенная экспрессия CD25, гранзима В, и CD107 α .

Был оценен эффект связывания вариантного ИЛ-2/synTас с первичными E7 ВПЧ16 (11-20)-специфичными CD8⁺ Т-клетками человека на продукцию IFN- γ . Анализ ELISpot был использован для выявления продукции IFN- γ . Данные продемонстрированы на фиг. 40.

Фиг. 40 демонстрирует влияние связывания вариантного ИЛ-2/synTас с первичными E7 ВПЧ16 (11-20)-специфичными CD8⁺ Т-клетками человека на продукцию IFN- γ . Данные показывают, что связывание вариантного ИЛ-2/synTас с первичными E7 ВПЧ16 (11-20)-специфичными CD8⁺ Т-клетками человека приводило к дозозависимой секреции IFN- γ . Никакой продукции IFN- γ не наблюдалось с контрольным ИЛ-2/synTас, который содержит пептид CMV вместо E7 ВПЧ16 (11-20).

Хотя данное изобретение было описано со ссылкой на его конкретные варианты осуществления, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что могут быть сделаны различные изменения, и эквиваленты могут быть заменены без отклонения от истинной сущности и объема изобретения. Кроме того, может быть сделано много модификаций для адаптации конкретной ситуации, материала, состава вещества, процесса, этапа или этапов процесса к цели, сущности и объему по данному изобретению. Предполагается, что все такие модификации находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мультимерный полипептид, содержащий гетеродимер, содержащий
 - a) первый полипептид, содержащий
 - i) эпитоп вируса папилломы человека, и
 - ii) первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I, где первый пептид ГКГС представляет собой полипептид β 2-микроглобулина (β 2M);
 - b) второй полипептид, содержащий
 - i) второй полипептид ГКГС класса I, где второй полипептид ГКГС класса I представляет собой полипептид тяжелой цепи ЧЛА-А,
 - ii) по меньшей мере один иммуномодулирующий полипептид, где по меньшей мере один иммуномодулирующий полипептид представляет собой вариантный ИЛ-2 полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 44, где аминокислота 16 является Ala и аминокислота 42 является Ala, где процент идентичности определяется выравниванием последовательности, осуществляемым BLAST, и
 - iii) Fc-полипептид иммуноглобулина (Ig).
2. Мультимерный полипептид по п.1, где указанный эпитоп ВПЧ представлен эпитопом ВПЧ E7.
3. Мультимерный полипептид по п.1 или 2, где полипептид β 2M содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотами 21-119 в SEQ ID NO: 95.
4. Мультимерный полипептид по любому из пп.1-3, где полипептид β 2M содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17.
5. Мультимерный полипептид по любому из пп.1-4, где полипептид тяжелой цепи ЧЛА-А содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 19, где процент идентичности определяется выравниванием последовательности, осуществляемым BLAST.
6. Мультимерный полипептид по п.5, где полипептид тяжелой цепи ЧЛА-А содержит Cys в остатке 236 полипептида тяжелой цепи ЧЛА-А на основании нумерации, представленной в SEQ ID NO: 19.
7. Мультимерный полипептид по любому из пп.1-6, где полипептид Ig Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 95% идентичности по аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 57, где процент идентичности определяется выравниванием последовательности, осуществляемым BLAST.
8. Мультимерный полипептид по п.7, где полипептид Ig Fc содержит замену L14A и замену L15A на основании нумерации аминокислот, представленной на SEQ ID NO: 57.
9. Мультимерный полипептид по любому из пп.1-8, где мультимерный полипептид содержит две копии вариантного ИЛ-2 полипептида, где каждая копия содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84.
10. Мультимерный полипептид по п.9, отличающийся тем, что указанный первый полипептид содержит пептидный линкер между эпитопом и полипептидом β 2-микроглобулина, и указанный второй полипептид содержит независимо выбранный пептидный линкер между одним или несколькими из
 - a) первой копией вариантного ИЛ-2 полипептида и второй копией вариантного ИЛ-2 полипептида;
 - b) одной или двумя копиями указанного ИЛ-2 полипептида и указанным полипептидом тяжелой

цепи ГКГС класса I; а также

с) указанным полипептидом тяжелой цепи ГКГС класса I и Fc-полипептидом Ig.

11. Мультимерный полипептид по п.9, где первый полипептид и второй полипептид ковалентно связаны друг с другом посредством дисульфидной связи, где дисульфидная связь связывает Cys в положении аминокислоты 12 полипептида β 2M с Cys в положении аминокислоты 236 полипептида тяжелой цепи ГКГС класса I.

12. Мультимерный полипептид по п.1, содержащий

а) первый полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) эпитоп ВПЧ,

ii) пептидный линкер,

iii) полипептид β 2M, где полипептид β 2M содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотами 21-119 в SEQ ID NO: 95;

б) второй полипептид, содержащий в порядке от N-конца к C-концу

i) вариантный ИЛ-2 полипептид,

ii) пептидный линкер,

iii) вариантный ИЛ-2 полипептид,

iv) необязательный пептидный линкер,

v) полипептид тяжелой цепи ЧЛА-А, где полипептид тяжелой цепи ЧЛА-А содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 19,

vi) необязательный пептидный линкер, а также

vii) Fc-полипептид иммуноглобулина Ig, где полипептид Ig Fc является полипептидом IgG1 Fc который содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 95% идентичности по аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 57,

где пептидные ликеры выбираются независимо и где процент идентичности определяется выравниванием последовательности, осуществляемым BLAST.

13. Мультимерный полипептид по п.12, где первый полипептид и второй полипептид ковалентно связаны друг с другом посредством дисульфидной связи между остатком Cys в положении аминокислоты 12 полипептида β 2M и остатком Cys в положении аминокислоты 236 полипептида тяжелой цепи ГКГС класса I.

14. Мультимерный полипептид по п.12, где указанный эпитоп ВПЧ представлен эпитопом ВПЧ E7.

15. Мультимерный полипептид по п.1, где гетеродимерный полипептид содержит

а) первый полипептид, содержащий

i) эпитоп вируса папилломы человека, где эпитоп содержит аминокислотную последовательность YMLDLQPETT (SEQ ID NO: 13), и

ii) первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), где первый пептид ГКГС представляет собой полипептид β 2-микроглобулина (β 2M), содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17; и

б) второй полипептид, содержащий

i) две копии полипептида ИЛ-2, где каждая копия содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 84,

ii) второй полипептид ГКГС класса I, где второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, и

iii) полипептид Fc иммуноглобулина (Ig).

16. Мультимерный полипептид по п.15,

где полипептид Ig Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 95% идентичности по аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 57, где процент идентичности определяется выравниванием последовательности, осуществляемым BLAST, и где полипептид Ig Fc содержит замену L14A и замену L15A на основании нумерации аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 57,

где мультимерный полипептид содержит ковалентную связь между первым полипептидом и вторым полипептидом и где ковалентная связь содержит дисульфидную связь между остатком Cys в положении аминокислоты 12 полипептида β 2M и остатком Cys в положении аминокислоты 236 полипептида тяжелой цепи ГКГС класса I,

где первый полипептид содержит пептидный линкер между эпитопом и полипептидом β 2M, и

где второй полипептид содержит пептидный линкер между одним или несколькими из

а) первой копией полипептида ИЛ-2 и второй копией полипептида ИЛ-2;

б) одной из двух копий полипептида ИЛ-2 и полипептидом тяжелой цепи ГКГС класса I; и

с) полипептидом тяжелой цепи ГКГС класса I и полипептидом Ig Fc.

17. Гомодимер, содержащий два гетеродимера по любому из пп.1-16.
18. Фармацевтическая композиция, содержащая гомодимер по п.17.
19. Применение фармацевтической композиции по п.18 для производства лекарственного средства для лечения ВПЧ-ассоциированного рака или ВПЧ-обусловленного рака у индивидуума.
20. Нуклеиновая кислота, содержащая
- a) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид, содержащую
 - i) эпитоп вируса папилломы человека, где эпитоп содержит аминокислотную последовательность YMLDLQPETT (SEQ ID NO: 13), и
 - ii) первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I, где первый пептид ГКГС представляет собой полипептид β 2-микроглобулина (β 2M), содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17; и
 - b) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид, содержащий
 - i) две копии полипептида ИЛ-2, где каждая копия содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 84,
 - ii) второй полипептид ГКГС, где второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, и
 - iii) полипептид Fc иммуноглобулина (Ig).
21. Нуклеиновая кислота по п.20, отличающаяся тем, что полипептид Ig Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерное 95% идентичности по аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 57, где процент идентичности определяется выравниванием последовательности, осуществляемым BLAST, и где полипептид Ig Fc содержит замену L14A и замену L15A на основании нумерации аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 57, где первый полипептид содержит пептидный линкер между эпитопом и полипептидом β 2M, и где второй полипептид содержит пептидный линкер между одним или несколькими из
- a) первой копией полипептида ИЛ-2 и второй копией полипептида ИЛ-2;
 - b) одной из двух копий полипептида ИЛ-2 и полипептидом тяжелой цепи ГКГС класса I; и
 - c) полипептидом тяжелой цепи ГКГС класса I и полипептидом Ig Fc.
22. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.20 или 21.
23. Экспрессирующая клетка-хозяин, которая генетически модифицирована вектором экспрессии по п.22, где клетка-хозяин находится *in vitro*.
24. Экспрессирующая клетка-хозяин, которая генетически модифицирована нуклеиновой кислотой по п.20 или 21, где клетка-хозяин находится *in vitro*.
25. Способ получения первого и второго полипептидов, закодированных нуклеиновой кислотой по п.20 или 21, где способ включает культивирование генетически модифицированной экспрессирующей клетки-хозяина по п.23 или 24 в культуральной среде в условиях, при которых указанная клетка синтезирует первый и второй полипептиды.
26. Композиция первой и второй нуклеиновых кислот для получения гетеродимера, где
- a) первая нуклеиновая кислота содержит первую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид, содержащий
 - i) эпитоп вируса папилломы человека, где эпитоп содержит аминокислотную последовательность YMLDLQPETT (SEQ ID NO: 13), и
 - ii) первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), где первый пептид ГКГС представляет собой полипептид β 2-микроглобулина (β 2M), содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17; и
 - b) вторая нуклеиновая кислота содержит вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид, содержащий
 - i) две копии полипептида ИЛ-2, каждая копия содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 84,
 - ii) второй полипептид ГКГС, где второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, и
 - iii) полипептид Fc иммуноглобулина (Ig).
27. Композиция нуклеиновых кислот по п.26, отличающаяся тем, что полипептид Ig Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерное 95% идентичности по аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 57, где процент идентичности определяется выравниванием последовательности, осуществляемым BLAST, и где полипептид Ig Fc содержит замену L14A и замену L15A на основании нумерации аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 57, где первый полипептид содержит пептидный линкер между эпитопом и полипептидом β 2M, и где второй полипептид содержит пептидный линкер между одним или несколькими из
- a) первой копией полипептида ИЛ-2 и второй копией полипептида ИЛ-2;

- b) одной из двух копий полипептида ИЛ-2 и полипептидом тяжелой цепи ГКГС класса I; и
c) полипептидом тяжелой цепи ГКГС класса I и полипептидом Ig Fc.
28. Композиция для получения гетеродимера, где композиция содержит один или нескольких векторов экспрессии, содержащих молекулы нуклеиновых кислот по п.26 или 27.
29. Экспрессирующая клетка-хозяин, которая генетически модифицирована одним или несколькими векторами экспрессии по п.28, где клетка-хозяин находится *in vitro*.
30. Экспрессирующая клетка-хозяин, которая генетически модифицирована нуклеиновыми кислотами по п.26 или 27, где клетка-хозяин находится *in vitro*.
31. Способ получения гетеродимера, закодированного нуклеиновой кислотой по п.26 или 27, где способ включает культивирование экспрессирующей клетки-хозяина по п.29 или 30 в культуральной среде в условиях, при которых указанная клетка синтезирует первый и второй полипептиды.
32. Гетеродимер, содержащий
- первый полипептид, содержащий
 - ассоциированный с раком эпитоп, отличный от эпитопа вируса папилломы человека,
 - первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I, где первый пептид ГКГС представляет собой полипептид β 2-микроглобулина (β 2М), содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотами 21-119 в SEQ ID NO: 95, где процент идентичности определяется выравниванием последовательности, осуществляемым BLAST;
 - второй полипептид, содержащий
 - две копии полипептида ИЛ-2, где каждая копия содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 84, где два полипептида ИЛ-2 связаны пептидным линкером,
 - второй полипептид ГКГС, где второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I, а также
 - Fc-полипептид иммуноглобулина (Ig).
33. Гетеродимер по п.32, где полипептид Ig Fc представляет собой полипептид IgG1 Fc, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 95% идентичности по аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 57, где процент идентичности определяется выравниванием последовательности, осуществляемым BLAST, и где полипептид Ig Fc содержит замену L14A и замену L15A на основании нумерации аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 57, и второй полипептид содержит линкер между одним или несколькими из
- первой копией полипептида ИЛ-2 и второй копией полипептида ИЛ-2;
 - одной из двух копий полипептида ИЛ-2 и полипептидом тяжелой цепи ГКГС; и
 - полипептидом тяжелой цепи ГКГС и полипептидом Fc IgG1.
34. Гетеродимер по п.32 или 33, где мультимерный полипептид содержит ковалентную связь между первым полипептидом и вторым полипептидом и где ковалентная связь содержит дисульфидную связь, которая соединяет (i) остаток Cys в положении аминокислоты 12 полипептида β 2М и (ii) остаток Cys в положении аминокислоты 236 полипептида тяжелой цепи ГКГС класса I на основании нумерации, представленной в SEQ ID NO: 19.
35. Гомодимер, содержащий два гетеродимера по любому из пп.32-34, где два гетеродимера друг с другом связаны при помощи одной или нескольких дисульфидных связей, которые соединяют полипептид Ig Fc одного гетеродимера с полипептидом Ig Fc другого гетеродимера.
36. Фармацевтическая композиция, содержащая гетеродимер по любому из пп.32-35.
37. Применение фармацевтической композиции по п.36 для производства лекарственного средства для лечения рака у индивидуума.
38. Применение по п.37, где гомодимер вводят в количестве от примерно 1 мг/кг до примерно 5 мг/кг массы тела.
39. Применение по п.37, где гомодимер вводят в количестве от примерно 5 мг/кг до примерно 10 мг/кг массы тела.
40. Нуклеиновая кислота, содержащая
- первую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид по любому из пп.32-34; и
 - вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид по любому из пп.32-34.
41. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.40.
42. Экспрессирующая клетка-хозяин, которая генетически модифицирована вектором экспрессии по п.41, где клетка-хозяин находится *in vitro*.
43. Способ получения первого и второго полипептидов, закодированных нуклеиновой кислотой по п.40, где способ включает культивирование экспрессирующей клетки-хозяина по п.42 в культуральной среде в условиях, при которых указанная клетка синтезирует первый и второй полипептиды.
44. Композиция, содержащая первую и вторую нуклеиновые кислоты, где

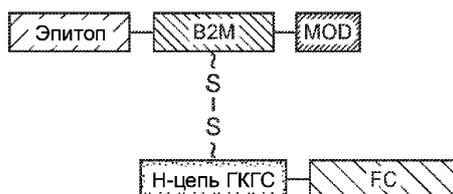
а) первая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид по любому из пп.32-34; и

б) вторая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид по любому из пп.32-34.

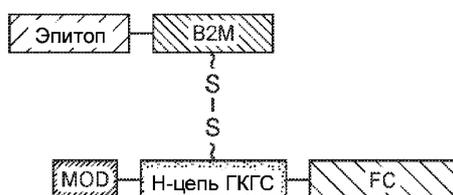
45. Композиция одного или нескольких векторов экспрессии, содержащая нуклеиновые кислоты по п.44.

46. Экспрессирующая клетка-хозяин, которая генетически модифицирована одним или несколькими векторами экспрессии по п.45, где клетка-хозяин находится *in vitro*.

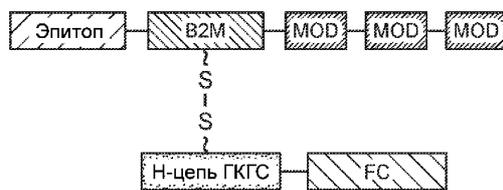
47. Способ получения первого и второго полипептидов, закодированных нуклеиновой кислотой по п.44, где способ включает культивирование экспрессирующей клетки хозяина по п.46 в культуральной среде в условиях, при которых указанная клетка синтезирует первый и второй полипептиды.



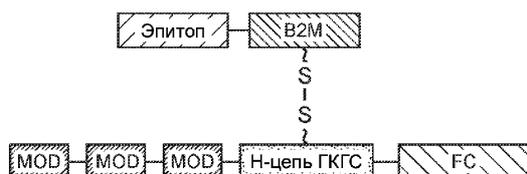
Фиг. 1А



Фиг. 1В



Фиг. 1С



Фиг. 1D

ИЛ2 – *Homo sapiens*

APTSSSTKKT QLQLEHLLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:1)

Фиг. 2А

ИЛ2 (F42X) (SEQ ID NO:38)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT

Фиг. 2В

ИЛ2 (D20X) (SEQ ID NO:39)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT

Фиг. 2С

ИЛ2 (E15X) (SEQ ID NO:40)

APTSSSTKKT QLQLXHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT

Фиг. 2D

ИЛ2 (H16X) (SEQ ID NO:41)

APTSSSTKKT QLQLEXLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT

Фиг. 2E

ИЛ2 (Y45X) (SEQ ID NO:42)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFXMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT

Фиг. 2F

ИЛ2 (Q126X) (SEQ ID NO:43)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCXSIIS TLT

Фиг. 2G

ИЛ2 (F42X; H16X) (SEQ ID NO:44)

APTSSSTKKT QLQLEXLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT

Фиг. 2H

ИЛ2 (F42X; D20X) (SEQ ID NO:45)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT

Фиг. 2I

ИЛ2 (F42X; D20X; E15X) (SEQ ID NO:46)

APTSSSTKKT QLQLXHLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT

Фиг. 2J

ИЛ2 (F42X; D20X; H16X) (SEQ ID NO:47)

APTSSSTKKT QLQLEXLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT

Фиг. 2K

ИЛ2 (F42X; D20X; Q126X) (SEQ ID NO:48)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCXSIIS TLT

Фиг. 2L

ИЛ2 (F42X; D20X; Y45X) (SEQ ID NO:49)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFXMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT

Фиг. 2M

ИЛ2 (F42X; D20X; Y45X; H16X) (SEQ ID NO:50)

APTSSSTKKT QLQLEXLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFXMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT

Фиг. 2N

ИЛ2 (F42X; D20X; Y45X; Q126X) (SEQ ID NO:51)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFXMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCXSIIS TLT

Фиг. 2O

ИЛ2 (F42X; D20X; Y45X; H16X; Q126X) (SEQ ID NO:52)

APTSSSTKKT QLQLEXLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFXMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCXSIIS TLT

Фиг. 2P

ИЛ2 – (F42X, H16X, Q126X) (SEQ ID NO: 53)

APTSSSTKKT QLQLEXLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML T~~X~~KFYMPKKA TELKHLQCLE
 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR
 WITFC~~X~~SIIS TLT

Фиг. 2Q

ИЛ2Р - альфа цепь (SEQ ID NO: 54)

Homo sapiens

1 MDSYLLMWGL LTFIMVPGCQ AELCDDDPPE IPHATFKAMA YKEGTMLNCE CKRGFRRIKS
 61 GSLYMLCTGN SSHSSWDNQC QCTSSATRNT TKQVTPQPEE QKERKTTEMQ SPMQFVDQAS
 121 LPHGCREPPP WENEATERIY HFVVGQMVYY QCVQGYRALH RGPAESVCKM THGKTRWTQP
 181 QLICTGEMET SQFPGEKPKQ ASPEGRPESE TSCLVTTTDF QIQTEMAATM ETSIFTTYEQ
 241 VAVAGCVFLL ISVLLLSGLT WQRRQRKSRR TI

Зрелая = аминокислоты 22-272

Фиг. 3А

ИЛ2Р - бета цепь (SEQ ID NO: 55)

Homo sapiens

1 MAAPALSWRL PLLILLPLA TSWASAAVNG TSQFTCFYNS RANISCVWSQ DGALQDTSCQ
 61 VHAWPDRRRW NQTCELLPVS QASWACNLIL GAPDSQKLT VDIVTLRVLC REGVRWRVMA
 121 IQDFKPFENL RLMAPISLQV VHVETHRCNI SWEISQASHY FERHLEFEAR TLSPGHTWEE
 181 APLLTLKQKQ EWICLETLP DTQYEFQVRV KPLQGEFTTW SPWSQPLAFR TKPAALGKDT
 241 IPWLGHLLVG LSGAFGFIL VYLLINCRNT GPWLKKVLKC NTPDPSKFFS QLSSEHGGDV
 301 QKWLSSPFPS SSFSPGGLAP EISPLEVLER DKVTQLLLQQ DKVPEPASLS SNHSLTSCFT
 361 NQGYFFFHLP DALEIEACQV YFTYDPYSEE DPDEGVAGAP TGSSPQLQP LSGEDDAYCT
 421 FPSRDDLLLF SPSLLGGPSF PSTAPGGSGA GEERMPPSLQ ERVPRDWDPO PLGPPTPGVP
 481 DLVDFQPPPE LVLREAGEEV PDAGPREGVS FPWSRPPGOG EFRALNARLP LNTDAYLSLQ
 541 ELQGGDPHTL V

Зрелая = аминокислоты 27-551

Фиг. 3B

ИЛ2Р - гамма цепь (SEQ ID NO: 56)

Homo sapiens

1 MLKPSLPFTS LLFLQLPLL VGLNNTILTP NGNEDTTADF FLTMTPTDSL SVSTLPLPEV
 61 QCFVENVEYM NCTWNSSSEP QPTNLTLYHW YKNSDNDKVQ KCSHYLFSEE ITSGCQLQKK
 121 EIHLYQTFVY QLQDPREPRR QATQMLKLQN LVIPWAPENL TLHKLSESQL ELNWNRRFLN
 181 HCLEHLVQYR TDWDHSWTEQ SVDYRHKFSL PSVDGQKRYT FRVRSRFPNPL CGSAQHSEW
 241 SHPIHWGSNT SKENPFLFAL EAVVISVGSML GLIISLLCVY FWLERTMPRI PTLKNLEDLV
 301 TEYHGNFSAW SGVSKGLAES LQPDYSERLC LVSEIPPKGG ALGEGPGASP CNQHSFYWAP
 361 PCYTLKPEET

Зрелая = аминокислоты 23-369

Фиг. 3C

GenBank 3S7G_A (SEQ ID NO:57)

Homo sapiens IgG1 Fc

227 aa

```

1 dkthtccppcp apelligpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed pevknwyvd
61 gvevhnaktk preeqynsty rvvsvltvlh qdwlngkeyk ckvsnkalpa piektiskak
121 gqprepqvvt lppsrdeitk ngvsltclvk gfypsdiave wesngqpenn ykttppvlds
181 dgsfflyskl tvdksrwqqg nvfscsvmhe alhnhytqks lslspgk

```

GenBank AAN76044 (SEQ ID NO:58)

Homo sapiens IgG2 Fc (аминокислоты 99-325)

227 aa

```

1 stkgpsvfppl apcsrsts es taalgclvkd yfpepvtvsw nsgaltsgvh tfpavlgssg
61 lyslssvvtv pssnfgtqty tcnvdhkpsn tkvdktverk ccvecppcpa ppvagpsvfl
121 fppkpkdtlm isrtpevtcv vvdvshedpe vqfnwyvdgv evhnaktkpr eegfnstfrv
181 vsvltvvhqd wlngkeykck vsnkglpapi ektisktkgq prepqvvtlp psreemtknq
241 vsltclvkgf ypsdiavewe sngqpennyk ttpmldsag sfflyskltv dksrwqqgnv
301 fscsvmheal hnhytqksls lspgk

```

GenBank AAW65947 (SEQ ID NO:59)

Homo sapiens IgG3 Fc (аминокислоты 19-246)

238 aa

```

1 hkpsntkvdk rvelktpigd tthtccppcpa peliggpsvf lfppkpkdtl misrtpevtc
61 vvvdvshedp evkfnwyvdg vevhnaktkp reeqynstyr vsvltvlhqd dwlngkeykc
121 kvsnkalpap iektiskakg qprepqvvtl ppsrdeltkn qvsltclvkg fyypsdiavew
181 esngqpenny kttppvlds gsflysklt vdksrwqqgn vscsvmhea lhnhytqksl
241 slspgk

```

Фиг. 4А

GenBank AAA52770 (SEQ ID NO:60)

Homo sapiens IgD Fc (аминокислоты 162-383)

222 aa

```

1 ptkapdvfpi isgcrhpkdn spvvlacilit gyhptsvtvt wymgtqsgpq rtfpeiqrdd
61 syymtssqls tplqqwrqge ykcvvqhtas kskkeifrwep espkaqassv ptaqpqaegs
121 lakattapat trntgrggee kkekekeeeq eeretktpec pshtqplgvy lltpavqdlw
181 lrdkafftcf vvgdldkdah ltwevagkvp tggveeglle rhsngsqsqh srltlprslw
241 nagtsvtctt nhpslppqrl malrepaaqa pvklslnlla ssdppeaasw llcevsgfsp
301 pnillmwled qrevntsgfa parppqprs ttfwawsplr vpappspqpa tytccvvhed
361 srltlnasrs levsvyvdhg pmk

```

GenBank 0308221A (SEQ ID NO:61)

Homo sapiens IgM Fc

276 aa

```

1 vtstltikzs dlwgesmftc rvdhrglftq qnassmcvdp qdtairvfai ppsfasiflt
61 kstklvtclvt dltybsvti swtreengav kthtnisesh pnatfsavge asicedbdws
121 gerftctvth tdlpsplkqt isrpkgvalh rpbvylppa rzzlnlresa titclvtgfs
181 padvfvewmq rgeplspqky vtsapmpepq apgryfahsi ltvseeewnt ggtytcvvh
241 ealpnrvter tvdkstgkpt lynsvlmsd tagtcy

```

Фиг. 4В

GenBank P01876 (SEQ ID NO:62)
Homo sapiens IgA Fc (аминокислоты 120-353)
 234 aa

```

1 asptspkvfp lslcstqpdg nvviaclvqg ffpqeplsvt wsesgqvta rnfppsqdas
61 gdlyttssql tlpatgclag ksvtchvkhy tnpdqdvtp cpvpstpptp spstpptsp
121 scchprlslh rpaedlllg seanltctlt glrdasgvtf twtpssgksa vggpperdlc
181 gcysvssvlp gcaepwnhkg tftctaaype sktpltatls ksgntfrpev hllpppseel
241 alnelvtltc largfspkdv lvrwlqgsqe lprekyltwa srqepsqgtt tfavtsilrv
301 aaedwkkgdg fscnvgheal plaftqktid rlagkpthvn vsvmaevdg tcy

```

GenBank 1F6A_B (SEQ ID NO:63)
Homo sapiens IgE Fc (аминокислоты 6-222)
 212 aa

```

1 adpcdsnprg vsaylsrsp fdlfirkspt itclvvdlap skgtvnlts rasgkpvnhs
61 trkeekqrng tltvtstlpv gtrdwieget yqcrvthphl pralmrsttk tsgpraapev
121 yafatpewpg srdkrtlacl iqnfmepedis vqwhnevql pdarhsttqp rktkqsgffv
181 fsrlevtrae weqkdeficr avheaaspsq tvqravsvnp gk

```

GenBank P01861 (SEQ ID NO:64)
Homo sapiens IgG4 Fc (аминокислоты 100-327)
 228 aa

```

1 astkqpsvfp lapcsrstse staaalgclvk dyfpepvtvs wmsgaltsgv htfpavlqss
61 gylslssvvt vpssslgktk ytcnvdhkps ntkvdkrves kygppcpcsp apeflggpsv
121 flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvsqed pevqfnwyvd gvevhnaktk preeqfnsty
181 rvsvvlvvlh qdwlngkeyk ckvsnkglps siektiskak gqprepqvyt lppsqeemtk
241 nqvsltclvk gfypsdiave wesngqpenn ykttppvlds dgsfflysrll tvdksrwqeg
301 nvfscsvmhe alnhhytqks lsllslgk

```

Фиг. 4С

Homo sapiens (SEQ ID NO:65)
 GenBank NP_001229687
 HLA-A
 Аминокислоты 25-365

```

1 mavmaprtll lllsqalalt gtwagshsmr yfftsvsrpg rgeprfiavg yvddtqfvr
61 dsdaasqkme prapwieqeg peywdqetrn mkahsqtdra nlgtrlrgyyn qsedgshitiq
121 imygcdivgpd grflrgyrqd aydgkdyial nedlrswtaa dmaaqitkrk weavhaaeqr
181 rvylegrcvd glrrylengk etlqrdppk thmthhpisd heatlrcwal gfyvaeitlt
241 wqrdgedqtq dtelvetrpa gdgtfkwaa vvpvsgeeqr ytchvqhegl pkpltlrwe
301 ssqptipivg iiaqlvllga vitgavvaav mwrkssdrk ggsytqaass dsaggsdvs
361 tackv

```

Фиг. 5А

Homo sapiens (SEQ ID NO:66)
 GenBank NP_005505
 HLA-B
 Аминокислоты 25-362

```

1 mlvmaprtvl lllsaalalt etwagshsmr yfytsvsrpg rgeprfivsg yvddtqfvr
61 dsdaaspree prapwieqeg peywdrntqi ykaqaqt dre slrnlrgyyn qseagshltiq
121 smygcdivgpd grllrgyqds aydgkdyial nedlrswtaa dtaaqitqrk leaaraaeqr
181 raylegcve wlrrylengk dkleradppk thvthhpisd heatlrcwal gfyvaeitlt
241 wqrdgedqtq dtelvetrpa gdgtfkwaa vvpvsgeeqr ytchvqhegl pkpltlrwe
301 ssqstvipg ivaglavlav vvigavvaav mcrkssggk ggsysqaacs dsaggsdvs
361 ta

```

Фиг. 5В

Homo sapiens (SEQ ID NO:67)
 GenBank NP_001229971
 HLA-C
 Аминокислоты 25-366

```

1 mrvmaprall lllsgglalt etwacshsmr yfdtavsrpg rgeprfivsg yvddtqfvr
61 dsdaasprge prapvveqeg peywdretqn ykrqaqadv slrnlrgyyn qsedgshltiq
121 rmygcdlqpd grllrgyqds aydgkdyial nedlrswtaa dtaaqitqrk leaaraaeql
181 raylegtve wlrrylengk etlqraepk thvthhplsd heatlrcwal gfyvaeitlt
241 wqrdgedqtq dtelvetrpa gdgtfkwaa vvpvsgeeqr ytchmqhegl qepltlswep
301 ssqptiping ivaglavlvv lavlgavvta mcrkssggk kggscsqaac snsaggsdes
361 litcka

```

Фиг. 5С

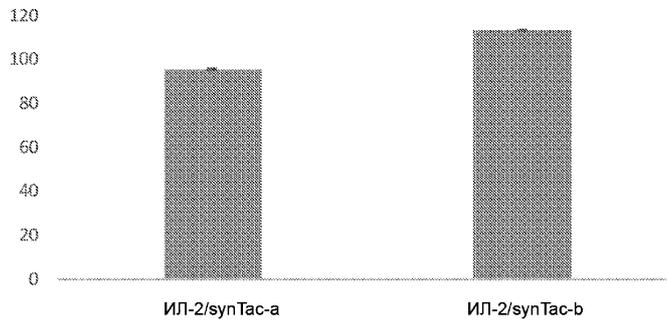
```

NF_004039.1      MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHFAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLL 60
NF_001009066.1  MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHFAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLL 60
NF_001040602.1  MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPPENGKPNFLNCYVSGFHPSDIEVDLL 60
NF_776318.1     MARFVALVLLGLLSLGLDAIQRPPIQVYSRHPPEDGKPNYLNCYVYGFHPEQIEIDL 60
NF_033865.2     MARSVTLVFLVLSLTGLYAIQKTPQIQVYSRHPPENGKPNILNCYVTQFHPPHIEIQML 60
                  *:* *:*.* *:*:* *:*:* *:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:* *:*:* *:*:*:*:*
                  *:*:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:*

NF_004039.1      KNGERIEKVEHSDLSFSKDWSTYLLYYTEFTPEKDEYACRVNHVTLSPQKIVKWRDM 119
NF_001009066.1  KNGERIEKVEHSDLSFSKDWSTYLLYYTEFTPEKDEYACRVNHVTLSPQKIVKWRDM 119
NF_001040602.1  KNCEKMKVEHSDLSFSKDWSTYLLYYTEFTPEKDEYACRVNHVTLSPQKIVKWRDM 119
NF_776318.1     KNCEKI-KSEQSDLSFSKDWSTYLLSMAEFTPNKDKQYSCRVKHVTLSPQKIVKWRDL 118
NF_033865.2     KNCKKIPEKVEHSDLSFSKDWSTYLLAHTFTPTETDTYACRVKHSMAEPEKIVYWRDM 119
                  ***::: * * **:*:*:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:*
    
```

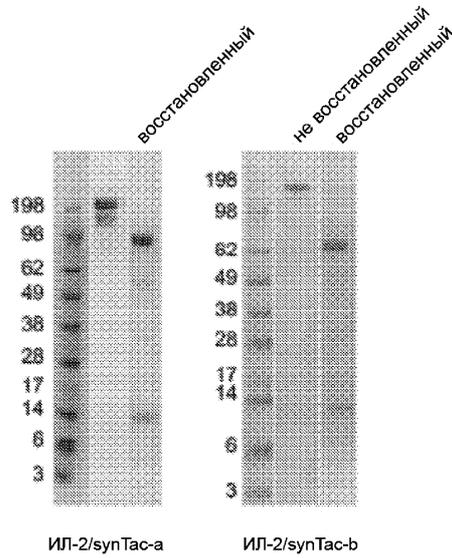
Фиг. 6

Уровни экспрессии ИЛ-2/synTac через 6-7 дней после трансфекции



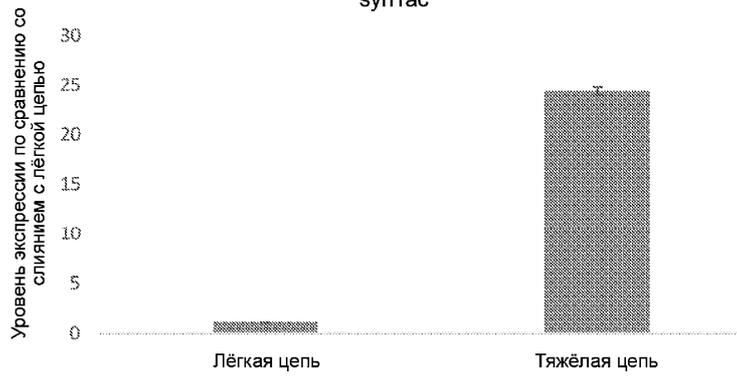
Фиг. 7А

Очищенный продукт



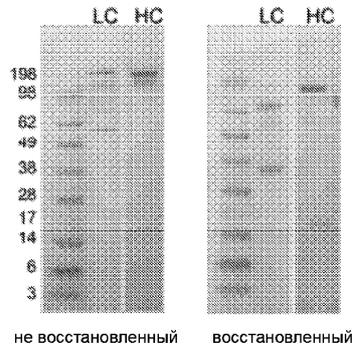
Фиг. 7В

Относительный уровень экспрессии слияний с тяжелой цепью по сравнению со слияниями с легкой цепью ИЛ-2 и supTac



Фиг. 8А

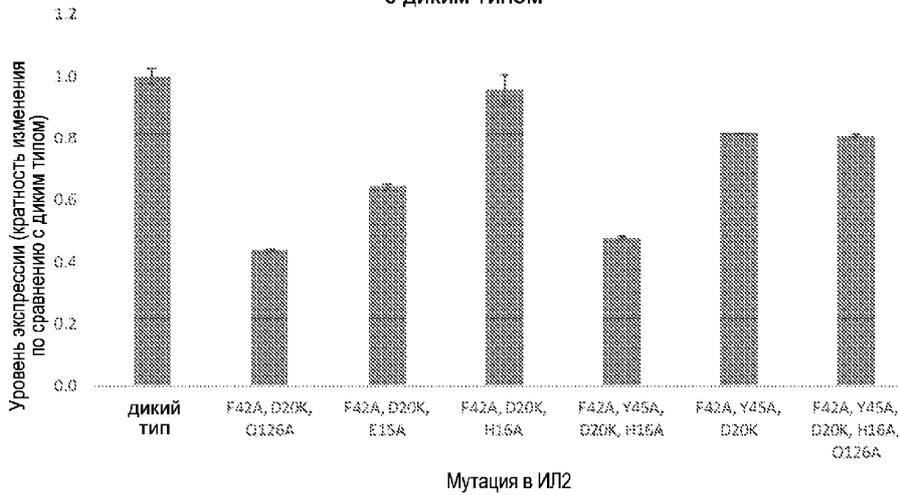
Улучшенная стабильность со слиянием тяжелой цепи



Окрашенные Кумасси аналитические гели

Фиг. 8В

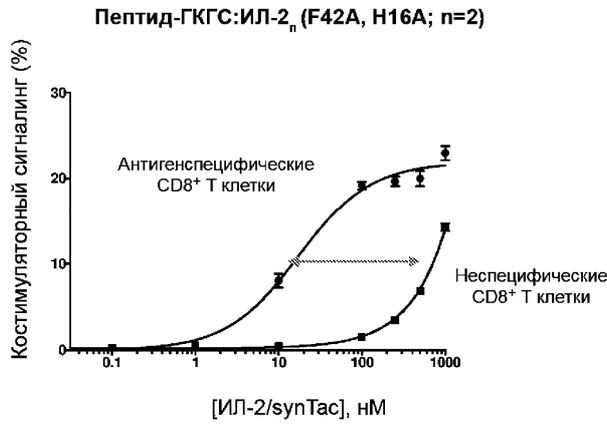
Уровень экспрессии мутантных ИЛ2 supTac по сравнению с диким типом



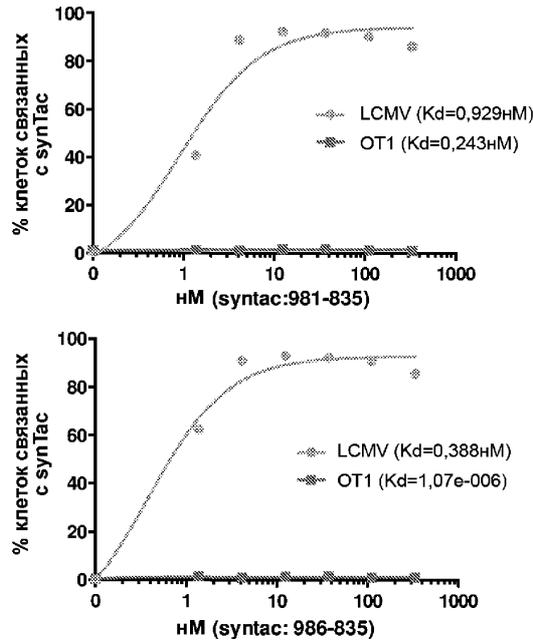
Фиг. 9



Фиг. 10

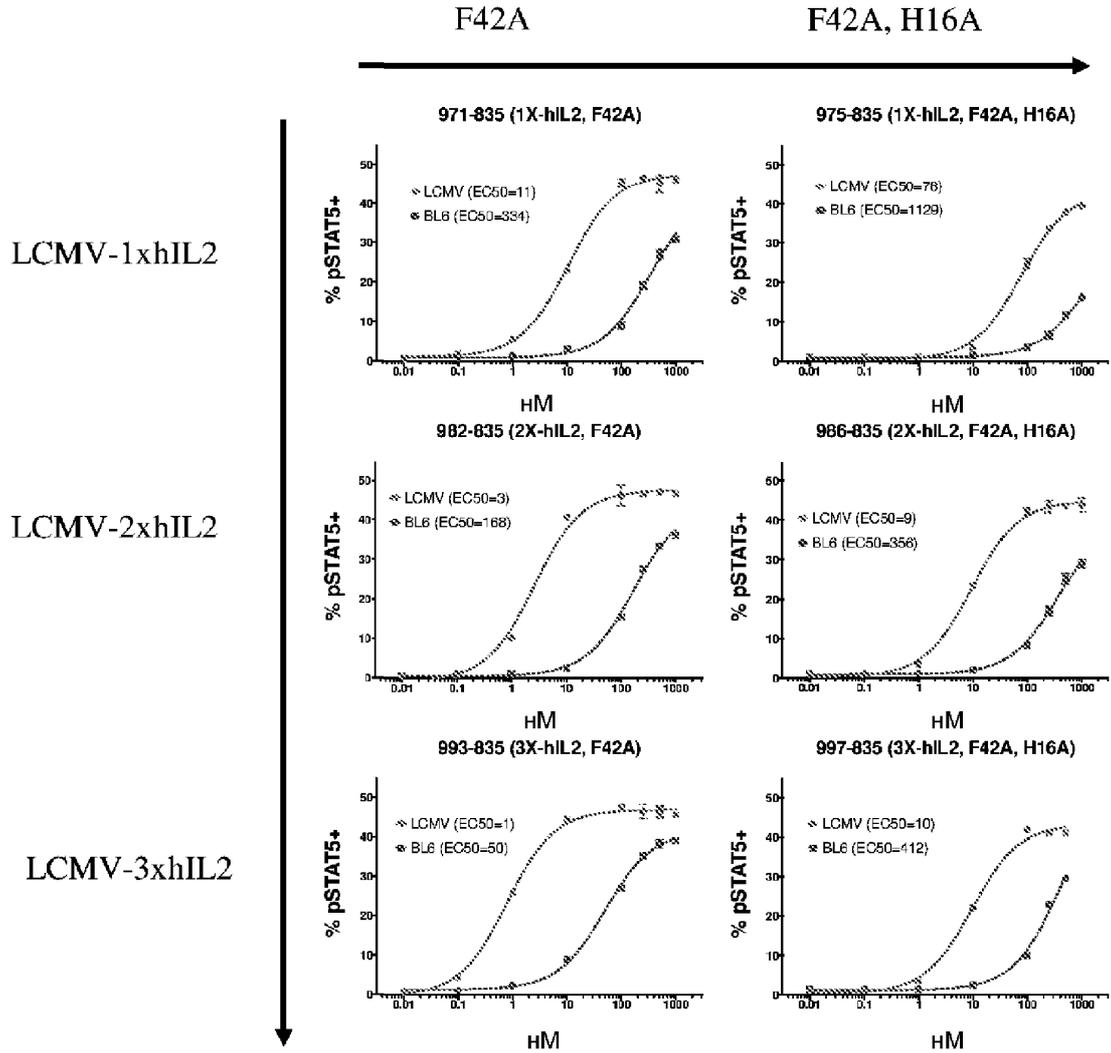


Фиг. 11



Фиг. 12

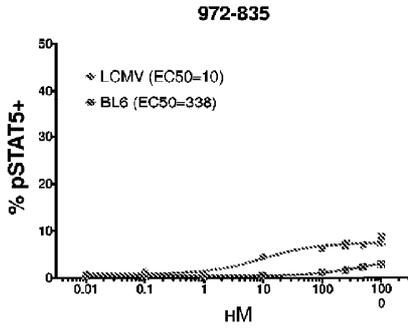
Количество повторов ИЛ-2 относительно мутаций



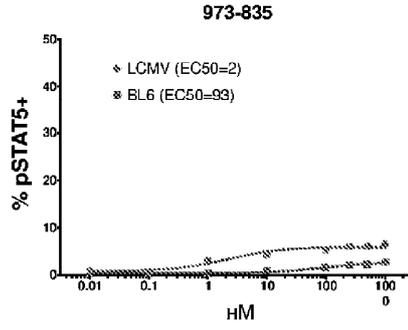
Фиг. 13

Одна копия ИЛ-2

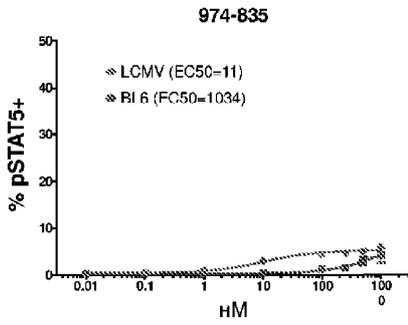
Мутация: F42A, D20K



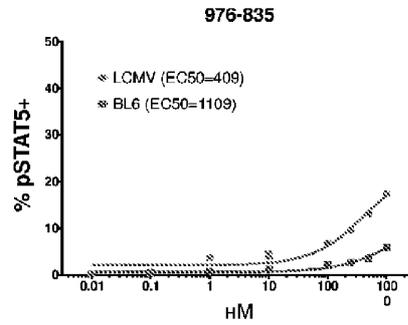
Мутация: F42A, D20K, Q126A



Мутация: F42A, D20K, E15A



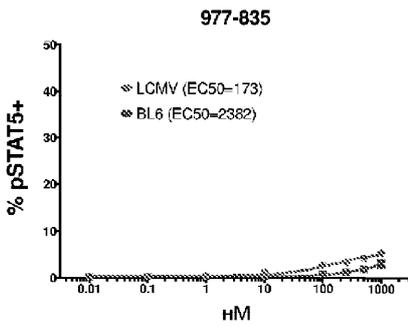
Мутация: F42A, D20K, H16A



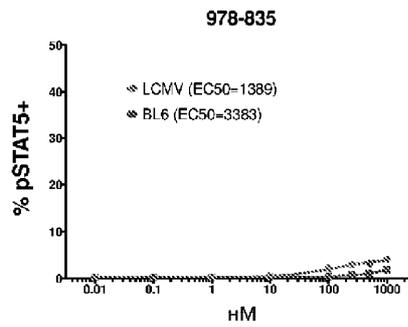
Фиг. 14А

Одна копия ИЛ-2

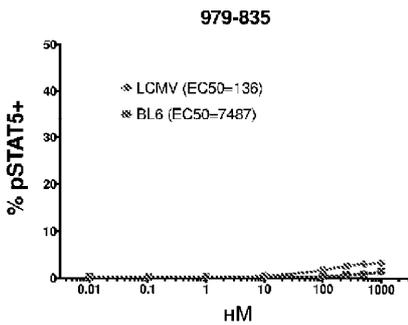
Мутация: F42A, Y45A, D20K, H16A



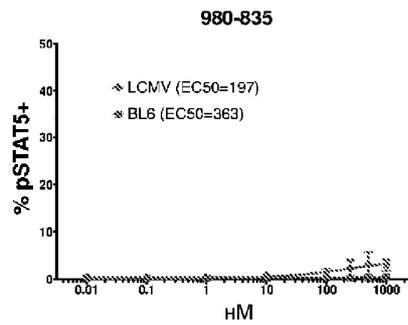
Мутация: F42A, Y45A, D20K



Мутация: F42A, Y45A, D20K, H16A, Q126A



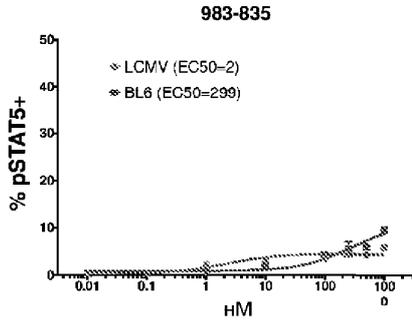
Мутация: F42A, Y45A, D20K, Q126A



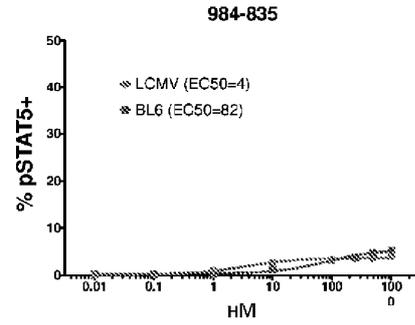
Фиг. 14В

Две копии ИЛ-2

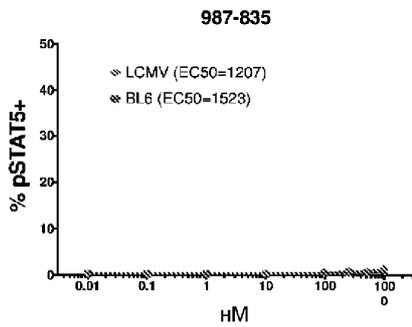
Мутация: F42A, D20K



Мутация: F42A, D20K, Q126A



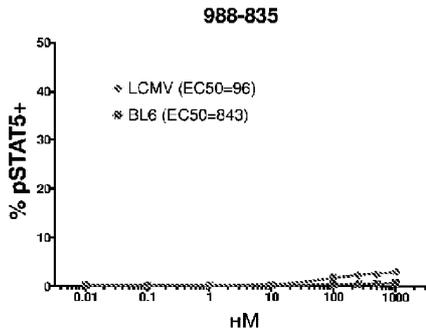
Мутация: F42A, D20K, H16A



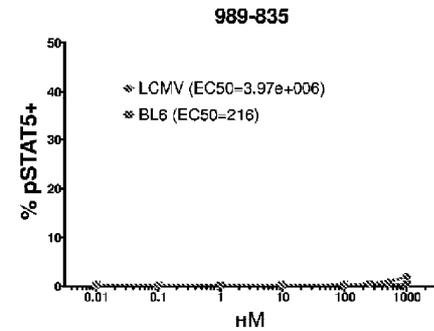
Фиг. 14С

Две копии ИЛ-2

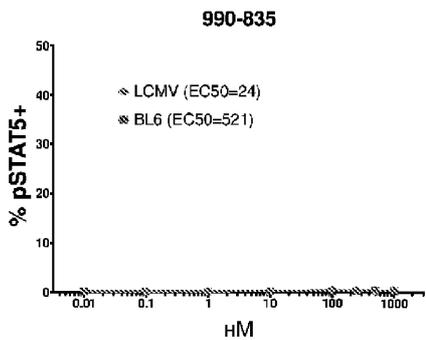
Мутация: F42A, Y45A, D20K, H16A



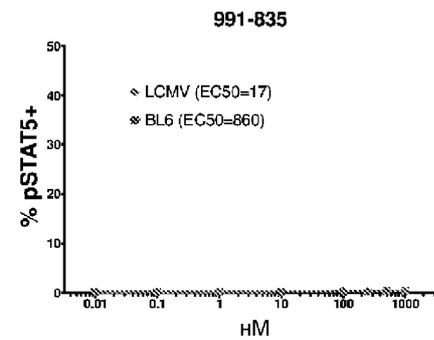
Мутация: F42A, Y45A, D20K



Мутация: F42A, Y45A, D20K, H16A, Q126A



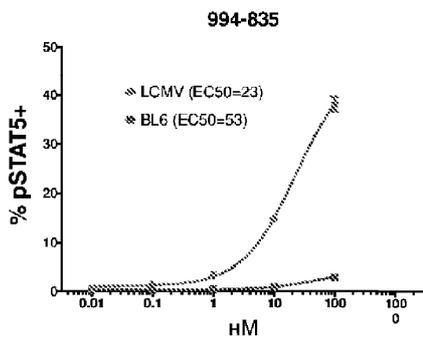
Мутация: F42A, Y45A, D20K, Q126A



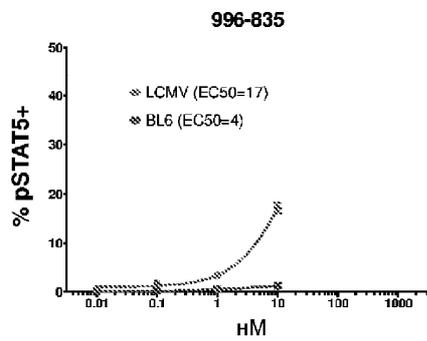
Фиг. 14D

Три копии ИЛ-2

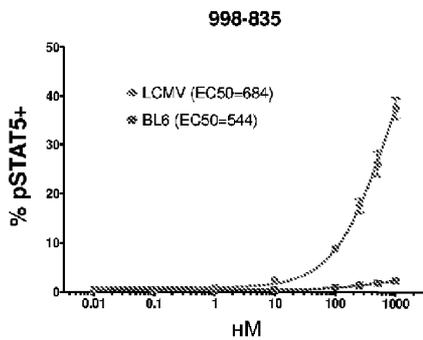
Мутация: F42A, D20K



Мутация: F42A, D20K, E15A



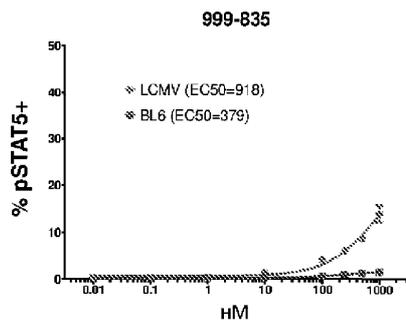
Мутация: F42A, D20K, H16A



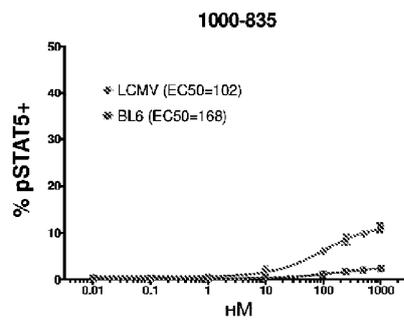
Фиг. 14Е

Три копии ИЛ-2

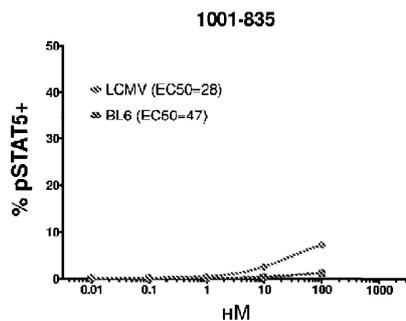
Мутация: F42A, Y45A, D20K, H16A



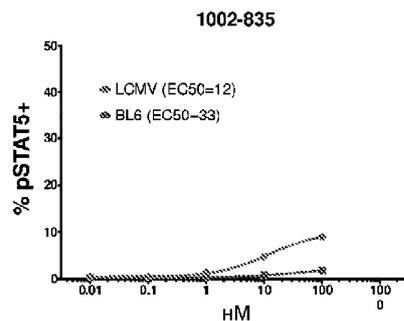
Мутация: F42A, Y45A, D20K



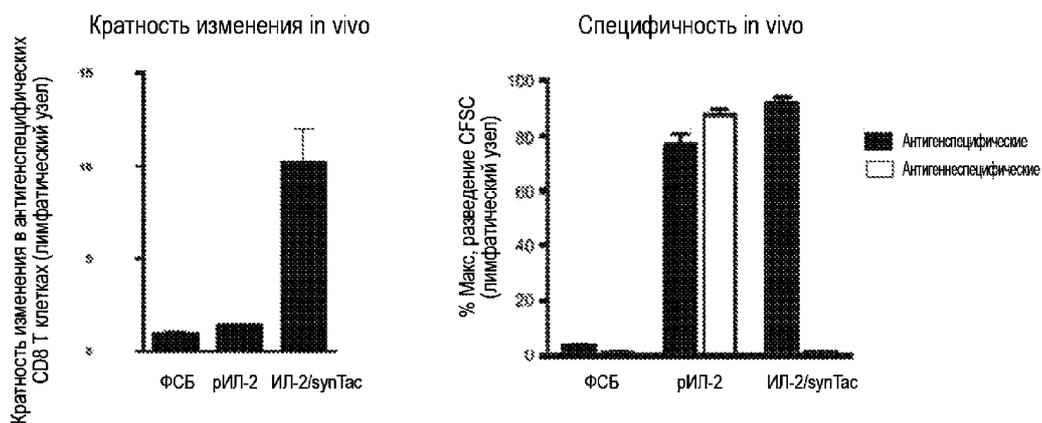
Мутация: F42A, Y45A, D20K, H16A, Q126A



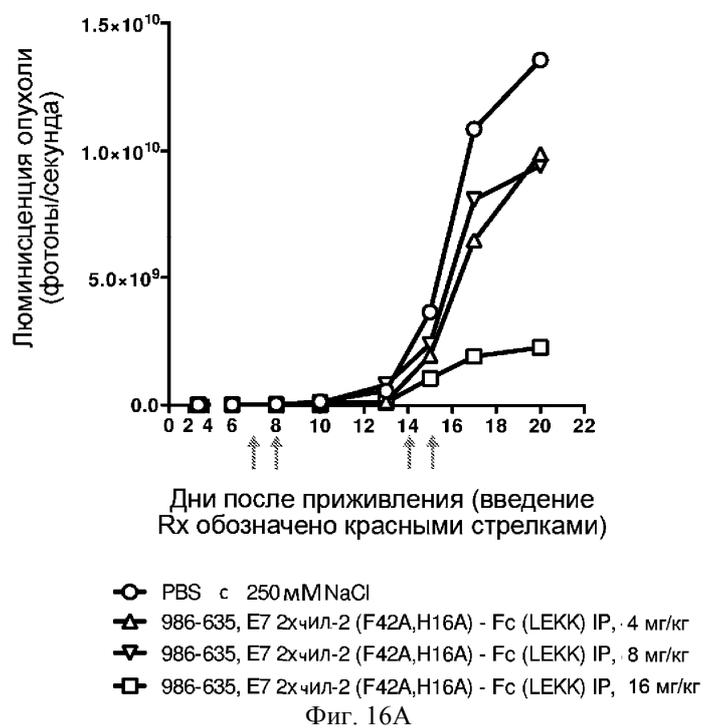
Мутация: F42A, Y45A, D20K, Q126A



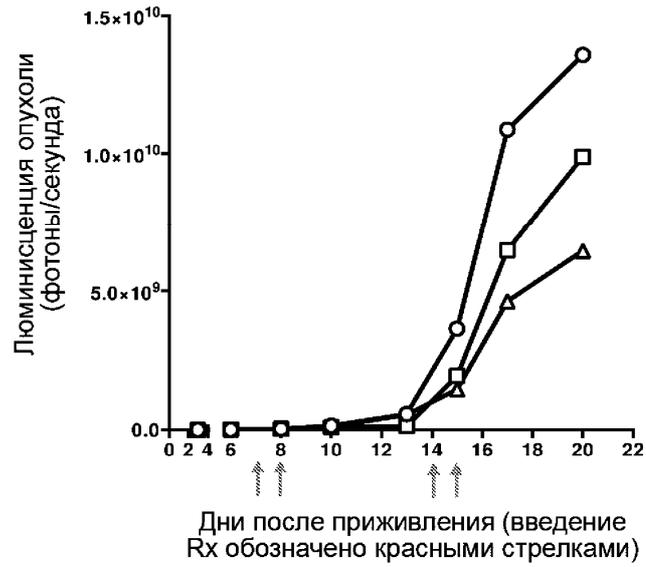
Фиг. 14F



Фиг. 15



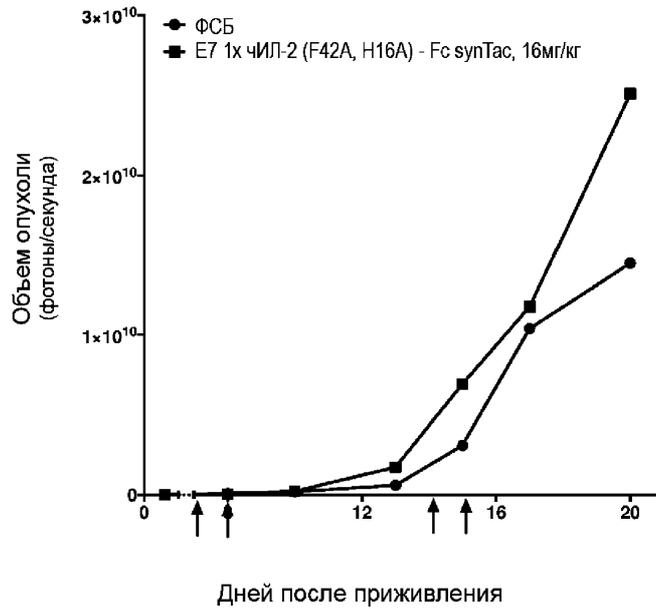
Фиг. 16А



- PBS с 250мМ. NaCl
- 986-635, E7 2xчил-2 (F42A, H16A) - Fc (LEKK) IP, 4 мг/кг
- △ 986-635, E7 2xчил-2 (F42A, H16A) - Fc (LEKK) SubQ, 4 мг/кг

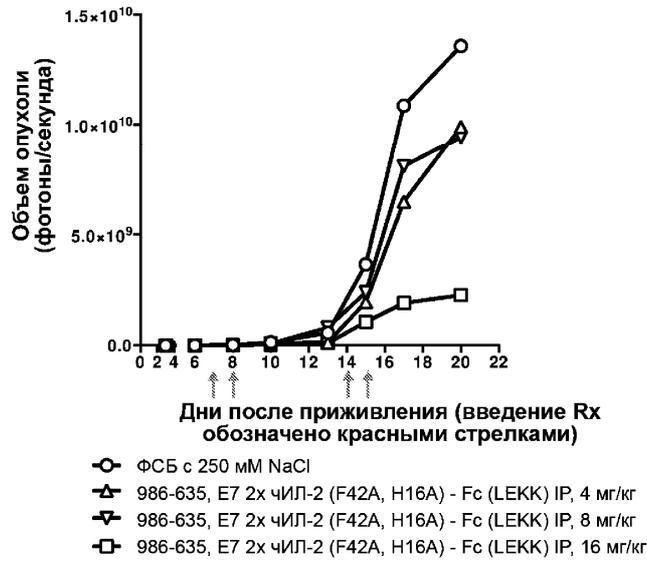
Фиг. 16В

1 x ИЛ-2 (F42A, H16A)-Fc synTac



Фиг. 17А

2 x ИЛ-2 (F42A, H16A)-Fc synTac

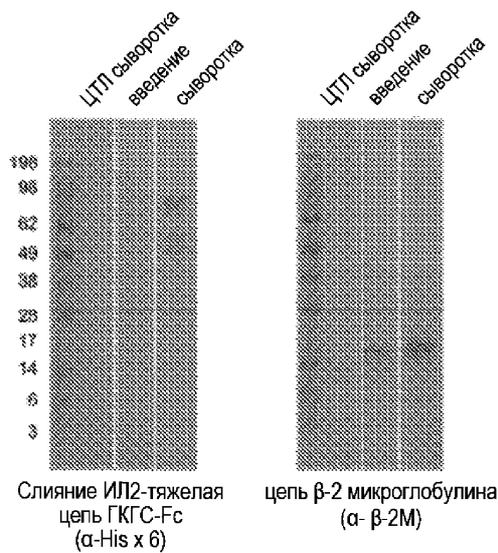


Фиг. 17В

976-835 LSMV-ЧИЛ-2 (F42A, D20K, H16A) (10мг/кг, ИП)

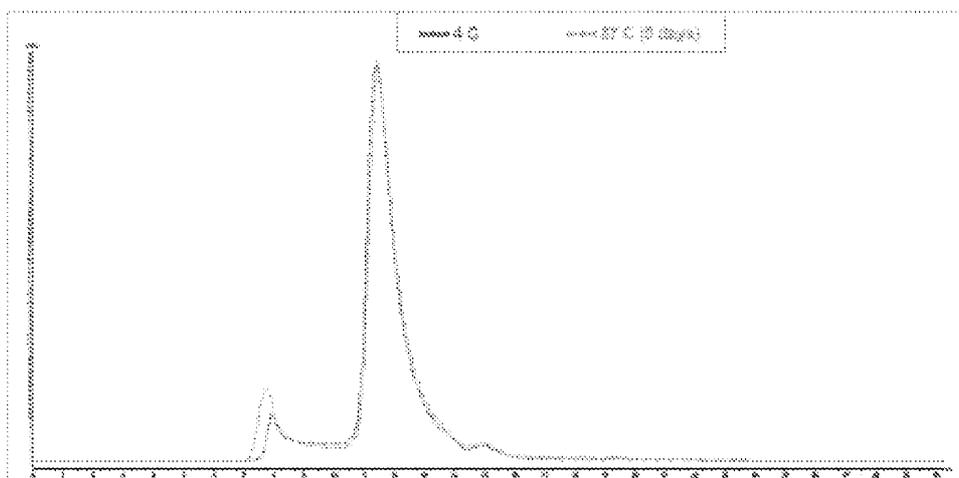


Фиг. 18



Вестерн блот анализ

Фиг. 19



Фиг. 20

CUE101-N297A с лидерным пептидом (SEQ ID NO:68)

MYRMQLLSSCIALSLALVTNSAPTSSSTTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML
TAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE
TFMCEYADETATIVEFFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSSAPTSSST
TKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFFLNRWITFCQS
IIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPREFIAVGYVDDTQFV
RFDSDAASORMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLCTLRGAYNOSEAGSHT
VORMYCCDVGSDWRFLRGYHOYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAE
QLRAYLEGTQVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT
LTWORDGEDOTDELVETRPCGDGTFOKWAAVVVPSGOQRYTCHVOHEGLPKPLTLRW
EAAAGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNYTQKSLSLSPGK

Лидерная последовательность ИЛ2 человека - курсив

ИЛ-2(Н16А/Ф42А) - жирным шрифтом (с Н16 иФ42 подчеркнутыми)

(G4S)4 линкеры - одинарное подчеркивание

ГКГС Н-цепь Y84A; A236C - двойное подчеркивание (с Y84A и A236C жирным шрифтом)

AAAGG линкер - одинарное подчеркивание

Fc IgG1 человека; N297A - (жирный шрифт и подчеркивание, N297A не жирным шрифтом)

Фиг. 21

CUE101-N297A без лидерного пептида (SEQ ID NO:69)

APTSSSTTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML
TAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE
TFMCEYADETATIVEFFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSSAPTSSST
TKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFFLNRWITFCQS
IIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPREFIAVGYVDDTQFV
RFDSDAASORMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLCTLRGAYNOSEAGSHT
VORMYCCDVGSDWRFLRGYHOYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAE
QLRAYLEGTQVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT
LTWORDGEDOTDELVETRPCGDGTFOKWAAVVVPSGOQRYTCHVOHEGLPKPLTLRW
EAAAGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNYTQKSLSLSPGK

ИЛ-2(Н16А/Ф42А) - жирным шрифтом (с Н16 иФ42 подчеркнутыми)

(G4S)4 линкеры - одинарное подчеркивание

ГКГС Н-цепь Y84A; A236C - двойное подчеркивание (с Y84A и A236C жирным шрифтом)

AAAGG линкер - одинарное подчеркивание

Fc IgG1 человека; N297A - (жирный шрифт и подчеркивание, N297A не жирным шрифтом)

Фиг. 22

CUE101-N297A (SEQ ID NO:70)

1360:

ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCAAAACAGTGCACCTACTTC
 AAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGGCACTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATG
 GAATTAATAATTACAAGAATCCCAAACCTACCAGGATGCTCACAAGGTTTACATGCCAAAGAAG
 GCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTT
 AGCTCAAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGA
 ACTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTT
 TGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTG
 GAGGTTCTGGTGGTGGGGGATCTGGAGGCGGAGGATCTGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACA
 CAGCTACAACCTGGAGCACTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAAT
 CCCAACTACCAGGATGCTCACAAGGTTTACATGCCAAAGAAGGCCACAGAATGAAACATCTT
 CAGTGTCTAGAAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTCA
 CTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACCTAAAGGGATCTGAAACAA
 CATTTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTT
 GTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTGGGGGA
 TCTGGAGGCGGAGGATCTGGCTCTCACTCCATGAGGTATTTCTTCACATCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCG
 GGGAGCCCGCTTCATCGCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCTGTCGGTTCCGACAGCGACGCCG
 CGAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGGCGCGTGGATAGAGCAGGAGGGTCCGGAGTATTGGGACGGGGGA
 GACACGGAAAGTGAAGGCCCACTCACAGACTCACCGAGTGGACCTGGGGACCTGCGCGGCCCTACA
 ACCAGAGCGAGGCCGGTTCTCACACCGTCCAGAGGATGTATGGCTGCGACGTGGGGTCCGACTGGCGC
 TTCTCCGCGGGTACCACAGTACGCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTGCGCT
 CTTGGACCCGGCGGACATGGCAGCTCAGACCACCAAGCACAAGTGGGAGGCGGCCATGTGGCGGAG
 CAGTTGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGAGATACCTGGAGAACGGGAAGGA
 GACGCTGCAGCGCACGGACGCCCAAAACGCATATGACTCACCGCTGTCTCTGACCATGAAGCCACC
 CTGAGGTGCTGGGCCCTGAGCTTCTACCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGA
 CCAGACCCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCCTTGGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCGG
 CTGTGGTGGTGCCTTCTGGACAGGAGCAGAGATACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTTTGCCCAAGC
 CCTCACCTGAGATGGGAGGCAGCTGCGGGTGGCGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCCCAGC
 CCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCACTCTCTCTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCC
 GGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
 GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAAGCAC
 GTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
 AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
 GAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTG
 CCTGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC
 AACTACAAGACACCGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG
 ACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCAC
 TACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATAGTGA

Фиг. 23А

Лидерная последовательность ИЛ2 человека - курсив

ИЛ2 человека; Н16А=GCA; F42А= GCA; жирный шрифт (GCA подчеркнуто)

(G4S)4 линкеры - одинарное подчеркивание

A0201 человека; Y84А=CCC; A236С=TEC

AAAGG линкер - одинарное подчеркивание

Fc IgG1 человека; N297А=GCA; AGG в **AGA** (все равно R) и AGC в **TCG** (все равно S)-
(жирный шрифт и подчеркивание, GCA курсивом)

Стоп-кодоны (TAGTGA)

Фиг. 23В

CUE101-LALA с лидерным пептидом (SEQ ID NO: 71)

MYRMQLLSCTALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRML
TAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE
TFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGGSAPTSSST
KKTQLQLEALLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLE
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS
IISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGSHSMRYFFT SVSRPGRGEPREIAVGYVDDTQFV
RFDSDAASQRMPEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKYKAHSQTHRVLDLGLRGAYNQSEAGSHT
VORMYGC DVGSDWRFLRGYHOYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAE
QLRAYLEGTCTVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT
LTWQRDGEDQTDTELVEVTRPCGDGTFOKWAAVVVP SGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRW
EAAAGGDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVPFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Лидерный пептид - курсив

ИЛ-2(Н16А/Ф42А) - жирным шрифтом (Н16 иФ42 подчеркнуты)

(G4S)4 линкеры - одинарное подчеркивание

ГКГС Н-цепь Y84A; A236C - двойное подчеркивание (Y84A и A236C жирным шрифтом)

AAAGG линкер - одинарное подчеркивание

Fc IgG1 человека; L234A, L235A - (жирный шрифт и подчеркивание, L234A и L235A не жирным шрифтом)

Фиг. 24

CUE101-LALA без лидерного пептида (SEQ ID NO: 72)

APTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRML
TAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE
TFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGGSAPTSSST
KKTQLQLEALLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLE
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS
IISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGSHSMRYFFT SVSRPGRGEPREIAVGYVDDTQFV
RFDSDAASQRMPEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKYKAHSQTHRVLDLGLRGAYNQSEAGSHT
VORMYGC DVGSDWRFLRGYHOYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAE
QLRAYLEGTCTVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT
LTWQRDGEDQTDTELVEVTRPCGDGTFOKWAAVVVP SGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRW
EAAAGGDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVPFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ИЛ-2(Н16А/Ф42А) - жирным шрифтом (Н16 иФ42 подчеркнуты)

(G4S)4 линкеры - одинарное подчеркивание

ГКГС Н-цепь Y84A; A236C - двойное подчеркивание (Y84A и A236C жирным шрифтом)

AAAGG линкер - одинарное подчеркивание

Fc IgG1 человека; L234A, L235A - (жирный шрифт и подчеркивание, L234A и L235A не жирным шрифтом)

Фиг. 25

(SEQ ID NO:74)

CUE101-TM с лидерным пептидом

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML
TAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE
TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSST
KKTQLQLEALLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS
IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFV
RFDSDAASORMEPRAPWIEOEGPEYWDGETRKVKAHSOTHRVDLGTLRGAYNOSEAGSHT
VORMYGCDVGSDWRFLRGYHOYADGKDYIALKEDLRSWTAADMAAOTTKHKWEAAHVAE
QLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLORTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT
LTWORDGEDQTODTELVETRPCGDGTFOKWAAVVVPSGOEQRYTCHVOHEGLPKPLTLRW
EAAAGGDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK
TISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Лидерный пептид - курсив**ИЛ-2(Н16А/Ф42А) - жирным шрифтом (Н16 иФ42 подчеркнуты)****(G4S)4 линкеры - одинарное подчеркивание****ГКГС Н-цепь Y84A; A236C - двойное подчеркивание (Y84A и A236C жирным шрифтом)****AAAGG линкер - одинарное подчеркивание**

Fc IgG1 человека; L234F, L235E; P331S - (жирный шрифт и подчеркивание, L234F, L235E;

P331S не жирным шрифтом)

Фиг. 27

CUE101-TM без лидерного пептида (SEQ ID NO:75)

APTSSSTKKTQLQLEALLDLQMILNGINNYKNPKLTRML
TAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE
TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSST
KKTQLQLEALLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS
IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFV
RFDSDAASORMEPRAPWIEOEGPEYWDGETRKVKAHSOTHRVDLGTLRGAYNOSEAGSHT
VORMYGCDVGSDWRFLRGYHOYADGKDYIALKEDLRSWTAADMAAOTTKHKWEAAHVAE
QLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLORTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT
LTWORDGEDQTODTELVETRPCGDGTFOKWAAVVVPSGOEQRYTCHVOHEGLPKPLTLRW
EAAAGGDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK
TISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ИЛ-2(Н16А/Ф42А) - жирным шрифтом (Н16 иФ42 подчеркнуты)**(G4S)4 линкеры - одинарное подчеркивание****ГКГС Н-цепь Y48A; A236C - двойное подчеркивание (Y48A и A236C жирным шрифтом)****AAAGG линкер - одинарное подчеркивание**

Fc IgG1 человека; L234F, L235E; P331S - (жирный шрифт и подчеркивание, L234F,

L235E; P331S не жирным шрифтом)

Фиг. 28

(SEQ ID NO:76)

CUE101-TM: нуклеотидная последовательность, кодирующая CUE101-TM с лидерной последовательностью
 ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCCTTGTACAAACAGTGCACCTACTTC
 AAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGGCACTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATG
 GAATTAATAATTACAAGAATCCAAACTCACCAGGATGCTCACAAGGTTTACATGCCCAAGAAG
 GCCACAGAAGTGAACATCTTCAAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGTAAATTT
 AGCTCAAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGA
 ACTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCT
 TGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAAACCTGACTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTG
 GAGGTTCTGGTGGTGGGGGATCTGGAGGCGGAGGATCTGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACA
 CAGCTACAACCTGGAGGCACTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAAT
 CCCAAACTCACCAGGATGCTCACAAGGTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAAGTGAACATCTT
 CAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTCA
 CTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAAGTAAAGGGATCTGAAACAA
 CATTCAATGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTT
 GTCAAAGCATCATCTCAAACCTGACTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTGGGGGA
 TCTGGAGGCGGAGGATCTGGCTCTCACTCCATGAGGTATTTCTCACATCCGTGTCCCGGCCCGGCGCG
 GGGAGCCCGCTTCATCGAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCTGCGGTTTCGACAGCGACGCGG
 CGAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGGCGCGTGGATAGAGCAGGAGGGTCCGGAGTATTGGGACGGGGGA
 GACACGGAAAGTGAAGGCCACTCACAGACTCACCGAGTG⁸⁴CTGGGGACCTGCGCGGCGCTACA
 ACCAGAGCGAGGCGGTTCTCACACCGTCCAGAGGATGTATGGCTGCGACGTGGGGTCCGACTGGCGC
 TTCTCCGCGGTACCACAGTACGCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTGCGCT
 CTGGACCGCGGCGGACATGGCAGCTCAGACCACCAAGCACAAAGTGGGAGGCGGCCATGTGGCGGAG
 CAGTTGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGACGATACCTGGAGAACGGGAAGGA
 GACGCTGCAGCGCACGGACGCCCCAAACGCATATGACTCACACGCTGTCTCTGACCATGAAGCCACC
 CTGAGGTGCTGGGCCCTGAGCTTCTACCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGA
 CCAGACCCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCCCTGCGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGGCG
 CTGTGGTGGTGCCTTCTGGACAGGAGCAGAGATACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTTTGGCCAAAG
 CCCTCACCTGAGATGGGAGGCGAGCTGCGGGTGGCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTCCCGAGCA
 CCTGAA⁷⁷GGGGGACCGTCACTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTGATCTCCC
 GGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTG
 GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAGCAC
 GTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
 AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
 GAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCTGACCTG
 CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC
 AACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG
 ACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCA
 TACACGCAGAAGTCCCTCCTCTGCTCCGGTAAATAGTGA

Фиг. 29А

Лидерная последовательность ИЛ2 человека - курсивИЛ2 человека; Н16А=GCA; F42А= GCA ; жирный шрифт (GCA подчеркнуто)

(G4S)4 линкер - одинарное подчеркивание

A0201 человека; Y84А=GCC; A236С=TGC - двойное подчеркивание (GCC и TGC жирным шрифтом)

AAAGG линкер - одинарное подчеркивание

Fc IgG1 человека; L234А=TTC, L235А=GAG, P331S=AGCN297=AAC; AGG в AGA (все равно R) и AGC в TCC (все равно S)- (жирный шрифт и подчеркивание TTC, GAG, AAC, AGC курсивом)

Стоп-кодоны (TAGTGA)

Фиг. 29В

1274: (SEQ ID NO:77)

MSRSVALAVLALLLSLSGLEAYMLDLOPETTTGGGGSGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSCHPA
 ENKSNELNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSYLLVYTFEFTPEK
 DEYACRVNHVTLSPKIVKWRDMD

Лидерная последовательность β2М человека - курсивом

E7(11-20) - жирным шрифтом и подчеркнуто

(G4S)3 линкер - одинарное подчеркивание

β2М человека; R12C - двойное подчеркивание (R12C жирным шрифтом)

Фиг. 30

1274 без лидерного пептида (SEQ ID NO: 78)

YMLDLQPETTGGGGSGGGGSGGGGSIQYMLDLQPETTGGGGSGGGGSGGGGSIQFTFKTOVYSCH
FAENGGKSHFTNOYVSGEHPEDTEVDLLKNGERTTKVPHSHLSPSKDNSEYLLLYVFEETPTKLSY
ACRYNHVTLTQPKTYKWDKCMRTPHIQVYSCHDAENGGKSNELNCOYVSGEHPSDTEVDLLKNGERT
IKVPHSDLSPSKDNSEYLLLYVFEETPTKLSYACRYNHVTLTQPKTYKWDKCM

E7(11-20) - жирным шрифтом и подчеркнуто (YMLDLQPETT; SEQ ID NO: 13)
 (G4S)3 линкер - одинарное подчеркивание (GGGGSGGGGSGGGG; SEQ ID NO: 89)
 β2M человека; R12C - двойное подчеркивание

Фиг. 31

(SEQ ID NO: 79)

1274 нуклеотидная последовательность, кодирующая 1274 с лидерным пептидом

ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCC**TACATGCTCGA**
TTTGACAGCCCGAAACGACGGGTGGAGGTGGTTCTGGAGGAGGCGGTTCCGGCCGGAGGTGGTAGTATC
CAGCGTACTCCAAAGATTCAGGTTTACTCATGCCATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAATTCCTGAATT
GCTATGTGCTGGGTTTCATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAGAATTGAAAA
AGTGGAGCATTGACTTGTCTTTCAGCAAGGACTGGTCTTCTATCTCTTGTATTACTGAATTCACCCC
CACTGAAAAAGATGAGTATGCCCTGCCGTGTGAACCACGTGACTTTGTACAGCCCAAGATAGTTAAGTG
GGATCGAGACATGTAGTGA

Лидерная последовательность β2M человека - курсивом
 E7(11-20) - жирным шрифтом и подчеркнуто
 (G4S)3 линкер - одинарное подчеркивание
 β2M человека; R12C = TGC - двойное подчеркивание (TGC жирным шрифтом)
 Стоп-кодоны TAGTGA

Фиг. 32

Последовательность Fc IgG1 человека ДТ: (SEQ ID NO: 80)

DKHTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 33A

Мутантная последовательность Fc IgG1 человека: L234F/L235E/P331S (тройной мутант «ТМ») (SEQ ID NO: 81)

DKHTHCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 33B

Мутантная последовательность Fc IgG1 человека: N297A (SEQ ID NO: 82)

DKHTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 33C

Мутантная последовательность Fc IgG1 человека: L234A/L235A («LALA») (SEQ ID NO: 83)

DKHTHCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Последовательности пронумерованы в соответствии с индексом EU (нумерация по Кабату).

Фиг. 33D

B2M R12C (SEQ ID NO:17)

IQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSEFYLL
YYTEFTPEKDEYACRVNHVTLSSQPKIVKWDRDM

Фиг. 34А

ИЛ-2 (H16A; F42A) (SEQ ID NO: 84)

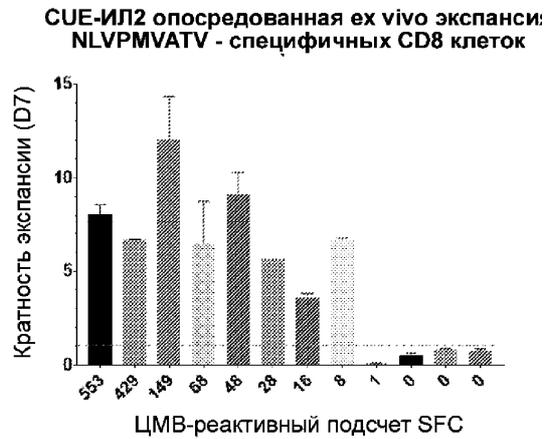
APTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHQLQCLEEELKP
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATVEFLNRWITFCQSIIS
TLT

Фиг. 34В

Н-цепь ГКГС класса I A0201 (Y84A; A236C) (SEQ ID NO:19)

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFDS DAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETR
KVKAHSQTHRVDLGLTRGAYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDL
RSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTVCVEWLRRLRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVS
DHEATLRCWALSFPAEITLTWQRDGEDQTQDTLVELVETRPCGDGTFQKWAAVVVP SGQEQRVYTCN
VQHEGLPKPLTLRWE

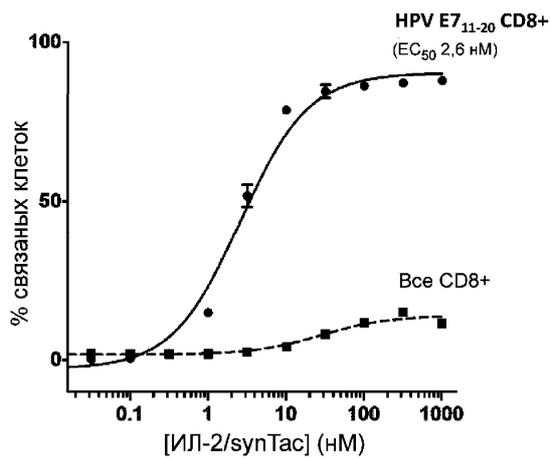
Фиг. 34С



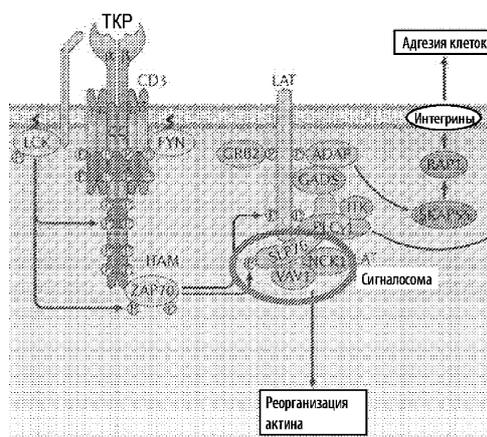
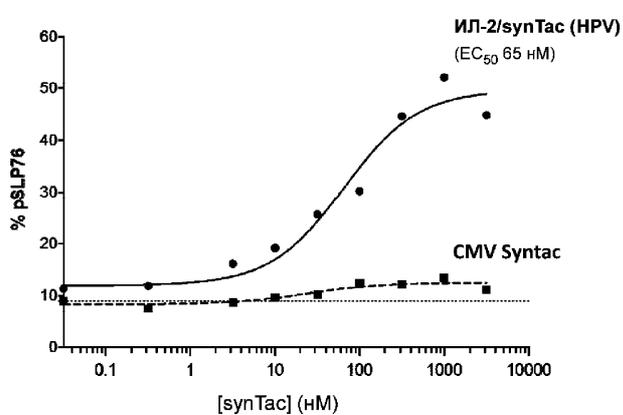
Фиг. 35

Аминокислота	Номер Syntac	Уровень экспрессии (мг/л)	Связывание рецептора Octet (KD в нМ)			EC50 для клеточного связывания, нМ		EC50 для pSTAT5, нМ		
			αβγ	βγ	β	LCMV	Black6	LCMV	Black6	B6/LCMV
H	982	77	14.9			0.25	>100	5.019	57.05	11
A	986	89	16.5			0.22	>100	20.09	543.8	27
R	1284	81	ND			0.29	>100	>1000	>1000	ND
N	1285	50	9.0			0.48	>100	35.19	1041	30
D	1286	31	12.3			0.28	>100	0.6365	15.71	25
C	1287	37	7.6			0.59	>100	59.98	1192	19
Q	1288	66	13.8			0.23	>100	21.64	530.1	24
E	1289	66	13.7			0.31	>100	3.899	117.2	30
G	1290									
I	1291	61	8.4			0.31	>100	>1000	>1000	ND
L	1292	50	12.5			0.38	>100	>1000	>1000	ND
K	1293	74	ND			0.27	>100	>1000	>1000	ND
M	1294	81	18.2			0.41	>100	34.88	674.5	19
F	1295	32	18.6			0.46	>100	4.864	69.1	14
P	1296	2								
S	1297	77	21.2			0.28	>100	14.42	113.4	8
T	1298	123	29.5			0.31	>100	29.66	>1000	>34
W	1299	24	18.6			0.59	>100	70.95	>1000	>14
Y	1300	31	25.4			0.49	>100	16.82	188	11
V	1301	87	7.8			0.28	>100	230.4	>1000	>4

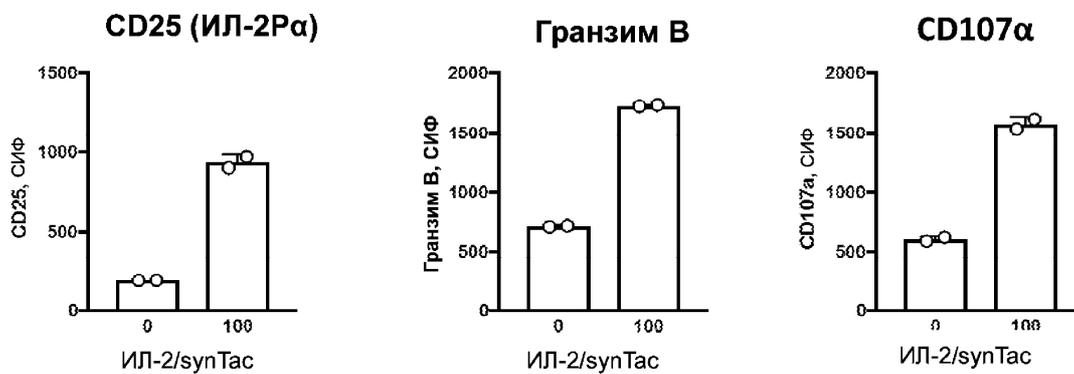
Фиг. 36



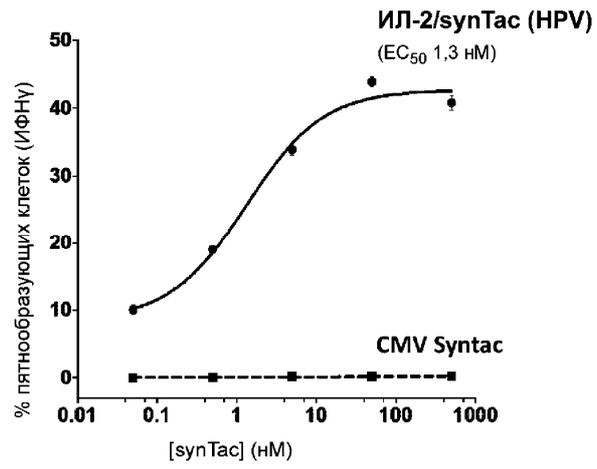
Фиг. 37



Фиг. 38



Фиг. 39



Фиг. 40

